



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
METODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
DOXICICLINA EN PLASMA MEDIANTE
CLAR”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN MANUEL JIMÉNEZ VARGAS



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

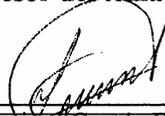
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

Presidente : INES FUENTES NORIEGA
Vocal : RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ
Secretario : MYRIAM CORTÉS FUENTES
1er. Suplente : MARIA DE LOURDES MAYET CRUZ
2º. Suplente : KENNETH RUBIO CARRASCO

El tema se desarrolló en el área de analítica del Centro A. F. de Estudios Tecnológicos S.A.

Asesor del tema:



QFB. Myriam Cortés Fuentes

Supervisor técnico:



QFB. Francisco Vidal Tovar López

Sustentante:



Juan Manuel Jiménez Vargas

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado profesionalmente.

A mis profesores y en especial a la profesora Lilia Vierna García por el apoyo, las asesorías y por la confianza hacia mi. Y al profesor Ricardo Rodríguez Saenz, por sus consejos en la estructuración del presente trabajo

Agradezco al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

A todos los compañeros del Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, a Juanita Acevedo, Adrian, Paty Valadez, Perlita Sánchez, Sergio Camacho, Fidel García, Gonzalo Oviedo, Blanca Badillo, Guillermina Cova, Juan Ramón Martínez y en especial a Myriam Cortés Fuentes y a Francisco Vidal Tovar, les agradezco a ambos sus enseñanzas, confianza y amistad y que gracias a ustedes logré parte de mi superación personal y profesional.

*No puedo dejar de mencionar a mis **amigos del árbol antillano** a todos ustedes les agradezco su amistad y apoyo incondicional durante toda la carrera.*

*Gracias a **Gaby, Liliana, Leobardo, Noé, Oscar, Sergio, Ivonne, Anel, Irene, Tonantzin, Mary, Marino y Fernando** porque en el transcurso de la carrera me ofrecieron su cariño, amistad y compañía.*

*También es momento de agradecer a mis **hermanos** por su comprensión, apoyo y sobre todo su paciencia.*

*Y no podría faltar de agradecer infinitamente a la persona que le debo todo, quien siempre me apoyó, me aconsejó y sobre todo me formó espiritualmente, a ti **madre** te agradezco porque me haz ayudado a cumplir parte de mis metas y porque me enseñaste que con empeño y sacrificios todo se puede lograr en esta vida.*

*Y finalmente agradezco a **Dios** por guiar mi camino.*

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. OBJETIVO.....	3
3. GENERALIDADES.....	3
3.1. IMPORTANCIA DEL DESARROLLO ANALÍTICO.....	4
3.2. GENERALIDADES SOBRE FLUIDOS BIOLÓGICOS	4
5.2.7. <i>Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.....</i>	4
3.2.2. <i>Características de los fluidos biológicos.....</i>	4
3.2.2.1. Sangre.....	5
3.2.2.2. Suero.....	5
3.2.2.3. Plasma	6
3.2.2.4. Fracción libre de proteínas.....	6
3.2.2.5. Orina.....	6
3.2.3. <i>Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos</i>	6
3.2.3.1. Ultrafiltración.....	6
3.2.3.2. Precipitación de proteínas	7
3.2.3.3. Extracción.....	8
3.2.3.3.1. Extracción Líquido-Líquido.....	8
3.2.3.3.2. Extracción en Fase Sólida (EFS)	8
3.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	9
3.3.1. <i>Tipos de cromatografía.....</i>	10
3.3.2. <i>Campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución.....</i>	12
3.3.3. <i>Parámetros cromatográficos</i>	12
3.3.4. <i>Teoría de la velocidad (teoría cinética).....</i>	15
3.3.5. <i>Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</i>	17
3.3.5.1. Fase móvil.	17
3.3.5.2. Bombas.....	18
3.3.5.3. Sistemas de Inyección de muestra	18
3.3.5.4. Columnas y Fases Estacionarias	19
3.2.3.3.1. Contenedor del Empaque.....	19
3.2.3.3.2. Material de Empaque	20
3.3.5.5. Detección	20
3.2.3.3.1. Detector UV.....	21
3.2.3.3.2. Detector de índice de Refracción.....	21
3.2.3.3.3. Detector de Fluorescencia.....	21
3.2.3.3.4. Electroquímicos	22
3.3.5.6. Otros accesorios.	22
3.4. COMPUESTO DE INTERÉS	23
3.4.1. <i>Nomenclatura⁷</i>	23
3.4.1.1. Nombre químico	23
3.4.1.2. Nombres comerciales.....	23
3.4.1.3. Número de registro CAS.....	23
3.4.2. <i>Fórmula, estructura y peso molecular⁷</i>	23

3.4.3. <i>Propiedades fisicoquímicas</i> ⁷	24
3.4.3.1. Solubilidad.....	24
3.4.3.2. Constantes de disociación.....	24
3.4.3.3. Coeficiente de partición.....	24
3.4.3.4. Espectro U.V.....	24
3.4.4. <i>Técnicas y métodos de análisis para la cuantificación de doxic telina en fluidos biológicos</i>	25
3.4.5. <i>Farmacología</i>	25
3.4.5.1. Mecanismo de acción.....	25
3.4.5.2. Farmacocinética y biodisponibilidad ¹⁷	26
3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.....	26
3.5.7. <i>Parámetros de validación</i> ²	26
3.6. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA ¹⁶	28
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
4.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR DOXICICLINA EN PLASMA.....	30
4.1.1. <i>Selección de la matriz biológica y del intervalo de trabajo</i>	30
4.1.2. <i>Obtención de las condiciones cromatográficas</i>	30
4.1.2.1. Condiciones de detección.....	30
4.1.2.2. Elección de la columna cromatográfica.....	30
4.1.2.3. Elección de la fase móvil.....	33
4.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	34
4.2.1. <i>Selección del estándar interno</i>	36
5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	38
5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	38
5.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	38
5.3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN EVALUADOS.....	39
5.3.1. <i>Selectividad</i>	39
5.3.2. <i>Linealidad</i>	39
5.3.3. <i>Precisión y exactitud</i>	39
5.3.4. <i>Límite de detección</i>	40
5.3.5. <i>Límite de cuantificación</i>	40
5.3.6. <i>Estabilidad</i>	40
5.3.6.1. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación.....	40
5.3.6.2. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección.....	40
5.3.6.3. Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente.....	41
5.3.6.4. Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a largo plazo.....	41
5.3.7. <i>Recuperación absoluta</i>	41
5.3.8. <i>Tolerancia</i>	41
5.3.8.1. Tolerancia a cambio de columna.....	41
5.3.8.2. Tolerancia a reemplazo de guardacolumna por filtro en línea.....	42
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	43
6.1. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.....	43
6.2. LINEALIDAD.....	44

6.3. PRECISIÓN Y EXACTITUD.....	45
6.4. LÍMITE DE DETECCIÓN.....	46
6.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	46
6.6. ESTABILIDAD.....	47
6.6.1. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación	47
6.6.2. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección.....	47
6.6.3. Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente.....	48
6.6.4. Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a largo plazo.....	48
6.7. RECUPERACIÓN ABSOLUTA	49
6.8. TOLERANCIAS	49
6.8.1. Tolerancia a cambio de columna.....	49
6.8.2. Tolerancia a reemplazo de guardacolumna por filtro en línea.....	50
7. CONCLUSIONES.....	51
8. APÉNDICE.....	52
8.1.1. Sustancia de Referencia.....	52
8.1.2. Reactivos.....	52
8.1.3. Equipo.....	52
9. BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. RESUMEN

El presente trabajo muestra el desarrollo de un método analítico basado en cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación del antibiótico doxiciclina en plasma humano en un intervalo de concentración de trabajo de 50 - 3000 ng/mL. Durante el desarrollo del método analítico se estudiaron diferentes sistemas cromatográficos y procesamientos de muestra. En el método analítico desarrollado, la muestra fue sometida a una precipitación utilizando metanol para remover proteínas presentes en el plasma, se requirió de la adición de un estándar interno para amortiguar los errores durante el procesamiento. La separación del analito se llevó a cabo mediante el empleo de una columna analítica C8, Agilent Zorbax SB de 100*4.6 mm de diámetro interno y 3.5 μ m de tamaño de partícula. La detección de la doxiciclina y del estándar interno se realizó al U.V. a 350 y 260 nm respectivamente. Finalmente, se determinaron algunos parámetros de validación que mostraron que el método cumplía con la especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión.

2. INTRODUCCIÓN

En el pasado, la forma de dosificación de un medicamento de diferentes fabricantes e incluso las muchas preparaciones de un solo fabricante presentaban gran diferencia al momento de evaluar su respuesta ante determinado tratamiento en los pacientes, es decir, que mostraban menor o mayor absorción de las sustancias activas provocando una falla terapéutica. Para demostrar que dos formulaciones del mismo principio activo son terapéuticamente equivalentes (bioequivalencia), es necesario evaluar el perfil de biodisponibilidad, para lo cual es necesario cuantificar al fármaco y/o sus metabolitos en el fluido biológico en el que se encuentre. Estos estudios son realizados por instituciones y laboratorios autorizados por la Secretaría de Salud. Estas unidades cuentan con dos áreas, un área clínica y un área analítica. En el área clínica se seleccionan individuos con características bien específicas de salud para el uso del medicamento, se evalúa, se identifican y manejan efectos adversos sin poner en peligro la integridad física de los voluntarios, y se elabora un reporte técnico de los resultados obtenidos durante la fase clínica. El área analítica consiste en un laboratorio de química altamente especializado que va a detectar y cuantificar el fármaco estudiado en los diferentes líquidos corporales.

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, presentan actividad contra bacterias gram positivos y gram negativos, incluyendo algunas bacterias anaerobias. Dentro de este grupo de antibióticos, la doxiciclina es muy utilizada debido a la alta biodisponibilidad, su elevada lipofilia y por la gran afinidad que presenta hacia los tejidos. Aprovechando las propiedades fisicoquímicas que presenta la molécula de doxiciclina, se ha logrado desarrollar distintas técnicas capaces de determinarla en fluidos biológicos. Entre éstas se encuentran: técnicas fluorométricas, microbiológicas, espectrofotométricas y cromatográficas principalmente, sin embargo éstas técnicas no alcanzan la especificidad y sensibilidad que con la cromatografía de líquidos de alta resolución se logra obtener. De igual forma se han desarrollado métodos cromatográficos que logran cuantificar doxiciclina en plasma, pero presentan la desventaja de emplear procesamientos de muestra complejos, tiempos de análisis largos y no cumplen con la sensibilidad que se requiere para ser empleados en estudios de bioequivalencia.

El desarrollo del método analítico para cuantificar al fármaco en el fluido biológico, toma gran interés, ya que en éste se invierte la mayor cantidad de tiempo en un estudio de bioequivalencia, pues en esta etapa se requiere que el método sea capaz de cuantificar al analito de manera confiable, para lo cual el método analítico es sometido a un proceso de validación, en donde se evalúan los parámetros que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, para juzgar si el medicamento es o no es bioequivalente.

2.1. OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico para identificar y cuantificar hclato de doxiciclina en plasma humano a concentraciones de 50 a 3000 ng/mL, empleando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

3. GENERALIDADES

3.1. IMPORTANCIA DEL DESARROLLO ANALÍTICO

Uno de los problemas, de los tantos que se enfrenta el químico analista, es el encontrar un método analítico que permita la identificación y cuantificación de analitos de interés. El desarrollo analítico juega un papel importante en estos casos, ya que con su aplicación, se logran estrategias metodológicas que llevan a la creación, optimización y diseño de métodos analíticos.

3.2. GENERALIDADES SOBRE FLUIDOS BIOLÓGICOS

3.2.1. Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos

Anteriormente el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se aplicaba en la medicina forense. Sin embargo, su campo de aplicación ha crecido y actualmente ha tomado presencia en el desarrollo, investigación y comercialización de fármacos (figura 1).

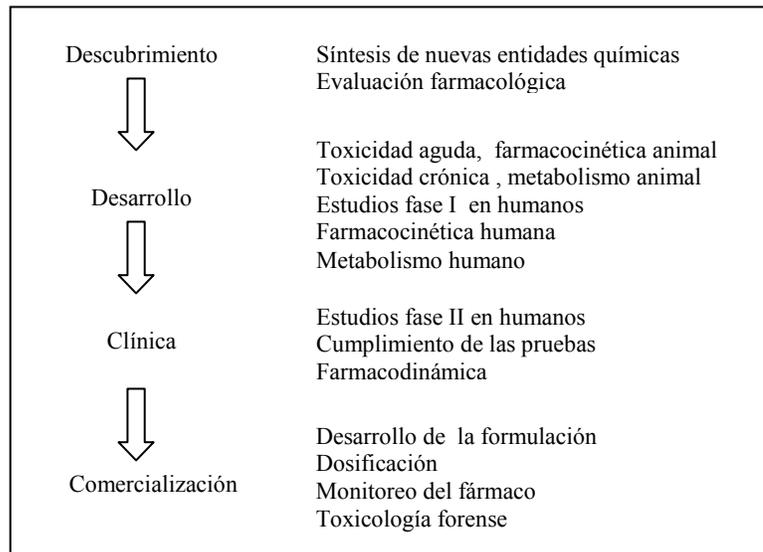


Figura 1. Etapas del desarrollo, investigación y comercialización de fármacos que requieren cuantificación analítica de fármacos¹.

3.2.2. Características de los fluidos biológicos.

En los fluidos biológicos el fármaco de interés se puede encontrar rodeado de una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo con su determinación.

La selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos depende directamente de la farmacocinética del analito, ruta de eliminación, capacidad para unirse a proteínas y de los alcances del método.

En la tabla 1. se muestran las matrices biológicas en las que generalmente se cuantifican fármacos de interés.

Tabla 1. Tipos de matrices biológicas.¹

MUESTRAS BIOLÓGICAS DE MAYOR A MENOR GRADO DE DIFICULTAD DE ANÁLISIS	
Sólidos	Cerebro Corazón, hígado, riñón, pulmón, músculo Huesos
Mezclas	Plasma, suero Sangre Heces
Líquidos	Líquido cerebroespinal Lágrimas Sudor Saliva Orina Bilis

La sangre, el plasma, el suero y la orina son de los fluidos biológicos más comunes para el análisis de fármacos, debido a su naturaleza no invasiva en la recolección y su sencilla obtención y manipulación.

3.2.2.1. Sangre

Es el fluido biológico mas usado para la identificación y cuantificación de fármacos que presentan alta afinidad o permeabilidad a las membranas celulares de eritrocitos, linfocitos, etc. Consiste de un líquido amortiguado con proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Los eritrocitos son el principal componente de la sangre y pueden separarse del componente líquido por centrifugación.

Al analizar sangre, los componentes celulares deben ser lisados para que su contenido pueda formar una mezcla homogénea con la porción fluida de la sangre. Las células pueden ser lisadas utilizando ultrasonido o congelando las muestras por un tiempo y someténdolas a ultrasonido posteriormente².

3.2.2.2. Suero

Se deriva de la sangre a partir de la coagulación y posterior centrifugación, eliminando de esta forma las células y factores de coagulación presentes. El suero es comúnmente empleado para la cuantificación de fármacos cuando el analito no presenta afinidad por células ni por proteínas.

3.2.2.3. Plasma

Al igual que el suero, es obtenido a partir de la centrifugación de la sangre a la que se le ha adicionado un anticoagulante. El plasma es suero que contiene fibrinógeno y factores de coagulación¹. En la cuantificación de fármacos, el plasma se utiliza cuando el analito presenta alta afinidad por proteínas.

3.2.2.4. Fracción libre de proteínas.

Es la porción de la sangre que queda después de que los componentes celulares y las proteínas plasmáticas han sido eliminados. Esta fracción contiene sustancias que no están unidas a proteínas plasmáticas y puede obtenerse mediante ultrafiltración.

3.2.2.5. Orina

Es una mezcla constituida por sustancias solubles en agua. Generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos. El pH depende en gran medida de la dieta. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puede excretar en un intervalo de tiempo fijo, es importante la cantidad de fármaco excretada y no la concentración.¹

Es comúnmente utilizado en estudios de farmacocinética y bioequivalencia, cuando la eliminación renal del fármaco inalterado es de cuando menos el 50%.²

3.2.3. Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos

El procesamiento de muestra, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, ya que debe ser de aplicación fácil, rápida, de bajo costo y debe eliminar a la fuente principal de interferencias.

Por esta razón es deseable que el procesamiento sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener de esta forma métodos rápidos, económicos y reproducibles.

Las técnicas tradicionalmente empleadas en el procesamiento de muestras son: ultrafiltración, precipitación de proteínas y extracción.

3.2.3.1. Ultrafiltración

Como ya se ha mencionado anteriormente, las muestras biológicas como suero y plasma presentan grandes cantidades de proteínas, que pueden interferir en la determinación analítica del fármaco. Los fármacos pueden tener la propiedad de unirse a proteínas plasmáticas o bien, de encontrarse en forma libre.

Cuando los fármacos presentan baja unión a proteínas, es recomendable realizar una ultrafiltración de la muestra, con el fin de separar las proteínas y demás constituyentes del analito en estudio. Esta separación se realiza basada a la diferencia existente en los tamaños

moleculares. La ultrafiltración tiene la ventaja de ser rápida, sencilla y presentar poca manipulación en comparación con las otras técnicas de procesamiento de muestras biológicas.

3.2.3.2. Precipitación de proteínas

Cuando los fármacos se encuentran unidos a las proteínas plasmáticas, se dificulta la cuantificación del analito por la baja concentración que existe en forma libre (no unida a proteínas). Este problema se resuelve con la destrucción física de esta unión que causa la liberación del fármaco, logrando obtener una solución acuosa libre de proteínas que suele ser analizada o sometida a otros procesos de extracción.

Existen dos procedimientos que difieren en su principio y pueden ser utilizados para lograr la desnaturalización y precipitación de proteínas. El primero y mas sencillo consiste en la adición de ácidos, sales o disolventes orgánicos. Los problemas asociados a este proceso es que el fármaco de interés puede degradarse o precipitar junto con las proteínas presentes en la matriz biológica. Con el uso de disolventes orgánicos, se puede contrarrestar ese problema. Entre los disolventes orgánicos más utilizados para la precipitación de proteínas se encuentran el metanol y el acetonitrilo³. La tabla 2 presenta las principales formas para precipitar proteínas.

Como segunda alternativa, las proteínas pueden ser desnaturalizadas con la adición de enzimas proteolíticas como tripsina, proteinasa, papaina, sutilisina y ketodasa. Los buenos recobros encontrados en algunos fármacos, muestran que es un procedimiento muy eficiente para liberar los fármacos que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas.³

Tabla 2. Métodos de precipitación de proteínas utilizados.¹

Desnaturalización y precipitación de proteínas presentes en suero y plasma para el análisis de fármacos	
Método	Comentario
Calentamiento a 90°C por 5-10min.	No es muy eficiente y no se recomienda para analitos termolábiles.
Ciclos de congelación-descongelación.	No es muy eficiente y consume mucho tiempo.
Saturación con sulfato de amonio.	Eficiencia moderada, pH al final de la precipitación de 7, alta concentración de sales en el sobrenadante.
Sulfato de zinc/hidróxido de sodio.	Excelente eficiencia, pH al final de precipitación de 7. Puede llevarse acabo a temperaturas bajas.
Ácido metafosfórico	Excelente eficiencia, el pH ácido puede descomponer a la sustancia de interés.
Ácido perclórico.	Excelente eficiencia, el pH puede descomponer a la sustancia de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.
Ácido tricloroacético	Buena eficiencia, el reactivo debe de permanecer frío y puede resultar difícil remover la sustancia de interés.
Etolol	Se requiere de dos volúmenes para una desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido.
Acetonitrilo	Se requiere de 1.5 volúmenes para desnaturalización completa ; es útil para fármacos inestables a pH ácido.
Cloruro de aluminio	Es mejor que el sulfato de amonio para compuestos básicos

3.2.3.3. Extracción

Los fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas suelen presentar dificultades para análisis. Esto se debe a varias razones como⁴:

1. La matriz de la muestra presenta interferencias con el análisis del analito.
2. El medio acuoso es incompatible con los requerimientos de la técnica analítica.
3. La concentración del analito en la muestra es más baja que el límite de detección propuesto en el método analítico.

En tales casos la extracción es utilizada para:

1. Remover interferencias de la matriz biológica.
2. Cambiar el medio a un disolvente adecuado para el análisis.
3. Concentrar el analito en una muestra.

El proceso de extracción consiste en aplicar la muestra en estado líquido a un sistema de disolventes (extracción líquido-líquido) o a un medio de adsorción (extracción en fase sólida), cada una de ellas se tratan a continuación.

3.2.3.3.1. Extracción Líquido-Líquido

En general la extracción líquido-líquido resulta en la transferencia del analito desde una fase acuosa a una fase orgánica.

La extracción de fármacos en fluidos biológicos se puede llevar a cabo en medio ácido ($\text{pH} \leq 3$) o en medio básico ($\text{pH} \geq 8$).

El principio básico consiste en que el fármaco al encontrarse en su forma no ionizada, es mas afín a la fase orgánica.

La completa remoción de un fármaco de interés hacia la fase orgánica depende de varios factores, como el porcentaje de ionización dependiente del pH del medio y del pKa del fármaco, el volumen de las dos fases en la extracción y el número de extracciones realizadas.

3.2.3.3.2. Extracción en Fase Sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) se basa en la separación de los componentes de una mezcla por la diferencia en la velocidad de migración de las moléculas de los componentes a través de la fase estacionaria.

La fase estacionaria utilizada suele ser de naturaleza hidrofílica (fase normal), hidrofóbica (fase reversa) o con grupos iónicos (intercambio iónico).

En el pasado, la extracción líquido – líquido ocupó un papel importante en la extracción de fármacos de los fluidos biológicos. Sin embargo, se encontró que presentaba severas desventajas al compararla con la extracción en fase sólida.

Las ventajas de la EFS sobre la extracción líquido-líquido son⁴:

1. Menor consumo de disolventes orgánicos
2. No presenta problemas de emulsiones.
3. Tiempos cortos en preparación de la muestra.
4. Posibilidad de automatización total

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 empaque y la muestra con la mayoría de los componentes no deseados, pasa por el empaque sin ser retenida. Los componentes no deseados retenidos son eliminados selectivamente mediante lavados. Finalmente 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 empaque y pueden ser desechados.

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

En cualquiera de los casos, el adsorbente debe ser primero acondicionado con un disolvente apropiado. Después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del adsorbente y las impurezas (interferencias) son desorbidas con un disolvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el disolvente apropiado. De manera general para una extracción completa son necesarios 4 pasos de operación: Acondicionamiento de los cartuchos, aplicación de la muestra, paso de limpieza y por último la elución y recuperación del analito.

3.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

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 éste 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 (fase estacionaria), y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil).

En 1906 el botánico ruso Mikhail Tswett realizó diversos experimentos para separar pigmentos vegetales. Estos experimentos consistían en hacer pasar soluciones de pigmentos vegetales a través de tubos de vidrio rellenos de yeso pulverizado. Encontró que algunos pigmentos podían ser separados entre sí. De hecho éstos aparecían como bandas coloreadas en los tubos. Debido a la separación de estas bandas coloreadas llamó a esta separación “método cromatográfico”. El término deriva del griego que significa escritura en color.⁵

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de sembrar la muestra en la parte superior se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objetivo de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase estacionaria se fue disminuyendo hasta tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución que requiere de instrumental especial que permita trabajar con altas presiones requeridas.

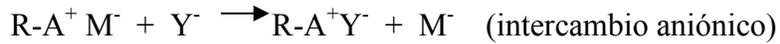
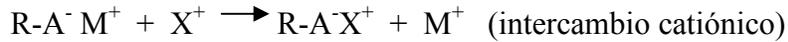
La migración diferencial en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil hacia un detector donde se registra la señal generada, esta señal es transmitida después a un sistema de recolección de datos donde se genera un cromatograma. En el cromatograma obtenido se observa el tiempo de retención característico para las condiciones empleadas. El cromatograma resultante puede ser empleado para determinar la concentración del analito.

3.3.1. Tipos de cromatografía

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede ser:

1. Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido, se utiliza casi exclusivamente sílice (silica) y en mucha menor medida alúmina. La fase móvil empleado suele ser de naturaleza líquida.
2. Cromatografía de reparto: En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Se subdivide en cromatografía en fase normal y en fase reversa. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero. En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria es polar y los compuestos menos polares eluyen primero al utilizar como fase móvil disolventes de naturaleza no polar.
3. Cromatografía de intercambio iónico: Se basa en el equilibrio de los iones de soluto entre el disolvente y los sitios cargados en fase estacionaria. Esta consta de

una matriz (R) con grupos funcionales cargados (A) y contraiones de carga opuesta (M), susceptibles de intercambiarse con especies de la misma carga contenidas en la fase móvil (X).



4. Cromatografía de exclusión por tamaño: También denominada cromatografía de filtración en geles, es una técnica que se aplica fundamentalmente para la separación y caracterización de sustancias de peso molecular elevado. La fase estacionaria está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento con el tamaño molecular. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.

Para solutos con masas moleculares superiores a 10 000, se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase reversa. Para especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos. Ver figura 2.

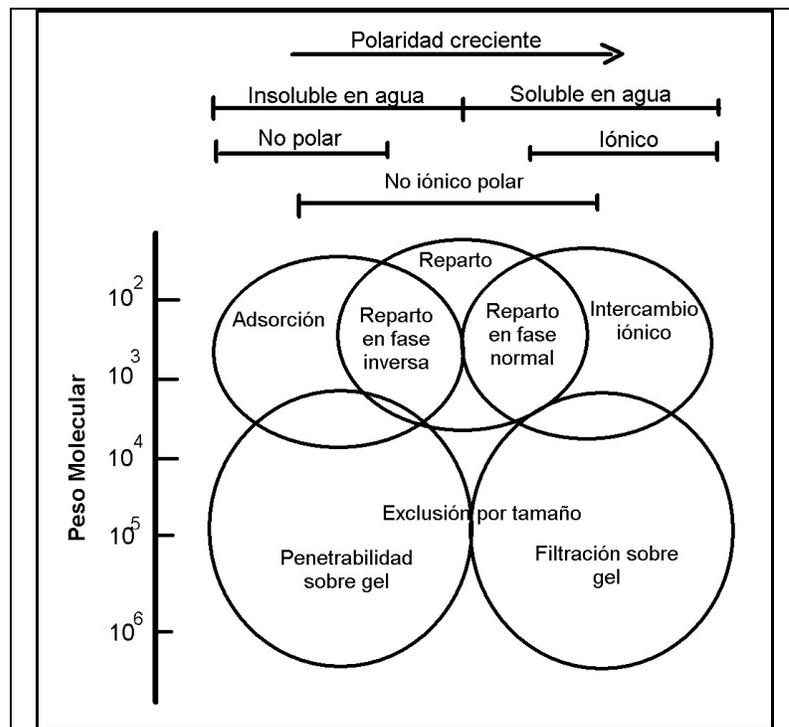


Figura 2. Tipos de cromatografía líquida

3.3.2. Campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria.⁶ En los laboratorios clínicos, las principales aplicaciones están en los análisis de fármacos, particularmente en la monitorización terapéutica de fármacos y en la determinación de fármacos. En la tabla 3 se enumeran unos cuantos ejemplos característicos entre la gran variedad de aplicaciones de la cromatografía de líquidos.

Tabla 3. Aplicaciones características de la cromatografía de líquidos de alta resolución⁶

Campo	Mezclas típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, fenoles, PCB
Química forense	Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, etc.

3.3.3. Parámetros cromatográficos

Después de la separación cromatográfica, se obtiene un gráfico de intensidad de la respuesta en función del tiempo, este es comúnmente denominado cromatograma. Idealmente se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. Ver figura 3.

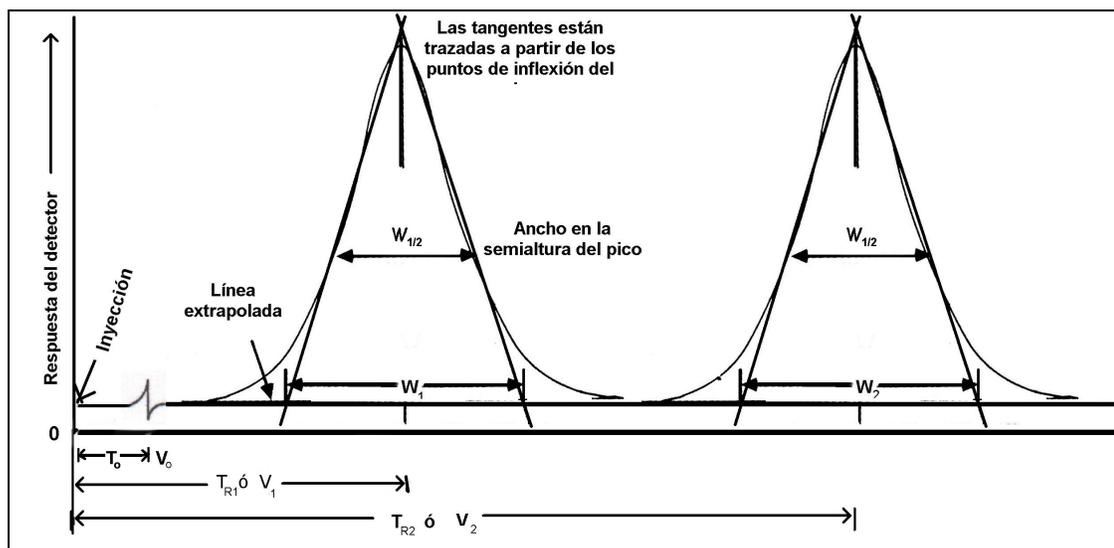


Figura 3. Gráfico característico en Cromatografía de líquidos de alta resolución

En el cromatograma de la figura anterior se observan varios picos, a distintos tiempos. El tiempo que transcurre para eluir los compuestos que no presentan afinidad por la columna se denomina tiempo muerto T_0 y el volumen necesario de fase móvil para lograr eluir a estos

compuestos se denomina Volumen muerto V_0 . Este volumen es aproximadamente igual al volumen que la fase móvil ocupa en la columna.

T_{R1} y T_{R2} corresponden al tiempo que son retenidos dos compuestos en la columna. V_1 y V_2 son el volumen requerido de fase móvil para eluir el centro de esos picos. De los picos obtenidos se puede medir el ancho del pico W_1 y W_2 .

El factor de capacidad k' , que en ocasiones es llamado factor de retención o coeficiente de retención, describe la relación entre la cantidad de sustancia en la fase estacionaria y la fase móvil. Es afectado por el material de empaque de la columna y por las condiciones de elución. Para separaciones prácticas es generalmente recomendable que los valores de k' de los compuestos de interés se encuentren en un rango de 2 a 10. Se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_{R1} - t_{R0}}{t_{R0}}$$

La selectividad (α), describe la separación de los centros de los picos pertenecientes a dos compuestos. Al igual que el factor de capacidad, esta se ve afectada al cambiar la composición de la fase móvil y al material de empaque de la columna.

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2}$$

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

El número de “platos teóricos” es una medida de la eficiencia del sistema cromatográfico y no justamente de la eficiencia de la columna. El número de platos teóricos es representado por la letra **N**, y evidentemente es deseable un mayor número de platos teóricos para obtener una separación más eficiente.

El número de platos teóricos 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.

El número de platos teóricos, N, es usualmente incrementado por el empleo de columnas mas largas o reduciendo el tamaño de partícula del material de empaque. Entre mayor sea el valor de N, se obtienen separaciones más eficientes.

A partir del número de platos teóricos (N) se puede calcular la altura del plato teórico (H), en el cual se considera la longitud de la columna (L), se calcula de la siguiente manera:

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

Valores de H más pequeños indican una mayor eficiencia de la columna cromatográfica.

La resolución cromatográfica está definida por:

$$R = \frac{2(V_2 - V_1)}{W_1 + W_2}$$

Este parámetro describe la eficiencia de la separación entre dos especies. Una resolución adecuada se tiene con valores de $R > 1.5$.

Otra ecuación muy utilizada para calcular la resolución es:

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

Esta ecuación relaciona los parámetros de factor de capacidad, selectividad y eficiencia. Los factores químicos (α y k) pueden ser manipulados para obtener mejores resoluciones. El efecto de incrementar la eficiencia, N por el empleo de una segunda columna, puede duplicar el número de platos teóricos permitiendo un incremento en la resolución. Un mayor valor de factor de capacidad resulta en mejores resoluciones, un valor de k entre 2 y 5 proporciona un tiempo de análisis razonable y buenas resoluciones.

La ecuación de resolución asume que los picos son perfectamente simétricos. Los picos asimétricos, observados como coleo o cabeceo, tienden a disminuir la resolución. La asimetría está definida por:

$$A_s = \left(\frac{W_B}{W_A} \right)$$

Para encontrar los valores de W_a y W_b , se traza una perpendicular que va desde la punta hasta la base del pico, y una horizontal al 10% de la altura del pico. Ver figura 4.

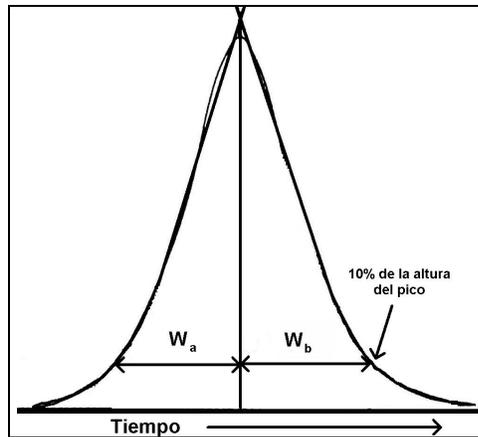


Figura 4. Cálculo de la asimetría del pico.

Un pico perfectamente simétrico muestra un valor de A_s de 1. Valores mayores de 1 indican coleo del pico, y valores de A_s menores a uno indican cabeceo del pico.

3.3.4. Teoría de la velocidad (teoría cinética)

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.

Los distintos mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de la banda cromatográfica son descritos por la ecuación de Van Deemter. Ésta define a la altura del plato teórico (H) como:

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

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

Aunque fue desarrollada para cromatografía en fase gaseosa, es razonable considerar que el ensanchamiento de las bandas en Cromatografía de líquidos se debe al mismo tipo de factores.

La difusión de remolino corresponde al término “A” de la ecuación de Van Deemter. Esta difusión ocurre debido a que la fase móvil se desplaza a través de la columna, la cual está empacada con la fase estacionaria. Las moléculas de analito 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. La resolución en cromatografía de líquidos se mejora al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria, lo cual, en primer lugar, reduce el término A de la ecuación, ya que las trayectorias seguidas por la fase móvil son más uniformes en el

caso de partículas de menor tamaño. Este parámetro está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.

La difusión longitudinal corresponde al termino “B” de la ecuación de Van Deemter. 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 es inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, es decir, si la velocidad de la fase móvil es alta, los efectos de la difusión longitudinal decrecen. Este término es importante en cromatografía de gases, pero como la difusión es mucho más lenta en los líquidos, el ensanchamiento de las bandas por este motivo en cromatografía de líquidos solo es significativo cuando la velocidad de flujo es excesivamente lenta⁵.

La resistencia a la transferencia de masa se conoce también como el termino “C” de la ecuación de Van Deemter. Al analito le toma un cierto tiempo alcanzar el equilibrio entre las fases, por lo tanto si la velocidad de la fase móvil es alta, no se logran verdaderos estados de equilibrio y el analito 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.⁵

Con la ecuación de Van Deemter se obtiene una gráfica que relaciona la altura del plato teórico (H) con el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil (Figura 5).⁵

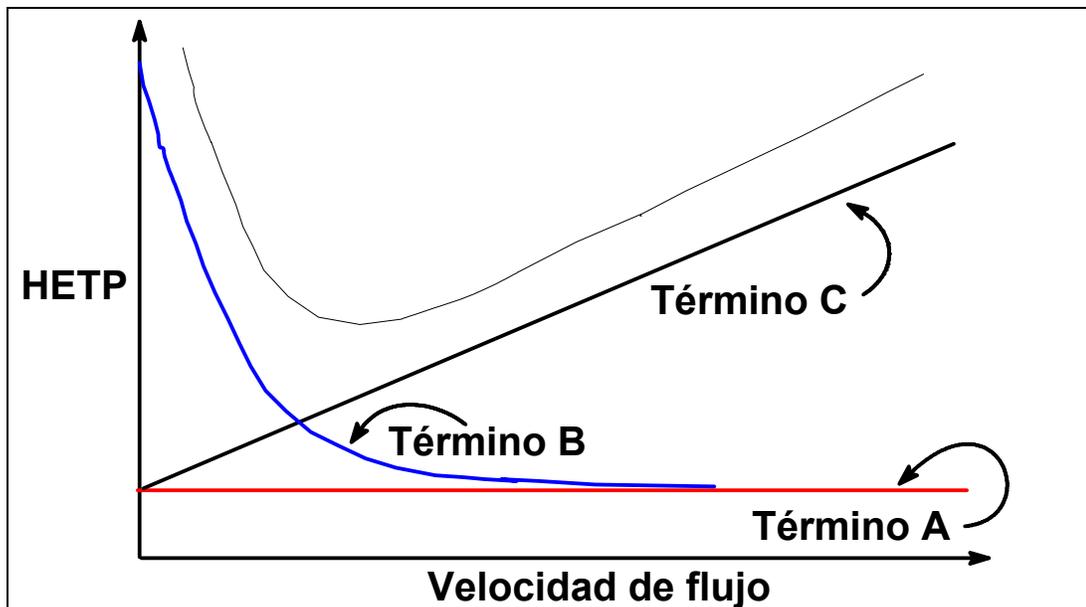


Figura 5. Gráfico típico de Van Deemter.

Este gráfico es sumamente útil en la determinación de la velocidad óptima de la fase móvil. Es importante recordar que mientras más pequeño sea el valor de la altura efectiva del plato teórico mejor será la separación.

3.3.5. Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

El equipo requerido para la cromatografía de líquidos de alta resolución está constituido en forma general por un reservorio para la fase móvil, un sistema de bombeo, un sistema de inyección de muestra, un sistema de detección y un registrador o sistema de recolección de datos. Ver figura 6.

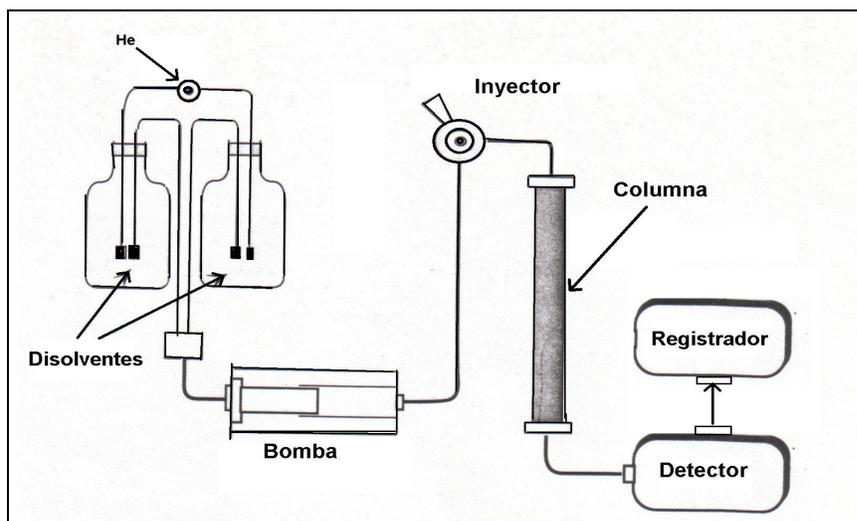


Figura 6. Componentes básicos de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución.

3.3.5.1. Fase móvil

Los depósitos que almacenan la fase móvil en la cromatografía de líquidos de alta resolución, tienen que ser inertes para evitar extraer alguna especie del material con que estén contruidos. Estos suelen ser fabricados con acero inoxidable o de vidrio y provistos con sistemas de filtros para eliminar cualquier partícula que pueda contener la fase móvil.

Los disolventes utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución suelen ser agua, soluciones amortiguadoras acuosas y disolventes orgánicos. Es importante que los disolventes empleados sean puros, exentos de partículas sólidas, para evitar que éstas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna.

El desgasificado reduce la posibilidad de formación de burbujas en las válvulas de las bombas y en los detectores, asimismo, es importante porque se reduce el ruido de fondo cuando se utiliza un detector ultravioleta. Se puede llevar a cabo con el burbujeo de gas inerte muy poco soluble, como nitrógeno o helio.

Además de la filtración y el desgasificado de los disolventes de la fase móvil, hay que considerar lo siguiente:

- Usar únicamente disolventes grado HPLC
- Usar solamente reactivos de alta pureza

- Asegurarse que los disolventes utilizados son miscibles
- Verificar la solubilidad de la muestra (si es posible usar la fase móvil para solubilizar la muestra)
- Considerar la longitud de onda de corte (Cutoff) que presenta el disolvente para evitar interferencias a la longitud de onda de trabajo cuando se emplean detectores UV
- Conocer el índice de polaridad de los disolventes con que se trabajará

La separación cromatográfica se puede llevar a cabo con un solo disolvente en composición constante (elución isocrática). Pero en ocasiones, se logra una mejor separación al utilizar dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta la cual va cambiando en composición a lo largo de la corrida analítica (elución con gradiente). Hoy en día esto es sencillo de realizar con instrumentos que están equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar⁶.

3.3.5.2. Bombas

Debido al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, es necesario el empleo de altas presiones para permitir el flujo del disolvente a través de la columna. Esto se logra con el uso de bombas que deben reunir las siguientes características:

- Estar construidas con materiales inertes y resistentes a la corrosión
- Suministrar un flujo libre de pulsaciones, en el margen comprendido entre 0.1 y 10 mL/min con una precisión del 0.5%
- Generar presiones superiores a 6000 psi (lb/in²).

Existen tres tipos de bombas para el equipo Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, estas son: bombas de desplazamiento, bombas neumáticas y bombas recíprocas. Las últimas son las más utilizadas y consisten de un pistón situado en el interior de una cámara, que alternativamente succiona eluyente contenido en un depósito a baja presión y lo impulsa hacia la columna a presión alta, mediante un sistema de válvulas. Tienen la desventaja de que producen un flujo pulsado que se ha de amortiguar convenientemente, para lo cual se utiliza en ocasiones un sistema constituido por dos pistones. Entre las ventajas de las bombas recíprocas se pueden citar su pequeño volumen interno (35 a 400 μ L), sus altas presiones de salida (por encima de los 10000 psi), su fácil adaptación con gradiente y sus flujos constantes.

3.3.5.3. Sistemas de Inyección de muestra

Los sistemas de inyección han evolucionado con el desarrollo de nuevas tecnologías; en un principio se utilizaban jeringas de alta presión, las cuales se encuentran actualmente en desuso. Los volúmenes a inyectar deberán ser reproducibles y pequeños, para evitar la sobrecarga de la columna que se ve reflejado en el ensanchamiento de la banda. Actualmente la inyección de la muestra se realiza mediante el empleo de válvulas de

inyección con bucles. Hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μL . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una precisión relativa de unas décimas por ciento.

3.3.5.4. Columnas y Fases Estacionarias

La columna analítica es el dispositivo en el cual se lleva a cabo el proceso de separación cromatográfica. Está constituida por el contenedor y el material de empaque, cada uno de estos componentes influyen de manera significativa en la eficiencia del proceso de separación. En la figura 7. se muestran los componentes de una columna y sus características principales.

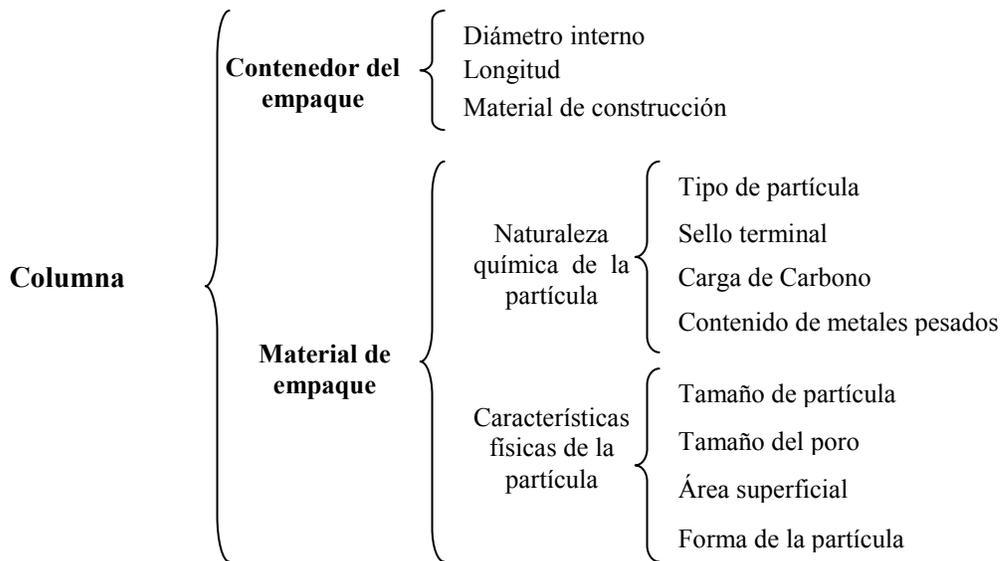


Figura 7. Componentes y características de las columnas cromatográficas.

3.2.3.3.1. Contenedor del Empaque

Las columnas cromatográficas están construidas ordinariamente con un tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme y rara vez se encuentran construidas de vidrio.

El contenedor de las columnas puede variar en cuanto a la longitud y al diámetro interno, lo cual tiene gran influencia sobre la eficiencia de la separación, pues si se tiene una columna más larga se obtienen mejores separaciones pero tiempos de análisis prolongados. Hoy en día se emplean columnas con una longitud entre 2 a 7.5 cm, estas columnas se caracterizan por la rapidez de análisis y del consumo mínimo de disolventes. Este último es de considerable importancia, puesto que los disolventes de alta pureza que se requieren en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución son muy costosos.

3.2.3.3.2. Material de Empaque

En cuanto al material de empaque, suele estar constituido de partículas de sílica, polimérica o híbrida. Las fases con base de sílica ofrecen una excelente resolución, pero suelen tener un reducido rango de pH de trabajo. Los polímeros ofrecen una gran estabilidad del pH, pero se quedan cortos en aportar buena resolución. En cuanto a la fase estacionaria híbrida que es una combinación de sílica con polímero, presenta estabilidad de pH (1-12), mayor eficacia y resolución que el polímero pero menor a la proporcionada por la sílica. Es común que a las partículas principalmente de sílica y poliméricas sean modificadas químicamente, enlazando cadenas de hidrocarburos (C4, C8, C18, etc) que alteran la hidrofobicidad de la fase estacionaria. También es común la adición de grupos químicos a los grupos activos (grupos silanol), que evita la formación de equilibrios secundarios con sustancias de carácter básico que causan el coleo en el pico. La pureza de la sílica es importante, pues suele tener trazas de metales como aluminio o magnesio que ocasionan un segundo equilibrio. La modificación química de la naturaleza de la partícula le confieren características especiales para ser utilizadas en casos particulares y en condiciones extremas de pH (a pH >7.5 ocurre la hidrólisis del siloxano, lo que origina la degradación del empaque) y temperatura (que reduce el tiempo de vida de la columna).

En cuanto a las características físicas, las partículas del empaque pueden variar en cuanto al tamaño, porosidad, área superficial y en la forma (esféricas o de forma irregular), estas características influyen marcadamente en la transferencia de masa y en la velocidad de flujo de la fase móvil (Ecuación de Van Demter). Se tiene que partículas con tamaños pequeños (< 5 µm), alta porosidad y formas esféricas, dan como resultado columnas cada vez más eficientes.

3.3.5.5. Detección

Un detector es un dispositivo que proporciona una respuesta ante una propiedad de la sustancia de interés. Un detector ideal para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución debe poseer las siguientes características:

- Sensibilidad elevada
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Amplio margen de respuesta lineal
- Pequeño tiempo de respuesta
- Pequeño volumen muerto
- Insensible a cambios en la presión y la temperatura
- Respuesta independiente de la composición de la fase móvil
- No destructivo

Los detectores más utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se

Propiedad del soluto {
Absorbancia ultravioleta
Fluorescencia
Electroquímicos

Propiedad de la disolución {
Índice de refracción
Conductividad

clasifican de la forma siguiente:

Los detectores basados en una propiedad del soluto responden a una propiedad física o fisicoquímica del soluto, que generalmente no presenta la fase móvil (resultan ser bastante selectivos y muy sensibles). Los detectores basados en una propiedad de la disolución comparan el cambio global de alguna propiedad física de la fase móvil con y sin soluto eluído. Estos suelen ser poco sensibles⁵.

3.2.3.3.1. Detector UV

Los detectores de absorbancia ultravioleta son los más utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Su fundamento es la espectrometría de absorción. Hay básicamente tres tipos:

- Detector de Longitud de Onda Fija
- Detector de Longitud de Onda Variable
- Detector de Arreglo de Diodos

El detector de longitud de onda fija es el más sencillo, utiliza la emisión intensa a 254 nm de una lámpara de mercurio. Se estima que a esta longitud de onda presentan absorción casi las dos terceras partes de los solutos orgánicos analizados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. En el detector de longitud de onda variable se utiliza una lámpara de deuterio y un monocromador, con este tipo de detectores se puede seleccionar una longitud de onda para cada pico cuando se encuentran suficientemente separados. Los detectores espectrofotométricos más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos, con estos detectores se puede registrar el espectro completo de cada soluto. En estos dispositivos, toda la radiación procedente de la fuente (lámpara de deuterio) se hace pasar a través de la muestra, en lugar de seleccionar previamente una radiación determinada con un monocromador como en espectrofotometría convencional.

3.2.3.3.2. Detector de Índice de Refracción.

Este tipo de detectores es el que más se aproxima al detector universal ideal, ya que, el índice de refracción de la fase móvil deberá modificarse por la presencia de cualquier soluto que tenga un índice de refracción diferente a ella. El principal inconveniente de este tipo de detectores es que son muy sensibles a los cambios de temperatura, la cual debe ser controlada con fluctuaciones de ± 0.0001 °C.

3.2.3.3.3. Detector de Fluorescencia.

Los detectores de fluorescencia se caracterizan por ser especialmente sensibles, si bien, responden sólo a la limitada gama de analitos que tienen propiedades fluorescentes. Los compuestos que pueden presentar fluorescencia son aquellos sistemas cíclicos con un alto grado de conjugación. Tal es el caso de hidrocarburos aromáticos, quinoleínas, esteroides,

alcaloides, etc. Con objeto de incrementar su aplicabilidad es posible inducir fluorescencia a determinados analitos mediante el uso de reactivos apropiados (derivatización).

3.2.3.3.4. Electroquímicos

Los detectores electroquímicos son una alternativa para la detección de moléculas que no presentan absorción de luz U.V. ni fluorescencia nativa.

La detección electroquímica ofrece ciertas ventajas respecto a otros métodos de detección, en orden de especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos.

Cualquier especie capaz de ser oxidada o reducida sobre un electrodo es susceptible de detección por vía electroquímica en una variedad de matrices.

Los detectores electroquímicos más utilizados con esta finalidad son:

- Detector Amperométrico
- Detector Conductimétrico
- Detector Potenciométrico

Se deben tener algunas precauciones con los detectores electroquímicos para asegurar análisis reproducibles:

- Verificar que la bomba, el detector y registrador (integrador) estén conectados adecuadamente a tierra.
- Usar bombas reciprocantes
- Mantener en todo momento el flujo de la fase móvil en el detector.
- Operar con el voltaje adecuado
- Monitorear la altura de los picos para observar cambios en la eficiencia que nos indique la necesidad de reacondicionar los electrodos.
- Tener electrodos de referencias extras en solución 3M de NaOH y reemplazar el electrodo de referencia en la celda 1 ó 2 veces a la semana.
- Desconectar el detector electroquímico cuando se esté lavando la columna
- Utilizar agua, soluciones amortiguadoras y disolventes orgánicos de alta pureza.

3.3.5.6. Otros accesorios

A los equipos de cromatografía de líquidos se le han adaptado diversos accesorios, con el fin de obtener mejores resultados o de proteger al sistema.

Entre estos accesorios se encuentran los degasificadores en línea, que disminuyen la formación de burbujas en las bombas y en los detectores, evitando caídas de presión y ruido en la línea base respectivamente.

Para proteger la columna de posibles acumulaciones de partículas en su interior o en el frit, se emplean filtros en línea con tamaños de poro entre 0.2 y 0.5 micras, que filtran la muestra antes de entrar a la columna. Otro dispositivo que cumple la misma función es la guardacolumna que contiene material de empaque similar al de la columna y remueve componentes que se pudieran adsorber fuertemente al empaque de la columna.

Otro dispositivo que es muy recomendable utilizar son los controladores de temperatura para la columna, ya que estos mantienen una temperatura fija a la columna lo cual conduce a una mejor reproducibilidad en los tiempos de retención.

3.4. COMPUESTO DE INTERÉS

3.4.1. Nomenclatura⁷

3.4.1.1. Nombre químico

- 6-Deoxi-5β-hidroxitetraciclina hyclato

3.4.1.2. Nombres comerciales

Vibramicina, Doxilar, Doxatet..

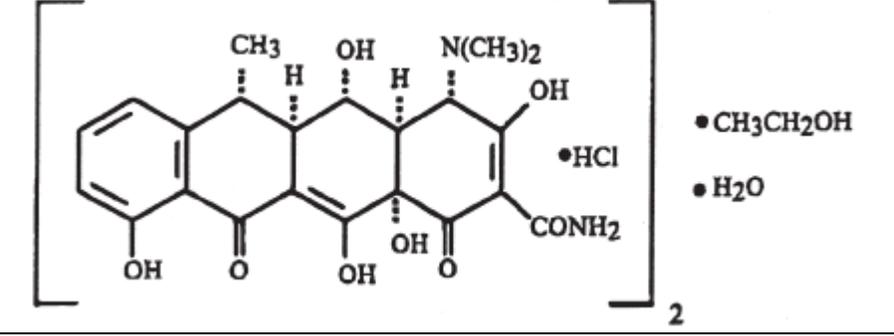
3.4.1.3. Número de registro CAS

24390-14-5 (hiclato de doxiciclina)

3.4.2. Fórmula, estructura y peso molecular⁷

La estructura, fórmula condensada y peso molecular del hyclato de doxiciclina se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Donde se muestra la estructura y peso molecular del hyclato de doxiciclina


Estructura del hyclato de doxiciclina
Formula condensada $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HCl, $\frac{1}{2} C_2H_5OH$, $\frac{1}{2} H_2O$ PM. 512.9 g/mol

3.4.3. Propiedades físicoquímicas⁷

El hclato de doxiciclina es un polvo cristalino de color ligeramente amarillo.

3.4.3.1. Solubilidad

El hclato de doxiciclina es soluble 1 en 3 partes de agua, 1 en 60 partes de etanol y 1 en 4 partes de metanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

3.4.3.2. Constantes de disociación

Las constantes de disociación para el hclato de doxiciclina se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Constantes de disociación del hclato de doxiciclina.

Constantes de disociación del hclato de doxiciclina	
pKa ₁	3.5
pKa ₂	7.7
pKa ₃	9.5

3.4.3.3. Coeficiente de partición

El coeficiente de partición del hclato de doxiciclina es LogP(octanol/pH7.5), -0.2

3.4.3.4. Espectro U.V.

El espectro de absorción de luz ultravioleta del hclato de doxiciclina se encuentra en la Figura 8.

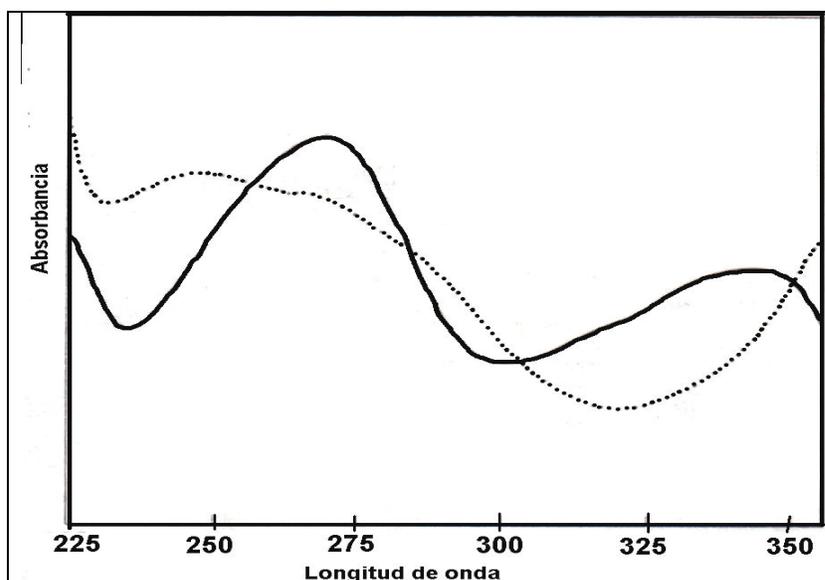


Figura 8. Espectro de absorción ultravioleta del hclato de doxiciclina

3.4.4. Técnicas y métodos de análisis para la cuantificación de doxiciclina en fluidos biológicos

Se han utilizado distintas técnicas para el análisis de doxiciclina en fluidos biológicos. Las técnicas microbiológicas son utilizadas para este fin, pero presentan la desventaja de no ser específicas y de presentar tiempos largos de análisis. Las técnicas fluorométricas y espectrofotométricas presentan gran sensibilidad, pero es muy común la presencia de interferencias durante el análisis. La cromatografía de líquidos de alta resolución presenta alta sensibilidad y especificidad además de que es capaz de realizar determinaciones en muy poco tiempo. En vista a esto, se han desarrollado distintos métodos cromatográficos que permiten la determinación y cuantificación de doxiciclina en fluidos biológicos (tabla 6).

Tabla 6. Métodos por CLAR para la cuantificación de doxiciclina en fluidos biológicos.

Columna	Condiciones cromatográficas	Matriz biológica	Procesamiento de la muestra	Límite de detección	Referencia
LiChrosorb RP-8	Acetonitrilo-ácido cítrico (24:76)	Orina y suero	Extracción con acetato de etilo y con buffer a pH 6.1	50ng/mL	8
Nucleosil C8	Acetonitrilo-NaH ₂ PO ₄ (pH 2.4, 3:7)	Orina, plasma y tejidos	Extracción con mezcla de acetonitrilo-NaH ₂ PO ₄ 0.01 M (pH 2.4, 1:1)	0.5 µg/mL	9
LiChrosorb RP-8	Metanol-Acetonitrilo-ácido oxálico 10mM (pH2.0) (1:1.5:2.5)	Tejidos	Extracción con buffer de McIlvaine (pH 4.0) conteniendo 0.1 M EDTA	0.05-0.1 ppm	10
LiChrospher RP-18	Acetonitrilo-agua-HCl (298.5:699:2.5, pH 2.5) conteniendo 0.6 mM Na ₂ EDTA y ácido oxálico 5 mM	Plasma	Extracción con acetato de etilo ajustando posteriormente el pH a 6.0	0.1 ppm	11
Hypersil C8 250x4.6mm, 5µm, 40°C	Ácido oxálico 10 mM-metanol-acetonitrilo (60:2515)	Leche y músculo	Extracción en fase sólida con cartuchos HLB Oasis	50 ng/mL	12
Hypersil ODS C18 100x4.6 mm,	50% Acetonitrilo en agua y 0.15% de ácido trifluoroacético.	Plasma	Extracción con cartuchos Oasis HLB	0.125 µg/mL	13
LiChrospher RP-18 125x4 mm, 5 µm	Agua.acetonitrilo-HClO ₄ al 70% (699:298.5:2.5) pH 2.5	Plasma de pavo	Extracción líquido-líquido con NaH ₂ PO ₄ y acetato de etilo y tratada posteriormente con hexano.	0.1 µg/mL	14

3.4.5. Farmacología

3.4.5.1. Mecanismo de acción

Las tetraciclinas se absorben fácilmente y se fijan a las proteínas del plasma en grado variable. La doxiciclina es fundamentalmente un bacteriostático y su efecto antimicrobiano se debe a que inhibe la síntesis de proteínas. La doxiciclina es activa contra una amplia gama de gérmenes gram positivos y gram negativos.¹⁷

Se une de manera definitiva a la subunidad 30S ribosómica, provocando inhibición de la síntesis de proteínas.

3.4.5.2. Farmacocinética y biodisponibilidad¹⁷

Las tetraciclinas se absorben fácilmente y se fijan a las proteínas del plasma en grado variable. Son concentradas por el hígado en la bilis y excretadas en la orina y heces en elevadas concentraciones y en forma biológicamente activa. Doxyciclina se absorbe prácticamente en su integridad después de administrarse por vía oral. Los estudios reportados hasta la fecha indican que la absorción de doxyciclina no se modifica notablemente por la ingestión de comida o leche a diferencia de lo que se observa con algunas otras tetraciclinas.

Después de la administración a adultos voluntarios normales de una dosis de 200 mg los niveles séricos alcanzan un máximo de 2.6 µg/ml de doxyciclina a las dos horas disminuyendo a 1.45 µg/ml al cabo de 24 horas. La excreción de doxyciclina por el riñón es aproximadamente de 40%/72 horas en individuos con función renal normal (eliminación de creatinina aproximadamente 75 ml/min). Este porcentaje de excreción puede reducirse a una velocidad tan lenta como 1-5%/72 horas en individuos con insuficiencia renal severa. Los estudios realizados han mostrado que no hay diferencia significativa en la vida media plasmática de doxyciclina (límites de 18-22 horas) en sujetos con función renal normal y en enfermos con función renal severamente alterada.

3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Una vez que se ha desarrollado o modificado un método analítico existente para cuantificar un fármaco y/o sus metabolitos en fluidos biológicos, se debe validar según NOM-177-SSA1-1998

La validación se realiza llevando a cabo una serie de experimentos que evalúan parámetros esenciales que aseguran la aceptabilidad en el desempeño del método. Estos parámetros son: estabilidad del analito en la matriz bajo condiciones de almacenamiento durante el estudio, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), selectividad, linealidad, robustez, límite de detección y cuantificación.

3.5.1. Parámetros de validación²

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se demuestra que el método es adecuado para la determinación cualitativa y cuantitativa del analito (o serie de analitos) en la matriz biológica en particular.

Rango: 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.

Recuperación absoluta: eficacia de un método analítico para cuantificar el o los compuesto por analizar en la muestra biológica.

Linealidad: Capacidad de un método analítico, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo.

Precisión: grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes concentraciones de una muestra homogénea, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad intralaboratorio: a la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

Exactitud: es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Estabilidad de la muestra: propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento de muestreo hasta su análisis.

Estabilidad a condiciones de almacenamiento: Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

Límite de cuantificación: concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Límite de detección: concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido.

Selectividad: 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.

Tolerancia: capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

3.6. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA¹⁶

Los estudios de bioequivalencia pretenden demostrar que dos formulaciones del mismo principio activo son terapéuticamente equivalentes y, por tanto, intercambiables. Constituyen la base para la autorización de la comercialización de los medicamentos genéricos, que son formulaciones del mismo principio activo con un precio bastante inferior a los fármacos de marca, siendo ésta la principal justificación de su existencia. En la mayoría de los casos, basta con demostrar que las concentraciones plasmáticas alcanzadas son similares a las que se alcanzan con el producto original. Se considera un producto innovador aquel que se ha autorizado y comercializado en base a un dossier completo que incluye datos químicos, biológicos, farmacéuticos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, tanto de eficacia como de seguridad. Para los estudios de bioequivalencia, éste debería ser el fármaco de referencia.

Debemos tener en cuenta que los estudios de bioequivalencia no se utilizan solamente para los medicamentos genéricos, sino que también son utilizados en muchas ocasiones por los laboratorios investigadores cuando se cambia la formulación.

Se entiende por *biodisponibilidad* la velocidad y la magnitud con la que un ingrediente activo es absorbido desde un producto farmacéutico y está disponible en el lugar de acción, y se suele calcular midiendo las concentraciones del fármaco en sangre ya que no suele ser posible medirlas en el lugar de acción. Habitualmente, como medida de la cantidad de fármaco absorbido se utiliza el área bajo la curva concentración-tiempo (ABC) y como indicador de la velocidad de absorción se mide la concentración máxima (C_{max}) alcanzada en la curva concentración-tiempo y el tiempo al que se alcanza (T_{max}) (ver figura 9).

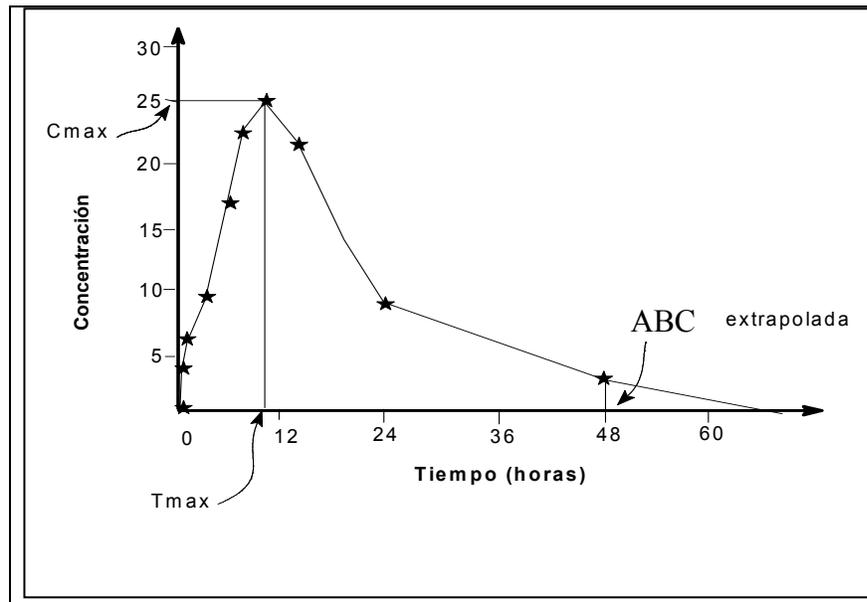


Figura 9. Curva concentración-tiempo de un fármaco

Dos presentaciones farmacéuticas que contienen el mismo principio activo, en la misma dosis, y en la misma forma farmacéutica son equivalentes farmacéuticos, y serían

bioequivalentes si producen el mismo efecto clínico terapéutico, pero esta equivalencia terapéutica es muy difícil de demostrar. Por este motivo, en la mayoría de los casos se acepta que cuando dos medicamentos son equivalentes en la velocidad y cantidad del fármaco activo que se absorbe y llega al tejido o área donde se produce su efecto, los dos medicamentos son terapéuticamente equivalentes y pueden usarse indistintamente. Es decir, si se produce la “equivalencia farmacocinética” se asume que la misma equivalencia existirá en el plano farmacodinámico y, lo que es más importante, en la eficacia terapéutica. Así, se entiende por *bioequivalencia* entre dos productos cuando presentan una biodisponibilidad comparable en condiciones experimentales apropiadas. De acuerdo a la normativa actual, NOM-177-SSA1-1998, para una gran variedad de fármacos, un intervalo de 80 a 120% para el cociente de los promedios de los productos es suficiente como criterio de equivalencia, cuando los datos del estudio se analizan en la escala original. Esto corresponde a un intervalo de $\pm 20\%$ para la diferencia relativa entre los promedios de los productos. Cuando los datos se transforman a su logaritmo, utilizando en el análisis ABC y $C_{m\acute{a}x}$ como criterio de equivalencia, se usa un intervalo de 80 a 125% para el cociente de los promedios².

No siempre es preciso realizar ensayos clínicos de biodisponibilidad y bioequivalencia para aceptar la bioequivalencia e intercambiabilidad de dos productos con la misma dosis, preparación y principio activo. De hecho, la propia Food and Drugs Administration (FDA) indica que no es factible ni deseable que se realicen estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para todos los fármacos.

Cuando un fármaco se administra por vía parenteral va a pasar a la circulación sistémica toda la dosis inyectada, ya que se administra disuelto y no requiere atravesar ninguna barrera, como en cambio sucede con algunos productos de administración oral. En este caso no se precisan los ensayos de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Aunque existen excepciones, tal como también reconoce la propia Food and Drugs Administration (FDA), los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia si se requerirán en el caso de preparados que se administren por vía oral y que necesiten liberarse y disolverse para que puedan absorberse en la pared gastrointestinal. Éste sería el caso de formas sólidas y dispersables que se tomen por esta vía, aunque, sin embargo, tampoco sería preciso realizar estos ensayos con productos que se administrarán en forma de solución.

Los estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia para fármacos que se administran por otras vías, como las inhalada, no se encuentran en la actualidad del todo definidos¹⁶.

Cuando se pretende realizar un estudio de bioequivalencia es necesario seguir los requisitos y procedimientos implantados por las autoridades sanitarias como la Food and Drugs Administration (FDA) en Estados Unidos de América y como la Secretaría de Salud en México. En caso de México corresponde a la Secretaría de Salud la regulación de estos estudios, a través de la norma NOM-177-SSA1-1998. Esta norma establece los criterios y requisitos que deben seguirse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a que se deberán sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR DOXICICLINA EN PLASMA.

Es necesario realizar una investigación bibliográfica con el fin de recaudar información acerca de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y sobre los métodos de análisis existentes para la cuantificación de doxiciclina en fluidos biológicos.

4.1.1. Selección de la matriz biológica y del intervalo de trabajo

El hielato de doxiciclina es la base en la formulación del medicamento, este se absorbe como doxiciclina y es una tetraciclina altamente estable en el suero humano y además de que se absorbe prácticamente en su integridad después de administrarse por vía oral¹⁷, y de que su unión a proteínas es elevado (80-95%), es adecuado el empleo de plasma humano, como matriz biológica para su cuantificación.

Tomando en cuenta que la doxiciclina presenta un C_{\max} reportado en bibliografía¹⁷ para la dosis de 200 mg de 2600 ng/mL, y considerando una farmacocinética lineal se espera que para una dosis de 100 mg, el C_{\max} sea de 1300 ng/mL, para alcanzar a caracterizar las cuatro vidas medias, que establece como mínimo la NOM-177-SSA1-1998, se requiere una concentración mínima cuantificable de 50 ng/mL y como nivel alto 3000 ng/mL.

4.1.2. Obtención de las condiciones cromatográficas

El siguiente paso del desarrollo del método es establecer las condiciones cromatográficas, consiste en la elección del método de detección, elección de la columna cromatográfica y de la fase móvil que resulten mas adecuadas en la cuantificación de la doxiciclina.

4.1.2.1. Condiciones de detección.

Considerando que la doxiciclina presenta en su molécula dobles enlaces conjugados, es factible su detección mediante espectrometría al UV. La molécula presenta dos máximos de absorción (260 y 350 nm)⁷. Se sabe que a 260 nm o cercanos a este valor la mayoría de los compuestos orgánicos pueden presentar absorción y debido a que en el plasma existen diversas sustancias endógenas que podrían interferir con la identificación y cuantificación de la doxiciclina se eligió la longitud de onda de 350 para la detección de la doxiciclina mediante UV.

4.1.2.2. Elección de la columna cromatográfica

La elección de la columna toma gran importancia, pues en esta se realiza la separación del analito de las demás sustancias de la matriz biológica. Una columna adecuada, debe de

suministrar picos resueltos y simétricos, que permitan cuantificar de manera apropiada al analito. Además de que debe presentar gran estabilidad a las condiciones de trabajo para así evitar la pérdida de eficiencia durante el transcurso del análisis.

Para poder realizar una correcta elección de la columna analítica es indispensable conocer las propiedades y características de la molécula con la que se trabajará, en el caso de la doxiciclina se conoce lo siguiente:

- Forma quelatos con cationes divalentes y trivalentes como Aluminio
- Presenta pKa de: 3.5, 7.7 y 9.5²⁰
- Presenta interacción irreversible con grupos silanol residuales presentes en fases estacionarias de columnas en fase reversa¹⁹

Se sugiere el empleo de una columna que presente alto grado de pureza y bajo contenido de metales en la sílica para evitar la formación de quelatos con metales que originan equilibrios secundarios.

Dado que la sílica presenta un pKa de alrededor de 3.5¹⁸, por encima de este valor los grupos silanol de la sílica se encuentran ionizados, lo cual genera un equilibrio secundario al interaccionar con el grupo amino de la molécula de la doxiciclina que se comporta como zwitterion a pH entre 3.5 a 7.7. Esto se ve reflejado en picos asimétricos (coleados). Una forma de disminuir esta interacción es con el empleo de columnas modificadas ya sea por sello terminal (endcapping) o por impedimento estérico hacia los grupos silanol residuales. También es posible evitar la ionización de los grupos silanol al trabajar a pH por debajo 3.0.

A pesar de que en el mercado existe una variedad de columnas con características que permiten cuantificar doxiciclina, se elige la columna C8 Agilent Zorbax SB, de 4.6 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud y 3.5 μm de tamaño de partícula, 80 Å de tamaño de poro, 180 m^2/g de área superficial y 5.5 % de carbono. Esta columna presenta la característica de proteger grupos silanol por impedimento estérico (ver figura 10) y de emplear un amplio rango de pH de trabajo (1-8). Además las dimensiones y el tamaño de partícula permiten obtener tiempos de corrida cortos y eficiencias elevadas. Por lo cual no fue necesario emplear columnas con otra tecnología que podrían elevar el costo en el método. El empleo de una guarda columna es necesario para proteger a la columna de partículas presentes en las muestras que podrían acumularse en ella y causar una pérdida de eficiencia.

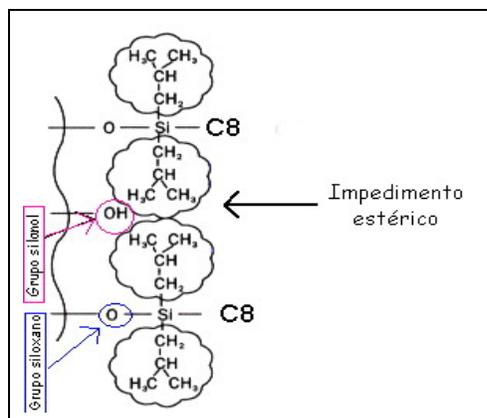


Figura 10. Tecnología empleada por Agilent Zorbax SB, en donde se muestra el impedimento estérico hacia los grupo silanol.

Con el fin de identificar y evaluar la forma del pico perteneciente a la doxiciclina empleando la columna analítica mencionada anteriormente, se inyectaron 10 μL de doxiciclina disuelta en fase móvil propuesta por Sharma y Bevil¹⁹ (metanol:buffer de fosfatos 10 mM pH 3.0, 40:60), a un flujo de 1 mL/min. En el cromatograma obtenido (ver figura 11), el pico perteneciente a la doxiciclina presentó coleo marcado y un ancho de pico mayor a 1 minuto, no obstante a lo anterior, la columna se considera adecuada, debido a que la concentración de doxiciclina inyectada era desconocida y muy concentrada, pues se preparó disolviendo la cantidad de hielato de doxiciclina, que abarcaba la punta de una espátula, con aproximadamente 1mL de fase móvil, lo cual se ve reflejado en los resultados obtenidos y se verán disminuidos al trabajar con las concentraciones del intervalo de trabajo.

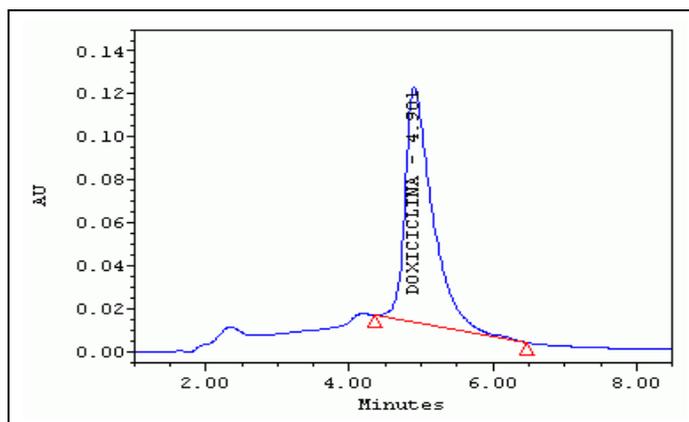


Figura 11. Cromatograma obtenido con columna zorbax SB C8. Fase móvil: metanol:buffer de fosfatos 10 mM pH 3.0 (40:60 v/v)

4.1.2.3. Elección de la fase móvil.

Para la elección de la fase móvil, se consideró la excelente solubilidad que presenta el compuesto de interés en medios ácidos y básicos, el pH de trabajo elegido fue de 2.0, pues la molécula presenta un pKa de 3.5 y por debajo de este pH se lleva a cabo la primera ionización de la molécula (se protona el grupo amino) y se asegura que el grupo silanol no se encuentre ionizado¹⁸. En la figura 12, se muestra los estados de ionización que presenta la molécula de ionización conforme se varía el pH²⁰.

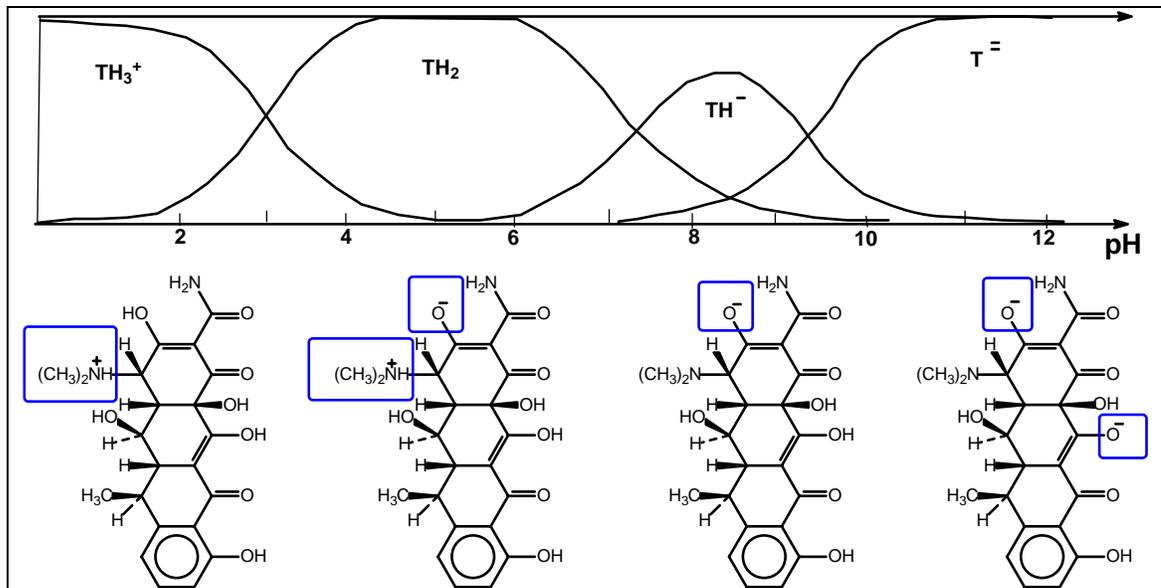


Figura 12. Estados de ionización de la doxiciclina a diferentes valores de pH

Los métodos reportados para la cuantificación de doxiciclina en plasma se caracterizan por emplear fases móviles conteniendo en la porción orgánica metanol o acetonitrilo y en la porción acuosa soluciones amortiguadoras con pH entre 2.0 y 4.0. En un principio se trabajó con una solución amortiguadora de fosfatos 10mM a un pH de 2.0. Posteriormente se encontró que en el artículo publicado por Hisao Oka²², en donde realizó un estudio en el cual encontró las condiciones adecuadas para el análisis de tetraciclinas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución llegando a las siguientes conclusiones:

- 1) Una fase móvil conteniendo ácido oxálico disminuye marcadamente el coeio de los picos de las tetraciclinas en comparación a otros ácidos (fosfórico, cítrico, tartárico, EDTA).
- 2) La resolución y simetría de los picos dependen del pH del ácido oxálico en la fase móvil y el óptimo es 2.0.
- 3) La resolución y simetría de las tetraciclinas incrementa conforme aumenta la concentración de ácido oxálico, se obtienen mejores resultados a un concentración de 0.01 M.

Considerando esta información se empleó ácido oxálico 10 mM a un pH de 2.0 en la fase móvil para optimizar los resultados. Los resultados mostraron que a este pH el ácido oxálico

actúa como reactivo de par iónico, se carga negativamente y se une al grupos amino de la doxiciclina que presentan carga positiva, haciendo que la retención y el factor de capacidad aumente de manera significativa, permitiendo una separación más efectiva que la que se obtendría sin la formación del par iónico, otra propiedad que tiene el ácido oxálico es que actúa como agente quelante de metales divalentes y trivalentes por lo que impide la formación de otro equilibrio secundario con metales presentes en el empaque de la columna. Ver figura 13.

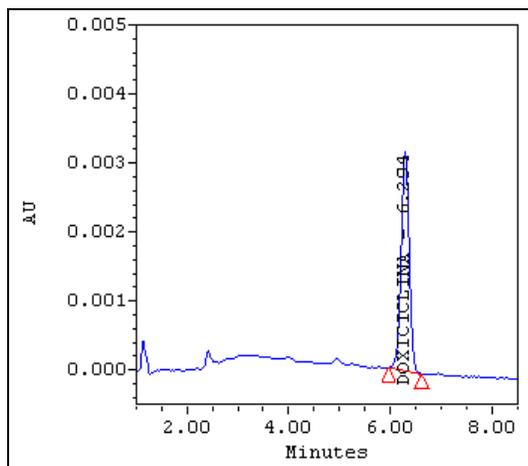


Figura 13. Picos característicos de la doxiciclina empleando fase móvil con ácido oxálico 10 mM, pH 2.0:Metanol (60:40 v/v)

4.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El fin que se persigue con el procesamiento de la muestra es obtener un procedimiento que permita separar la doxiciclina de los compuestos endógenos del plasma, para obtener una adecuada cuantificación de ésta en las muestras de un estudio clínico.

Para el procesamiento de la doxiciclina en plasma, se han descrito diversos métodos de extracción, pero estos involucran complejas extracciones, etapas que consumen gran cantidad de tiempo y además de que presentan grandes variabilidades en el grado de extracción. La ultrafiltración se descartó debido a que la doxiciclina se une entre un 80 y 95% a proteínas plasmáticas¹⁷, lo cual ocasiona un bajo recobro del analito. La alternativa con la que se optó consistió en un solo paso de desproteinización, con agentes que fueran capaces de romper la interacción de las proteínas con la doxiciclina.

La precipitación de proteínas puede llevarse a cabo con disolventes orgánicos y con ácidos. La precipitación con ácidos se descartó debido a que se sabe que la doxiciclina es inestable en muchos de los ácidos inorgánicos empleados para precipitar¹³, además de que forma epímeros reversibles a estas condiciones y los recobros obtenidos son muy pobres. En los métodos reportados en literatura, se utilizan disolventes orgánicos como metanol y acetonitrilo para precipitar las proteínas.

Considerando esta información se investigó cuáles son las condiciones óptimas para llevar a cabo la precipitación de proteínas plasmáticas, comparándose la eficiencia de precipitación y la limpieza de la muestra cuando se utiliza metanol, acetonitrilo y ácido perclórico en muestras de plasmas adicionadas con doxiciclina. El sistema cromatográfico empleado es el que se logró establecer anteriormente y consiste en: columna C8, Agilent Zorbax SB de 4.6mm de diámetro interno y 10 cm de longitud, 3.5 μ m de tamaño de partícula. La columna se mantiene a una temperatura de 35°C. La fase móvil es una mezcla de ácido oxálico 10mM pH 2.0:Metanol (60:40), a flujo de 1.0 mL/min, la longitud de onda de detección al UV fue a 350 nm.

Se confirmó el nulo recobro al emplear soluciones ácidas para precipitar proteínas en el plasma adicionado con doxiciclina (ver figura 14). Entre el acetonitrilo y el metanol, resulta mas conveniente el empleo de este último, pues con el acetonitrilo se obtienen muy altos recobros (alrededor del 90%), pero tiene el inconveniente de presentar una gran cantidad de compuestos endógenos los cuales interfieren con la doxiciclina, en tanto con el metanol el recobro obtenido es aproximadamente del 80% y la limpieza que se obtiene es mucha mayor que con el acetonitrilo. (Ver figura 15).

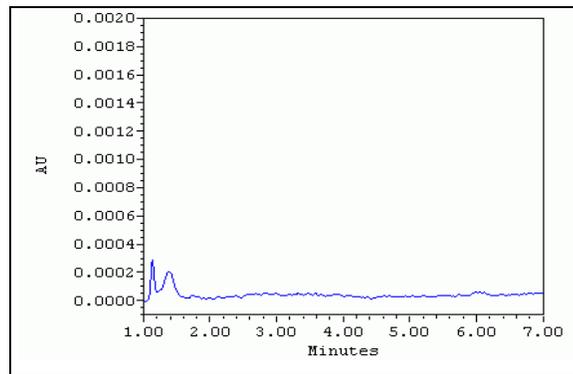


Figura 14. Cromatograma característico en los que se muestra el bajo recobro de doxiciclina al precipitar la muestra con ácido perclórico.

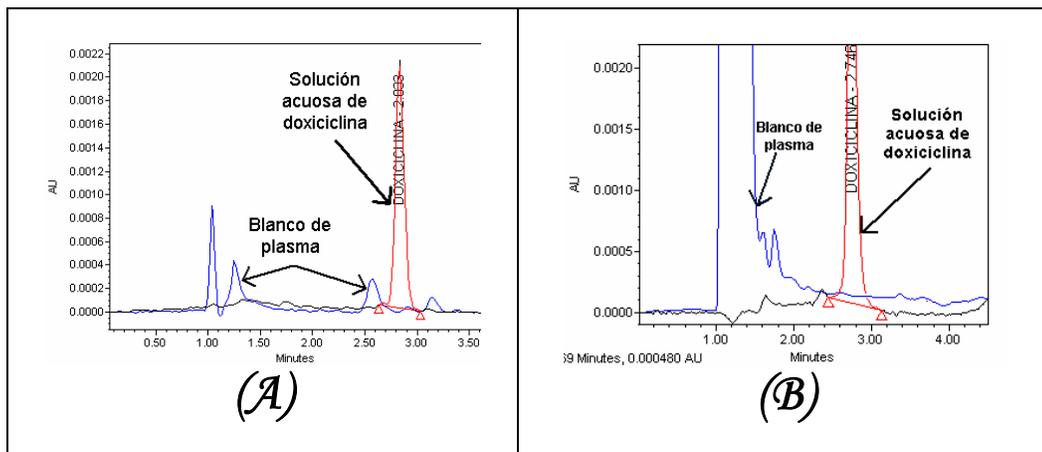


Figura 15. Cromatogramas sobrepuestos del blanco de plasma y de solución acuosa doxiciclina obtenidos al emplear: A)Acetonitrilo y B)Metanol en la limpieza de la muestra.

Una vez encontrado el disolvente óptimo para precipitar es necesario verificar que realmente el método de procesamiento de muestra contaba con la sensibilidad adecuada para cuantificar la concentración de doxiciclina más baja del rango establecido (50 ng/mL). Ver figura 16.

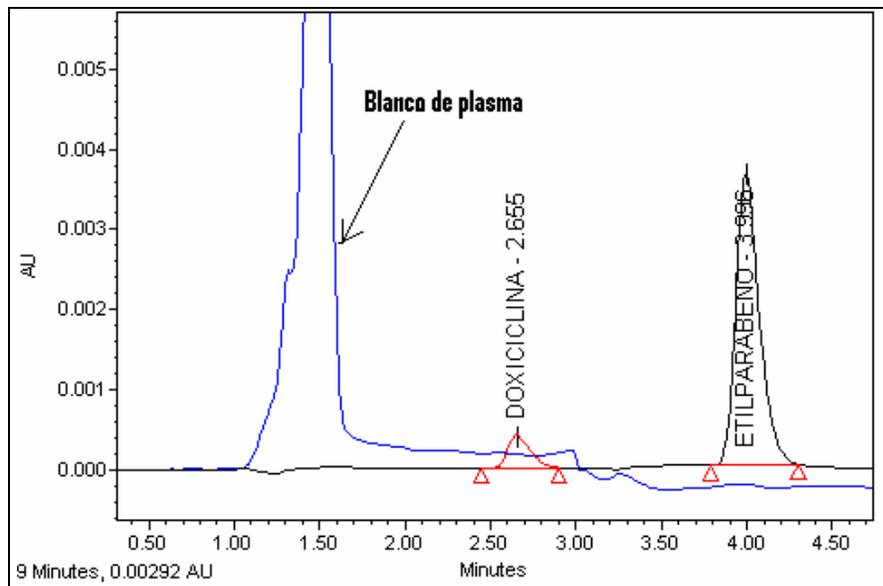


Figura 16. Cromatograma que muestra la concentración de doxiciclina más baja (50ng/mL) del rango de trabajo sobrepuesto en un blanco de plasma.

4.2.1. Selección del estándar interno

Un problema que generalmente aparece en estos estudios es el de la búsqueda de un estándar interno. Un estándar interno toma gran importancia, pues minimiza los errores que se pueden presentar en el procesamiento de la muestra y sirve como referencia interna para cuantificar con exactitud las concentraciones del fármaco estudiado.

Debido a la variabilidad que se obtenía en el recobro al emplear la precipitación de proteínas, fue necesario emplear un estándar interno, que fuera capaz de reducir los errores en la cuantificación de la doxiciclina. Para la selección del estándar interno, se evaluaron diferentes sustancias: oxitetraciclina, piroxicam, ciproheptadina y etilparabeno. De éstas, la que resultó más adecuada por el tiempo de retención que presenta en el sistema cromatográfico empleado, porque no interfiere con la doxiciclina o con sustancias endógenas provenientes del plasma, porque presentaba estabilidad en la matriz biológica y en las condiciones cromatográficas y finalmente porque puede extraerse con el método de limpieza establecido, con un recobro apropiado fue el ETILPARABENO (ver figura 17). En un principio se contaba con la oxitetraciclina como estandar interno, pero se encontró en literatura que ésta es un producto de degradación²⁰ de la doxiciclina, lo cual ocasionó que se descartara.

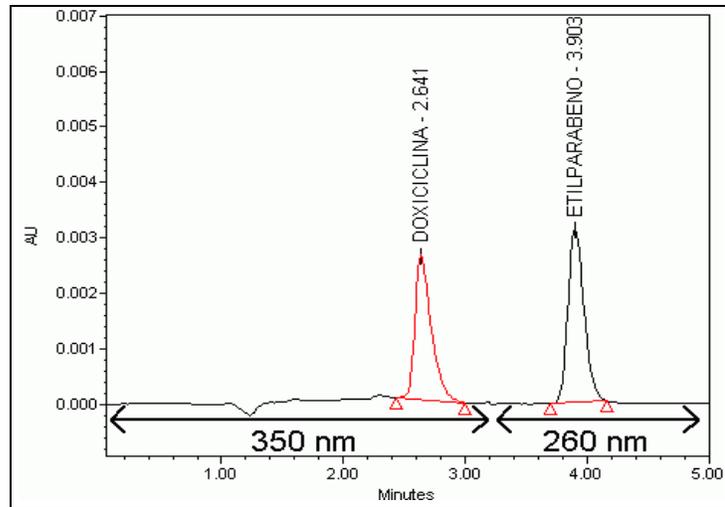


Figura 17. Cromatograma característico de la doxiciclina (1000 ng/mL) y del estándar interno (etilparabeno). Para la detección del estándar interno se realiza un cambio de longitud de onda a 260 nm.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Las condiciones cromatográficas y el método optimizado a emplear en la validación se describen a continuación:

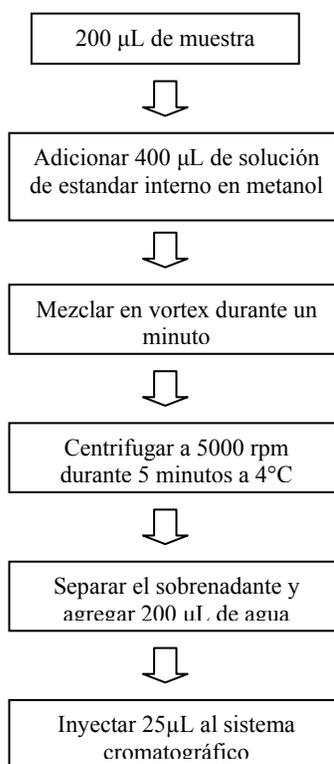
5.1. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas optimizadas son las siguientes:

Columna:	C8, Agilent Zorbax SB de 4.6mm de diámetro interno y 10 cm de longitud, 3.5 μ m de tamaño de partícula.
Flujo:	1.0 mL/min
Fase Móvil:	ácido oxálico 10mM pH 2.0:Metanol (48:52)
Longitud de onda:	350 y 260 nm para doxiciclina y estándar interno respectivamente.
Temperatura de la columna:	35 °C
Temperatura del automuestreador:	Temperatura ambiente
Volumen de inyección	25 μ L

5.2. Procesamiento de la muestra

La muestra antes de ser inyectada al sistema cromatográfico es sometida a un proceso de precipitación con metanol, como estándar interno se utiliza etilparabeno. En el siguiente diagrama se resume la metodología del procesamiento de la muestra:



5.3. Parámetros de validación evaluados

Con el propósito de contar con un método analítico confiable para la cuantificación de doxiciclina en plasma, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-1998², en el apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos. Las muestras cargadas con doxiciclina fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en el procedimiento desarrollado con excepción de las muestras designadas a selectividad. Los parámetros evaluados fueron los que se describen a continuación:

5.3.1. Selectividad

La selectividad se evaluó analizando 6 plasmas distintos de sujetos sanos y soluciones de cafeína, ácido salicílico y naproxén adicionados en muestras plasmáticas, y procesándolas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2 (con la variante de agregar 400 µL de metanol en lugar de 400 µL de solución de estándar interno en metanol), para comprobar que no existieran interferencias a los tiempos de retención pertenecientes a la doxiciclina y del etilparabeno (estándar interno).

5.3.2. Linealidad

La linealidad se evaluó mediante el procesamiento de tres curvas de calibración independientes y procesadas en distintos días.

Las concentraciones utilizadas para evaluar la linealidad fueron 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 3000 ng/mL de doxiciclina en plasma.

Para realizar el análisis de regresión se utilizó el método de los mínimos cuadrados tomando como variable independiente “X” al log de la concentración teórica y como variable dependiente “Y” al log de la respuesta (área relativa). Se realizó la curva y se obtuvo la ecuación de la recta, empleada para obtener la concentración de doxiciclina en plasma por interpolación de la respuesta.

$$\log(Y) = [m \times \log(X)] + b$$

Los criterios de aceptación para este experimento fueron que el coeficiente de determinación debe de ser mayor a 0.99 y que la diferencia entre la concentración teórica y la concentración obtenida estuviera dentro del $\pm 15.0\%$, excepto para el punto de 50 ng/mL, que podía tener una diferencia de hasta $\pm 20.0\%$ del valor nominal. En los tres días de análisis.

5.3.3. Precisión y exactitud

Los experimentos de precisión y exactitud se llevaron a cabo durante tres días, analizando muestras homogéneas de plasma adicionado, por quintuplicado, a tres concentraciones no incluidas en la curva (150, 1500 y 2500 ng/mL). La cuantificación se

realizó con una curva preparada a partir de pesada independiente y cargada en una matriz diferente a la de las muestras.

Para cumplir con el criterio de aceptación para la prueba de precisión, el coeficiente de variación de las replicas debió de ser menor al 15.0%, tanto por día, global y por nivel de concentración.

Para la exactitud el criterio empleado fue que las cuantificación de las replicas deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor real, tanto individual, global y por nivel de concentración.

5.3.4. Límite de detección

Esta prueba se realizó analizando por quintuplicado con el método propuesto, una dilución 2:1 con plasma a partir de una muestra adicionada de plasma a la concentración mínima cuantificable (50 ng/mL). Se obtienen los cromatogramas y se calcula la relación señal ruido para el pico de Doxiciclina. Se considera a la concentración de Doxiciclina en plasma como el límite de detección si la relación señal ruido se encuentra entre 1:2 a 1:4.

5.3.5. Límite de cuantificación

Se realizó analizando por quintuplicado el punto mas bajo de la curva (50 ng/mL) adicionado en el plasma, el criterio de aceptación es que el valor promedio de las cinco repeticiones se encontraba dentro del $\pm 20\%$ de la concentración nominal y el coeficiente de variación no mayor al 20%.

5.3.6. Estabilidad

5.3.6.1. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación

Se preparan soluciones de doxiciclina en plasma a concentraciones de 150, 1500 y 2500 ng/mL; estas muestras se sometieron a 3 ciclos de congelación a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación a temperatura ambiente. Al finalizar los ciclos, cada nivel de concentración se procesó por triplicado y las respuestas obtenidas fueron interpoladas en una curva patrón recién preparada, observándose que se cumplieran los parámetros establecidos para precisión y exactitud. Las muestras se consideran estables a ciclos de congelación-descongelación, si el por ciento de diferencia relativa entre la concentración cuantificada de las muestras con respecto a la concentración original antes de los ciclos se encuentran dentro del $\pm 15\%$ y el coeficiente de variación de la concentración obtenida no es mayor al 15%, en los tres niveles de concentración evaluados.

5.3.6.2. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección

Muestras de doxiciclina en plasma a 150, 1500 y 2500 ng/mL de concentración, se procesaron por quintuplicado para ser cuantificadas a las 0 y 48 horas después de permanecer en el inyector automático del cromatógrafo. La cuantificación se realizó sobre una curva patrón fresca, para determinar las variaciones ocurridas con el tiempo. Las

muestras se consideran estables durante 48 horas, si el promedio de las concentraciones obtenidas no difieren en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

5.3.6.3. Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente

Se preparan soluciones de doxiciclina en plasma a concentraciones de 150, 1500 y 2500 ng/mL. Antes de procesar se colocan sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente por un periodo de 6 a 8 horas. Transcurrido este tiempo se procesan por triplicado. Se considera la muestra estable durante el período en el cual la concentración obtenida no difiera $\pm 15\%$ de la concentración adicionada y se cumpla con los criterios de precisión y exactitud.

5.3.6.4. Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a largo plazo

Muestras de doxiciclina en plasma a 150, 1500 y 2500 ng/mL de concentración. Se almacenan durante 25 días a -40°C . Concluido este tiempo las muestras se procesan por triplicado y las respuestas obtenidas fueron interpoladas en una curva patrón recién preparada. Las muestras se consideran estables durante el almacenamiento si para cada nivel de concentración el promedio de las concentraciones obtenidas a cada tiempo de análisis no difieren en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero, y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

5.3.7. Recuperación absoluta

El recobro absoluto se evaluó a concentraciones de 150, 1500 y 2500 ng/mL. Para evaluar el recobro se prepararon por triplicado soluciones acuosas de doxiciclina a las concentraciones mencionadas y se inyectaron en la columna analítica. La respuesta promedio de las soluciones acuosas se utilizó para calcular el recobro de la doxiciclina y del estándar interno en el método. Así mismo se prepararon soluciones con plasma adicionado a las concentraciones mencionadas y se procesaron por triplicado. El recobro se calcula mediante comparación directa de las áreas de las muestras procesadas contra las áreas promedio de las soluciones acuosas (sin procesar).

Aun cuando no existe una especificación para la prueba de recobro absoluto es importante que el misma sea reproducible a lo largo del intervalo, ya que esto asegurara una respuesta lineal y será un indicativo de la reproducibilidad del método.

5.3.8. Tolerancia

5.3.8.1. Tolerancia a cambio de columna

Para evaluar la tolerancia al cambio de columna, se procesaron por triplicado muestras de doxiciclina en plasma a 150, 1500 y 2500 ng/mL de concentración. Se inyectan al cromatógrafo utilizando una columna de la misma marca y tipo a la empleada en los demás días de análisis, sólo que ésta contenía más de 1000 inyecciones de uso. Se considerará que el sistema es tolerante a cambio de columna, si el promedio de las concentraciones

obtenidas no difieren en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas en la condición original, y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

5.3.8.2. Tolerancia a reemplazo de guardacolumna por filtro en línea

Para evaluar esta tolerancia, se procesaron por triplicado muestras de doxiciclina en plasma a 150, 1500 y 2500 ng/mL de concentración. Se inyectan al cromatógrafo utilizando en el sistema cromatográfico un filtro en línea (espesor de 0.062 in, diámetro de 0.195 in y tamaño de partícula de 0.5 μm) en lugar de la guardacolumna (C18, Phenomenex, . Se considerará que el sistema es tolerante, si el promedio de las concentraciones obtenidas no difieren en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas en la condición original, y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Selectividad del método

Los seis blancos de plasma y los fármacos de uso concomitante adicionados en plasma no presentaron señal al tiempo de retención de la doxiciclina y del etilparabeno. En la figura 18 se muestran los cromatogramas característicos de los 6 blancos de plasma (C – H), blanco de reactivos (B) y los de los fármacos de uso común: Cafeína (I), Acido salicílico (J), Acetaminofén (K), comparadas contra el cromatograma obtenido de una solución de doxiciclina acuosa. No se observan interferencias que afecten en la cuantificación de la doxiciclina en plasma.

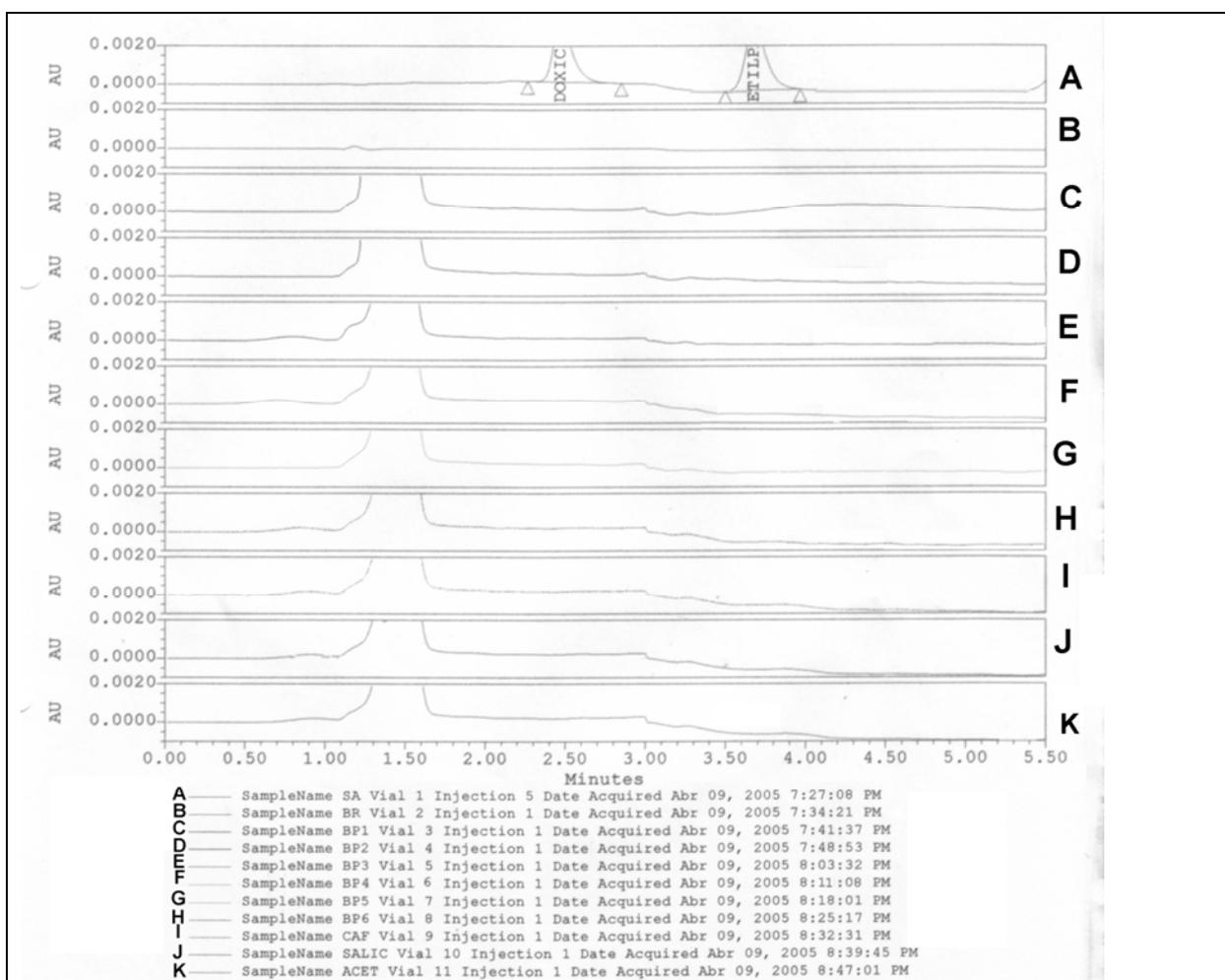


Figura 18. Cromatogramas representativos de Blanco de reactivos (B), Blancos de plasma provenientes de 6 diferentes sujetos (C - H), Fármacos de uso concomitante; Cafeína (I), Acido salicílico (J), Acetaminofén (K) comparados contra solución acuosa de Doxiciclina y etilparabeno (A).

6.2. Linealidad

Se encontró que el modelo que mejor explica la función respuesta es el de tipo log-log lineal. La Tabla 7 muestra los resultados estadísticos de regresión de las curvas patrón generadas durante los experimentos de precisión y exactitud. Se observa en ésta que existe consistencia de las curvas patrón generadas, obteniéndose en todas un coeficiente de determinación mayor al 0.99.

Tabla 7. Análisis de regresión de las curvas generadas en exactitud y precisión, para la cuantificación de doxiciclina en el intervalo de 50 a 3000 ng/mL

DIA	ORDENADA AL ORIGEN (a)	PENDIENTE (b)	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN
1	-3.097397	0.9829506	0.999638
2	-3.161870	1.0051110	0.999727
3	-3.113877	-0.9740243	0.999778

La tabla 8 resume las concentraciones obtenidas al interpolar las respuestas en cada día de análisis. La diferencia entre la concentración teórica y la concentración obtenida estuvieron dentro del $\pm 20\%$ para el punto más bajo de la curva y $\pm 15\%$ para el resto de los puntos de la curva, excepto para el punto de 500 ng/mL del día 2, que se atribuye a un error de tipo experimental, ya sea en el cargado de la muestra o en su procesamiento.

Tabla 8. Análisis de regresión de las curvas generadas durante los experimentos de exactitud y precisión, para la cuantificación de doxiciclina en el intervalo de 50 a 3000 ng/mL

CONCENTRACIÓN (ng/ml)	DIA	CONCENTRACIÓN OBTENIDA (ng/ml)	% DE DIFERENCIA
50.00	1	46.13	-7.7
50.00	2	46.79	-6.4
50.00	3	46.79	-6.4
100.00	1	104.13	4.1
100.00	2	104.34	4.3
100.00	3	103.67	3.7
250.00	1	276.08	10.4
250.00	2	272.82	9.1
250.00	3	272.97	9.2
500.00	1	488.48	-2.3
500.00	2	*	*
500.00	3	489.15	-2.2
1000.00	1	964.50	-3.6
1000.00	2	966.15	-3.4
1000.00	3	981.51	-1.8
2000.00	1	1930.49	-3.5
2000.00	2	1950.15	-2.5
2000.00	3	1952.86	-2.4
3000.00	1	3037.63	1.3
3000.00	2	3058.86	2.0
3000.00	3	3020.55	0.7

* Muestras perdidas durante el procesamiento

6.3. Precisión y exactitud

La Tabla 9 muestra en resumen los resultados obtenidos durante los tres días de análisis de precisión y exactitud. En los tres días de análisis los resultados cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos, ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a 15.0%, la diferencia de la concentración cuantificada promedio con respecto la teórica estuvieron dentro del $\pm 15.0\%$ en todos los casos. De igual forma los resultados globales también cumplieron con los criterios anteriormente descritos.

Tabla 9. Resumen de precisión y exactitud obtenidos en tres días de análisis.

Día de análisis		CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE DOXICICLINA (ng/mL)		
		150.0	1500.0	2500.0
DIA 1	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	128.0	1700.0	2615.0
		162.0	*	2471.0
		140.0	1651.0	2504.0
		136.0	1501.0	2478.0
		*	1655.0	2589.0
	PROMEDIO	141.5	1627.0	2531.0
	D.E.	14.55	86.73	66.25
C.V.	10.3	5.3	2.6	
% DIFERENCIA	5.67	8.45	1.26	
DIA 2	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	164.0	1492.0	2451.0
		161.0	1498.0	2508.0
		161.0	1510.0	2418.0
		157.0	1486.0	2500.0
		166.0	1523.0	2450.0
	PROMEDIO	161.8	1502.0	2465.0
	D.E.	3.42	14.81	37.76
C.V.	2.1	1.0	1.5	
% DIFERENCIA	7.87	0.12	1.38	
DIA 3	CONCENTRACIÓN OBTENIDA	139.0	1611.0	2725.0
		139.0	1594.0	2669.0
		132.0	1556.0	2641.0
		*	1600.0	2613.0
		137.0	1628.0	2663.0
	PROMEDIO	136.8	1598.0	2662.0
	D.E.	3.30	26.71	41.41
C.V.	2.4	1.7	1.6	
% DIFERENCIA	8.83	6.52	0.03	
RESULTADOS GLOBALES	PROMEDIO	147.8	1572.0	2553.0
	D.E.	13.90	63.61	96.53
	C.V.	9.4	4.0	3.8
	% DIFERENCIA	1.44	4.79	2.12

* Muestras perdidas durante el procesamiento

6.4. Límite de detección

Se determinó como límite de detección la concentración de 25 ng/mL ya que con esta concentración se observa una respuesta que es de 3 veces mayor al ruido cromatográfico. Ver figura 19.

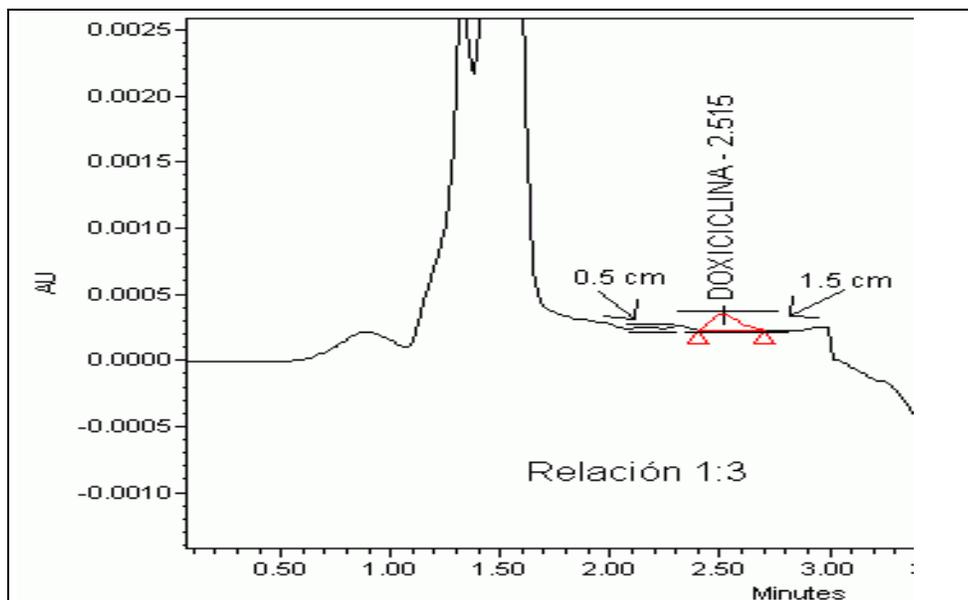


Figura 19. Cromatograma en donde muestra la concentración mínima de doxiciclina detectable en plasma.

6.5. Límite de cuantificación

Se estableció como límite de cuantificación la concentración de 50 ng/mL, pues como se observa en la tabla 10, esta concentración cumple con los criterios de precisión y exactitud, es decir, en ningún caso se observó un coeficiente de variación mayor al 20% y la concentración cuantificada promedio estuvieron dentro del $\pm 20\%$ de la concentración nominal.

Tabla 10. Valores obtenidos en la determinación del límite de cuantificación

Concentración teórica (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% Desviación
50	53	6.11
50	49	-1.96
50	50	-0.79
50	51	1.34
50	52	4.58
Promedio	51	
D.E.	1.72	
C.V.	3.4	

6.6. Estabilidad

6.6.1. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad de la muestra al ser sometida a 3 ciclos de congelación-descongelación, antes de ser procesada.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación a -40°C

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LOS CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ng/mL):	139.0	1442.0	2417.0
	137.0	1469.0	2468.0
	142.0	1392.0	2451.0
PROMEDIO	139.3	1434.0	2445
D.E.	2.52	39.07	25.97
C.V.	1.8	2.7	1.1
% DIFERENCIA	1.53	11.83	3.40

Los resultados demuestran que las muestras son estables después de ser sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación, ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a 15.0% y la diferencia de la concentración cuantificada promedio con respecto a la teórica estuvieron dentro del $\pm 15.0\%$ en los tres niveles de concentración.

6.6.2. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en la estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección. Cumpliendo con los criterios de precisión y exactitud establecidos, ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a 15.0% y la diferencia de la concentración cuantificada promedio con respecto a la teórica estuvieron dentro del $\pm 15.0\%$ en los tres niveles de concentración.

Tabla 12. Resultados obtenidos en la estabilidad en el disolvente de reconstitución después de 48 horas.

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LA ESTABILIDAD (ng/mL):	140.0	1552.0	2564.0
	144.0	*	2506.0
	133.0	1560.0	2616.0
	148.0	1528.0	2527.0
	*	1518.0	2579.0
PROMEDIO	141.3	1540.0	2558.0
D.E.	6.40	19.76	43.32
C.V.	4.5	1.3	1.7
% DIFERENCIA	0.18	5.36	1.07

* Muestras perdidas durante el procesamiento.

6.6.3. Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en la estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. Se observa que las muestras son estables durante 8 horas sin ser procesadas a temperatura ambiente, esto debido a que cumplen con los criterios propuestos para la precisión y la exactitud ya que el por ciento de diferencia relativa entre la concentración cuantificada de las muestras con respecto a la concentración original antes de los ciclos se encuentran dentro del $\pm 15\%$ y el coeficiente de variación de la concentración obtenida por concentración no es mayor al 15%, no obstante se aprecia una caída en la concentración, lo cual indica que posterior a este tiempo, no se asegura la estabilidad de la muestra.

Tabla 13. Resultados obtenidos en la estabilidad en la mesa de trabajo después de 8 horas a temperatura ambiente.

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LA ESTABILIDAD (ng/mL):	132.0	1522.0	2304.0
	*	1509.0	2268.0
	130.0	1502.0	2234.0
PROMEDIO	131.0	1511.0	2269.0
D.E.	1.41	10.15	35.00
C.V.	1.1	0.7	1.5
% DIFERENCIA	7.42	7.12	10.38

* Muestras perdidas durante el procesamiento.

6.6.4. Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a largo plazo

No se encontró diferencia significativa en los valores de concentración obtenidas inicialmente con los obtenidos después de que las muestras fueran almacenadas durante 25 días a -40°C . Lo cual indica que la muestras son estables. Ver tabla 14.

Tabla 14. Resultados obtenidos en la estabilidad en condiciones de almacenamiento durante 25 días a -40°C .

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LA ESTABILIDAD (ng/mL):	144.0	1586.0	2656.0
	147.0	1432.0	2640.0
	143.0	1553.0	2736.0
PROMEDIO	144.7	1524.0	2677.0
D.E.	2.08	81.08	51.43
C.V.	1.4	5.3	1.9
% DIFERENCIA	2.24	6.34	5.76

6.7. Recuperación absoluta

Los resultados obtenidos en el recobro absoluto promedio para la doxiciclina y del estándar interno (etilparabeno), se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 15. Recobro absoluto de la doxiciclina a tres concentraciones dentro del intervalo establecido.

Concentración (ng/mL)	Área promedio soluciones acuosas	Área promedio soluciones en plasma	% de recobro absoluto	% de diferencia respecto al promedio
150	4327	3352	77.47	-5.76
1500	42688	34716	81.32	-1.01
2500	66798	58560	87.67	6.71
Promedio.			82.15	
D.E.			5.15	
C.V.			6.30	

Tabla 16. Recobro absoluto del estándar interno (etilparabeno) a tres concentraciones dentro del intervalo establecido.

Concentración (ng/ml)	Área promedio soluciones acuosas	Promedio global del área de las soluciones acuosas	Área promedio en plasma (global)	% de recobro absoluto
150	42310	40484	32010	79.07
1500	42109			
2500	37033			

6.8. Tolerancias

6.8.1. Tolerancia a cambio de columna

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la tolerancia al cambio de columna. En los tres niveles se observa que se cumple con los criterios de aceptación establecidos anteriormente.

Tabla 17. Resultados obtenidos en la tolerancia al cambio de columna durante el análisis.

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LA TOLERANCIA (ng/mL):	159.0	1609.0	2642.0
	155.0	1572.0	2651.0
	*	1628.0	2674.0
PROMEDIO	157.0	1603.0	2655.7
D.E.	2.83	28.48	16.50
C.V.	1.8	1.8	0.6
% DIFERENCIA	10.95	1.46	4.91

* Muestras perdidas durante el procesamiento.

6.8.2. Tolerancia a reemplazo de guardacolumna por filtro en línea

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la tolerancia al momento de reemplazar una guardacolumna por un filtro en línea, los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos para aceptar la tolerancia.

Tabla 18. Resultados obtenidos en la tolerancia al reemplazo de guardacolumna por un filtro en línea.

	Nivel 1 (150 ng/mL)	Nivel 2 (1500 ng/mL)	Nivel 3 (2500 ng/mL)
CONCENTRACIÓN DE DOXICICLINA OBTENIDA INICIALMENTE (ng/mL):	141.5	1627.0	2531.0
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DOXICICLINA AL FINAL DE LA TOLERANCIA (ng/mL):	144.0	1586.0	2656.0
	147.0	1432.0	2640.0
	143.0	1553.0	2736.0
PROMEDIO	144.7	1523.7	2677.3
D.E.	2.08	81.08	51.43
C.V.	1.4	5.3	1.9
% DIFERENCIA	2.24	6.34	5.76

7. CONCLUSIONES

Considerando las características y propiedades fisicoquímicas de la molécula del hclato de doxiciclina se consiguió desarrollar un método analítico que lograra cuantificar doxiciclina por cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando etilparabeno como estándar interno.

Este método es capaz de proporcionar las condiciones cromatográficas y de limpieza de muestra que permiten separar la doxiciclina de los compuestos endógenos del plasma, obteniéndose así una adecuada cuantificación de la doxiciclina, con un recobro alrededor de 82% y de 79% para la doxiciclina y el estándar interno respectivamente como se muestra en los resultados de la sección 6.7. de los resultados.

La cuantificación de doxiciclina puede llevarse a cabo sin que existan interferencias de compuestos endógenos del plasma, de los reactivos utilizados y de fármacos que pueden ser administrados de forma concomitante como: cafeína, naproxeno y ácido salicílico como se puede observar en los cromatogramas de la figura 18 en la sección 6.1 de los resultados.

El método cumple con los criterios de exactitud y precisión, y se comporta de forma lineal en el intervalo de 50 a 3000 ng/mL. Lo cual se comprobó en las secciones 6.2. y 6.3. de los resultados.

La doxiciclina puede ser cuantificada de manera confiable a la concentración de 50 ng/mL y puede llegar a ser detectada a una concentración de 25 ng/mL, mediante este método de análisis (ver resultados de las secciones 6.4 y 6.5).

Con respecto a la estabilidad, se encontró que las muestras son estables a 3 ciclos de congelación-descongelación, al almacenamiento durante 25 días a -40°C , y también a soportar 8 horas en la mesa de trabajo a temperatura ambiente y después de 48 horas en el inyector en el disolvente de inyección a temperatura ambiente, que son las condiciones a las que se pueden exponer las muestras durante un estudio de Bioequivalencia (ver resultados de la sección 6.6).

Finalmente se encontró que el método es tolerable al cambio de columna analítica y al reemplazo de la guardacolumna por un filtro en línea, como se puede observar en la sección 6.8 de los resultados.

8. APENDICE

8.1.1. Sustancia de Referencia

Hiclato de doxiciclina. Cosufar. Lote: 30703

8.1.2. Reactivos

Tabla 19. Reactivos utilizados.

Reactivo	Marca	Grado
Agua	-----	HPLC
Acetonitrilo	Fermont	HPLC
Metanol	Fermont	HPLC
Oxalato de Sodio	J. T. Baker	RA
Ácido clorhídrico	J. T. Baker	RA ACS
Cafeína	NA	USP
Acetaminofén	NA	Materia prima
Ácido salicílico	NA	COSUFAR
Etilparabeno	NA	EP

8.1.3. Equipo

Tabla 20. Equipo cromatográfico empleado

Equipo	Marca	Modelo
Bomba	Waters	1525
Automuestrador	Waters	717 Plus
Detector UV Dual	Waters	2487
Programa de procesamiento de datos Millenium 32.	Waters	Versión 3.20

Tabla 21. Equipo auxiliar empleado

Equipo	Marca	Modelo
Balanza Analítica	Mettler	AE 260
Ultramicrocentrifuga	Hettich	Mikro 22
Potenciómetro	Beckman	Φ 45
Ultracongelador	Nuaire	UN / 6512Gkl
Refrigerador	Revco	REC5004A18
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	-----
Microbalanza	Mettler	UTM2

Tabla 22. Columna analítica empleada

Marca	Características
Agilent Zorbax SB	RP C8, 100 *4.6 mm DI y 3.5µm de tamaño de partícula, 80 Å de tamaño de poro, 180 m ² /g de área superficial y 5.5 % de carbono.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids en Analysis of Drugs in Biological Fluids. USA. CRC Press. 1987: 25-31.
- ² NOM-177-SSA1-1998. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a los que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial 05-07-1999.
- ³ Gábor, Szepesi. HPLC in pharmaceutical analysis. Vol. 1. General considerations. USA. CRC Press. 1990: 250-258.
- ⁴ Ray H. Liu. Handbook of drug analysis. Applications in forensic and clinical laboratories. American Society. USA. 1997: 17-49.
- ⁵ Hernández, Lucas. Introducción al análisis instrumental. Editorial Ariel. S.A. España 2002. 393 – 426.
- ⁶ Skoog, Douglas. Principios de análisis instrumental. 5ª edición. Mc GrawHill. España. 1992: 785 – 812.
- ⁷ Moffat. A. Clarke's. Isolation and identification of drugs 2a edición. The pharmaceutical society of Great Britain. Londres. 1986 Pag. 375-376.
- ⁸ A.P. Leenheer, H.J.C.F. Nelis, Journal of chromatography. 195 (1980) 35.
- ⁹ R. Bocker, Journal of Chromatography. 187 (1980) 439.
- ¹⁰ H. Oka, h. Matsumoto, K. Uno, K.I. Harada, S. Kadowaki, M. Suzuki, Journal of chromatography. 325 (1985) 265.
- ¹¹ M.D.F. Santos, H.Vermeersch, Journal of Chromatography B. 682(1996) 301.
- ¹² A.L. Cinquina, F.Longo. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. Journal of chromatography A, 987(2003) 227-233
- ¹³ B. Axisa, A.R. Naylor. Simple and reliable meted of doxycycline determination in human plasma and biological tisúes. Journal of chromatography B. 744(2000) 359-365.
- ¹⁴ M.D.F. Santos, H. Vermeersch. Validation of a high-performance liquid chromatographic meted for the determination of doxycycline in turkey plasma. Journal of chromatography B, 682(1996) 301-308.
- ¹⁵ Drug Informatio for the health Care Professional. Vol.1. Thomson 2004. 2641-2643.

- ¹⁶ Abad, Francisco. Martínez Esther. estudios de bioequivalencia: analisis y aspectos metodologicos. Serie científica, Madrid. Farmaindustria, 2001 Pag. 69-80.
- ¹⁷ PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 50ª edición. México 2004. 3171 – 3173
- ¹⁸ <http://www.mac-mod.com/tr/07031-tr.html>. Technical report “Correcting Peak Tailing Problems in Reversed Phase HPLC”. **MAC-MOD Analytical, Inc**
- ¹⁹ J.P. Sharma and R.F. Bevill, Journal of chromatography, 166 (1978) 213.
- ²⁰ Knox, John and Jurand, Jadwiga. Mechanism of reversed-phase separation of tetracycline's by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 186 (1979) 763-782.
- ²¹ S. Skulason. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 33 (2003). 667-672.
- ²² Hisao Oka, Yuko Ito. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. Journal of chromatography A, 882(2000) 109-133
- ²³ S. croubels, H. V Vermeersch. Liquid chromatographic of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys. Journal o chromatography B. 708 (1998) 145-152.
- ²⁴ Pilar Viñas, Nuria Balsalobre. Liquid chromatography with ultraviolet absórbanse detection for the análisis of tetracycline residues in honey. Journal of chromatography A, 1022 (2004) 125-129.
- ²⁵ Kazuo Iwaki. Rapid determination of tetracycline antibiotics in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of chromatography, 619(1993) 319-323.
- ²⁶ A.L. Cinquina. Validation of a high-performance liquid chromatography meted for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. Journal of chromatography A, 987(2003) 227-233.
- ²⁷ W.a. moats. Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 358(1986) 353-259.
- ²⁸ Hisao Oka and Keiichi Uno. A simple method for the analysis of tetracyclines using reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, 298(1984) 435-443.
- ²⁹ Noelia Ruz, Maider Zabala. Rapid determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography aplication to particulate drug delivery systems. Journal of chromatography A, 1031(2004) 295-301.

³⁰ John H. Knox and Jadwiga Jurand. Mechanism of reversed-phase separation of tetracycline by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 186(1979) 763-782.