
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)
PARA CUANTIFICAR MUESTRAS DE 17- β ESTRADIOL Y
PROGESTERONA PROVENIENTES DE PERFILES DE
DISOLUCIÓN”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

JORGE ISAAC ARANDA GARCIA

MEXICO D. F.

2011



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: PEDRO VILLANUEVA GONZALEZ
Vocal: HELGI HELEN JUNG COOK
Secretario: ERNESTO ORTEGA ESCAMILLA
1er. Suplente MINERVA CARRASCO FUENTES
2do. Suplente INES FUENTES NORIEGA

Sitio donde se desarrollo el tema:

Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, S.A.
Departamento de Biofarmacia
Nicolás San Juan No. 1024, Col del Valle,
C.P. 03100, México D.F.

Asesor del Tema: _____
M. en F. Ernesto Ortega Escamilla

Supervisor Técnico: _____
Dra. Inés Fuentes Noriega

Sustentante: _____
Jorge Isaac Aranda García

DEDICATORIAS

A mis padres Isaac Aranda Ledesma y Rosa Ma. García Luna
que con su amor y apoyo me han impulsado a alcanzar una meta muy importante en mi vida.

A mis hermanos Jacobo Aranda García y Raquel Aranda García
por su apoyo, cariño y ayuda incondicional.

A toda la freakcrasia (Mao, Gran K, Ninio, Omaru, José, Neo, Rot, Manchas, Wigui y Galletto) por su ayuda, comprensión y freakess incondicional.

A mis amigos y compañeros del departamento de Biofarmacia del complejo E, (Dra Inés, Robert, Mayra, Alberto, Kennet, Lupita y Mirna)

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en específico a la Facultad de Química por la educación recibida y en especial a la Dra. Inés Fuentes Noriega por su enseñanza y orientación.

Al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, S.A: por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo, en especial a la M. en F. Ma. Teresa Francisco Doce y al M. en F. Ernesto Ortega Escamilla por la oportunidad, enseñanza y apoyo que me brindaron para la realización del presente trabajo y a todo el equipo de trabajo del Departamento de Biofarmacia y Analítica por su apoyo y buenos consejos.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Antecedentes.....	2
Objetivo	2
GENERALIDADES.....	3
Hormonas Esteroideas.....	3
CROMATOGRAFIA.....	19
Introducción	19
Clasificación Cromatográfica.....	19
Tipos de Cromatografía	19
Cromatografía Líquida	21
Parámetros Cromatográficos.....	22
Equipo Cromatográfico.....	27
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	36
Elementos Requeridos para la Prueba de Validación.....	36
PARAMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO.....	37
PARTE EXPERIMENTAL.....	39
Equipo, Reactivos y Sustancias de Referencia.....	39
Trabajo Previo.....	40
Desarrollo del Método.....	43
VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	50
SISTEMA.....	50
Linealidad.....	50
Precisión.....	50
METODO.....	51
Linealidad.....	51
Exactitud.....	52
Precisión.....	52
Repetibilidad.....	52
Reproducibilidad.....	52
Estabilidad Analítica de la Muestra.....	53
Temperatura Ambiente.....	53
Refrigeración.....	53
Especificidad.....	53
Robustez.....	53
RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
SISTEMA.....	55
Linealidad.....	55
Precisión.....	57
METODO.....	58
Linealidad.....	58
Exactitud.....	61
Precisión.....	62
Repetibilidad.....	62
Reproducibilidad.....	63

Especificidad.....	65
Estabilidad de las Muestras.....	67
Temperatura Ambiente.....	67
Refrigeración.....	69
Robustez.....	70
Cambio de Fase Móvil (Acetonitrilo : Agua 25:75).....	70
Cambio de Velocidad de Flujo (0.68 mL/min)	72
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA.....	75

INDICE DE TABLAS

1	Aplicaciones características de la cromatografía de líquidos de alta resolución.....	21
2	Calculo de N	25
3	Parámetros Analíticos de Validación	36
4	Condiciones de Fase Móvil y Flujo.....	45
5	Condiciones de Atenuación y Ganancia.....	47
6	Curva Patrón.....	50
7	Muestras Adicionadas para la Prueba de Linealidad del Método.....	51
8	Muestras para la prueba de Reproducibilidad.....	52
9	Linealidad del Sistema para 17- β Estradiol Intervalos 2 – 800 ng/mL.....	55
10	Linealidad del Sistema para Progesterona Intervalos 20 – 8000 ng/mL.....	56
11	Precisión del Sistema para el 17 β -Estradiol.....	58
12	Precisión del Sistema para Progesterona.....	58
13	Linealidad del Método para 17 β -Estradiol.....	59
14	Linealidad del Método para Progesterona.....	60
15	Exactitud y Repetibilidad del Método para 17 β -Estradiol.....	62
16	Exactitud y Repetibilidad del Método para Progesterona.....	63
17	Reproducibilidad del Método para 17 β -Estradiol.....	63
18	Reproducibilidad del Método para Progesterona.....	64
19	Estabilidad de Muestras de 17 β -Estradiol (Temperatura Ambiente).....	68
20	Estabilidad de Muestras de Progesterona a (Temperatura Ambiente).....	68
21	Estabilidad de Muestras de 17 β -Estradiol (Refrigeración).....	69
22	Estabilidad de Muestras de Progesterona (Refrigeración).....	70
23	Robustez del Método para cuantificar 17 β -Estradiol (Cambio de Fase Móvil).....	71
24	Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar 17 β -Estradiol (Cambio de Fase Móvil).....	71
25	Robustez del Método para cuantificar Progesterona (Cambio de Fase Móvil).....	71
26	Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar Progesterona (Cambio de Fase Móvil).....	72
27	Robustez del Método para cuantificar 17 β -Estradiol (Cambio de Flujo 0.68 mL/min).....	72
28	Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar 17 β -Estradiol (Cambio de Flujo 0.68 mL/min).....	72
29	Robustez del Método para cuantificar Progesterona (Cambio de Flujo 0.68 mL/min).....	73

30	Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar de Progesterona (Cambio de Flujo 0.68 mL/min).....	73
----	---	----

INDICE DE FIGURAS

1	Estructura desarrollada del Estradiol.....	3
2	Espectro Ultravioleta del Estradiol en solución metanol-agua 2% (v/v).....	5
3	Ruta biosintética de los Estrógenos y Progestagenos a partir de Colesterol.....	7
4	Estructura desarrollada de la Progesterona.....	13
5	Espectro Ultravioleta de la Progesterona en alcohol deshidratado.....	14
6	Clasificación Cromatográfica.....	20
7	Tipos de Cromatografía.....	21
8	Cromatograma tipo de una separación de muestras.....	22
9	Resolución Mínima.....	23
10	Ancho del pico empleado para el cálculo de N.....	25
11	Compactamiento de las partículas dentro de una columna.....	26
12	Grafico de tipo Van Deemter.....	27
13	Esquema representativo de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	28
14	Esquema de un Monocromador.....	31
15	Esquema de un Fotomultiplicador.....	32
16	Esquema de un Espectrofotómetro de Florescencia.....	33
17	Grupos funcionales presentes en la columna Phenomenex Phenyl Hexyl.....	44
18	Linealidad del Sistema para 17-β Estradiol (Intervalo de 2 – 800 ng/mL).....	57
19	Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo de 20 – 8000 ng/mL).....	57
20	Linealidad del Método para 17-β Estradiol (Intervalo de 2 – 800 ng/mL).....	61
21	Linealidad del Método para Progesterona (Intervalo de 20 – 8000 ng/mL).....	61

INDICE DE CROMATOGRAMAS

1	17-β Estradiol 5 ng/mL (Método Analítico 2).....	41
2	17-β Estradiol 10 ng/mL (Método Analítico 2).....	41
3	Progesterona 50 ng/mL (Método Analítico 2).....	41
4	Progesterona 100 ng/mL (Método Analítico 2).....	42
5	Metilparabeno (Método Analítico 3).....	43
6	Manitol (Método Analítico 3).....	43
7	Propilparabeno (Método Analítico 3).....	43
8	17-β Estradiol 5 ng/mL (Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm).....	45
9	Progesterona 50 ng/mL (Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3μm).....	45
10	Vehiculo (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 065 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm).....	46
11	17-β Estradiol 5 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm).....	46
12	Progesterona 50 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65mL/min Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm).....	46

13	17-β Estradiol 2 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm, Atten 128, Gain 100, 35 °C).....	48
14	17-β Estradiol 2 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm, Atten 128, Gain 100, 80 μL, 35 °C).....	48
15	17-β Estradiol 2 ng/mL.....	49
16	Progesterona 20 ng/mL.....	49
17	Fase Móvil Acetonitrilo/ Agua (30:70) [Especificidad para 17-β Estradiol].....	66
18	Solución Tween 80 al 0.3% [Especificidad para 17-β Estradiol].....	66
19	Vehículo de la Formulación [Especificidad para 17-β Estradiol].....	66
20	Típico de Progesterona.....	66
21	Fase Móvil Acetonitrilo/ Agua (30:70) [Especificidad para Progesterona].....	67
22	Solución Tween 80 al 0.3 % [Especificidad para Progesterona].....	67
23	Vehículo de la Formulación [Especificidad para Progesterona].....	67

RESUMEN

El presente trabajo muestra el desarrollo, la optimización y validación de un método analítico basado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para la cuantificación de 17 β -Estradiol y Progesterona de formulaciones de microesferas de Estradiol y Progesterona.

Inicialmente se contaba con un método analítico por CLAR para la cuantificación de β 7 - Estradiol y Progesterona, el cual utilizaba una columna Sinergy Hydro RP 4.0 x 20 mm de 2 μ m de tamaño de partícula, una precolumna Security Guard C₁₈ 3.0 x 4.0 mm, una fase móvil compuesta de 25 partes de acetonitrilo HPLC, 60 partes de agua HPLC y 15 partes de alcohol isopropílico HPLC, un flujo de 2 mL/min y utilizaba un sistema de detección por Fluorescencia a 280 nm de excitación – 305 nm de emisión para el β 7 -Estradiol y detección por UV a 256 nm para la Progesterona.

Considerando que el método presentó limitaciones en cuanto a la resolución entre el 17 β -Estradiol y algunos elementos del vehículo de la formulación, se desarrolló un método analítico, el cual consta de una columna cromatográfica Phenomenex Phenyl – Hexyl 2.0 x 50 mm de 3 μ m de tamaño de partícula, una fase móvil compuesta de 30 partes de acetonitrilo y 70 de agua HPLC, un flujo de 0.65 mL/min y una precolumna Phenomenex Pheny Hexyl, un sistema de detección por U.V. a 254 nm para la cuantificación de la Progesterona y un sistema de detección por Fluorescencia a 280 nm de excitación y 305 nm de emisión para la cuantificación del 17 β -Estradiol, para cuantificar niveles de concentración de 2 a 800 ng/mL para el 17 β -Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.

El método cromatográfico, se validó demostrándose que es específico, lineal, exacto y preciso, por lo que se emplea para el análisis de muestras de 17 β -Estradiol y Progesterona.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

En la actualidad el desarrollo de nuevas tecnologías le ha proporcionado al ser humano un número mayor de conocimientos sobre el origen y acción de las enfermedades, permitiéndole desarrollar soluciones alternativas para combatirlas y ampliar sus expectativas de vida.

Estas alternativas han sido dirigidas principalmente al desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, técnicas de diagnóstico, técnicas de terapia y así como al desarrollo de nuevos medicamentos y formas farmacéuticas.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos medicamentos es una de las tendencias más importantes dentro de la industria farmacéutica, así como el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, entre las cuales se encuentran las formas farmacéuticas de liberación modificada, las cuales presentan ventajas terapéuticas sobre las formas farmacéuticas convencionales, ya que permite un mejor control en cuanto a la liberación del o los principios activos.

Dentro del desarrollo farmacéutico una de las pruebas fisicoquímicas importantes para evaluar una nueva forma farmacéutica, es la prueba de disolución, la cual permite determinar la cinética de liberación del fármaco y con ello realizar modificaciones durante el desarrollo, si así se requiere.

Para ello, es necesario, contar con un método analítico capaz de cuantificar de manera eficaz y confiable el principio activo en las muestras de la prueba de disolución.

Por lo anterior, se desarrollo el presente trabajo cuyos objetivos son los siguientes:

Objetivo:

Desarrollar un método analítico selectivo y específico para la cuantificación de Estradiol y Progesterona.

Validar el Método Analítico mediante la evaluación de los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y estabilidad.

GENERALIDADES

Hormonas Esteroideas (1, 9 – 13, 19 – 22, 26)

Una hormona es una sustancia química secretada por un grupo de células que ejerce un efecto fisiológico sobre el control de otras células de la economía corporal.

Las hormonas esteroideas se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos son los encargados de secretar, principalmente, testosterona, la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la dehidroepiandrosterona (DHEA), los ovarios producen los estrógenos que engloban el estradiol, 4-androsteno-3, 17-diona y la Progesterona,

La producción controlada y cíclica de estrógenos y progestágenos es exclusiva del ovario. Los estrógenos y los progestágenos son hormonas endógenas que producen gran variedad de efectos fisiológicos. En el caso de las mujeres, dichos efectos comprenden acciones vinculadas con el desarrollo, efectos neuroendocrinos involucrados en el control de la ovulación, preparación cíclica de las vías de reproducción para la fecundación e implantación, y los principales efectos sobre el metabolismo de los minerales, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos.

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17 β -estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de la alta afinidad a los receptores de estrógenos

ESTRADIOL

NOMBRE GENÉRICO:

Estradiol

NOMBRE QUÍMICO(1):

Estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol (17 β)-
Estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol

FÓRMULA DESARROLLADA:

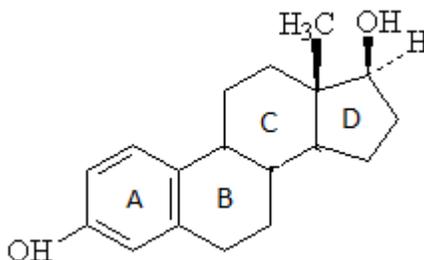


Figura No. 1 Estructura desarrollada del Estradiol

FÓRMULA CONDENSADA: $C_{18}H_{24}O_2$
PESO MOLECULAR: 272.39 g/mol,
DESCRIPCIÓN : Cristales higroscópicos o polvo cristalino blanco o blanco cremoso.

SOLUBILIDAD : Prácticamente insoluble en agua; soluble en 28 partes de etanol, en 17 de acetona, en 435 de cloroformo y en 150 de éter; soluble en dioxano y soluciones de hidróxidos alcalinos.

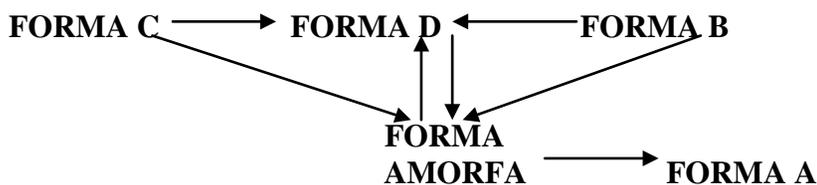
INTERVALO DE FUSIÓN: El Estradiol funde entre los 173°C y los 179°C.

CONSTANTE DE DISOCIACIÓN: El valor de pka aparente, determinado por espectrofotometría, para el grupo OH fenólico es de 10.30 ± 0.10

ROTACIÓN ESPECÍFICA: La rotación específica del β 17 -Estradiol se encuentra entre +73° y +83°, determinada en una solución con 10 mg/ml de dioxano.

POLIMORFISMO: Con base en los patrones de difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojo, se han encontrado 4 formas cristalinas (de la A a la D) y una forma amorfa del 17 β -Estradiol, las cuales sufren transformaciones entre si al ser sometidas a calentamiento y/o agitación mecánica.

Una propiedad notable del Estradiol es la tendencia a adquirir la forma hemihidratada (forma A), la cual se obtiene a partir de soluciones acuosas, acetato de etilo, cloroformo y etanol absoluto.



Esquema de Transformaciones de los Polimorfos del Estradiol

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA:

El 17 β -Estradiol, en una solución metanol-agua 2% (v/v), presenta máximos de absorción a 221 nm ($A_{1\% \text{ 1cm}}=289$) y 281 nm ($A_{1\% \text{ 1cm}}= 75$), con un hombro a 278 nm.

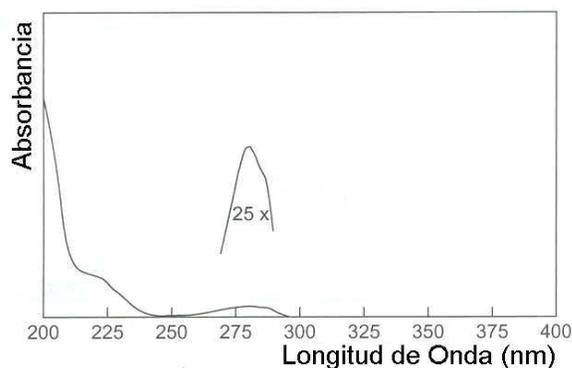


Figura No. 2 Espectro Ultravioleta del Estradiol en solución metanol-agua 2% (v/v) (35)

SINTESIS:

Los estrógenos se sintetizan principalmente en el ovario, concretamente en los folículos y el cuerpo lúteo del ovario y en la placenta, aunque también son secretados en pequeñas proporciones por los testículos. Durante el segundo y tercer trimestre del embarazo estas se producen en grandes cantidades. El ovario secreta el estradiol que es la hormona que se produce en mayor proporción y es el estrógeno de mayor actividad biológica, así como la estrona. La placenta por su parte produce a su vez estos mismos esteroides, pero además secreta el estriol, estrógeno que se produce más abundantemente durante la gestación. Los estrógenos: estrona, estradiol y estriol, son de estructura esteroide, con la característica del anillo A derivado de las bencenogonadotropinas y el AMPc. Los estrógenos también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte del colesterol (el precursor de todos los esteroides) hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides.

Las hormonas esteroides provienen y están relacionadas estructural y bioquímicamente con el colesterol, el cual es proporcionado por las lipoproteínas circulantes (LDL-colesterol), sintetizadas en el interior de las células a partir de la Acetil-CoA, o por hidrólisis de los ésteres de colesterol mediante la colesterol esterasa.

La biosíntesis de las hormonas esteroides comienza por la escisión de la cadena lateral del colesterol dando como resultado la pregnenolona, el

colesterol es introducido al interior de la mitocondria mediante un transportador específico dónde sufre un proceso de hidroxilación en las posiciones 20 y 22 por una monooxigenasa la cual posee un citocromo P₄₅₀ en su grupo prostético, por último, interviene la acción de una desmolasa la cual extrae un resto de aldehído isocaproico. Esta etapa se considera limítrofe en la biosíntesis de hormonas esteroides, llegando incluso a actuar la pregnenolona como retroinhibidor de la hidroxilación del colesterol.

A partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos se lleva a cabo una reacción de aromatización del anillo A, y ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos

En la primera etapa de esta reacción, el C19 (el grupo metilo angular situado en C10 del precursor andrógeno) es hidroxilado. Una segunda hidroxilación da como resultado la eliminación del grupo hidroximetilo del C19 recientemente formado y una hidroxilación final en C2 da un intermediario inestable que sufre un reordenamiento y forma el anillo fenólico A. La reacción total consume 3 moléculas de oxígeno y tres moléculas de NADPH

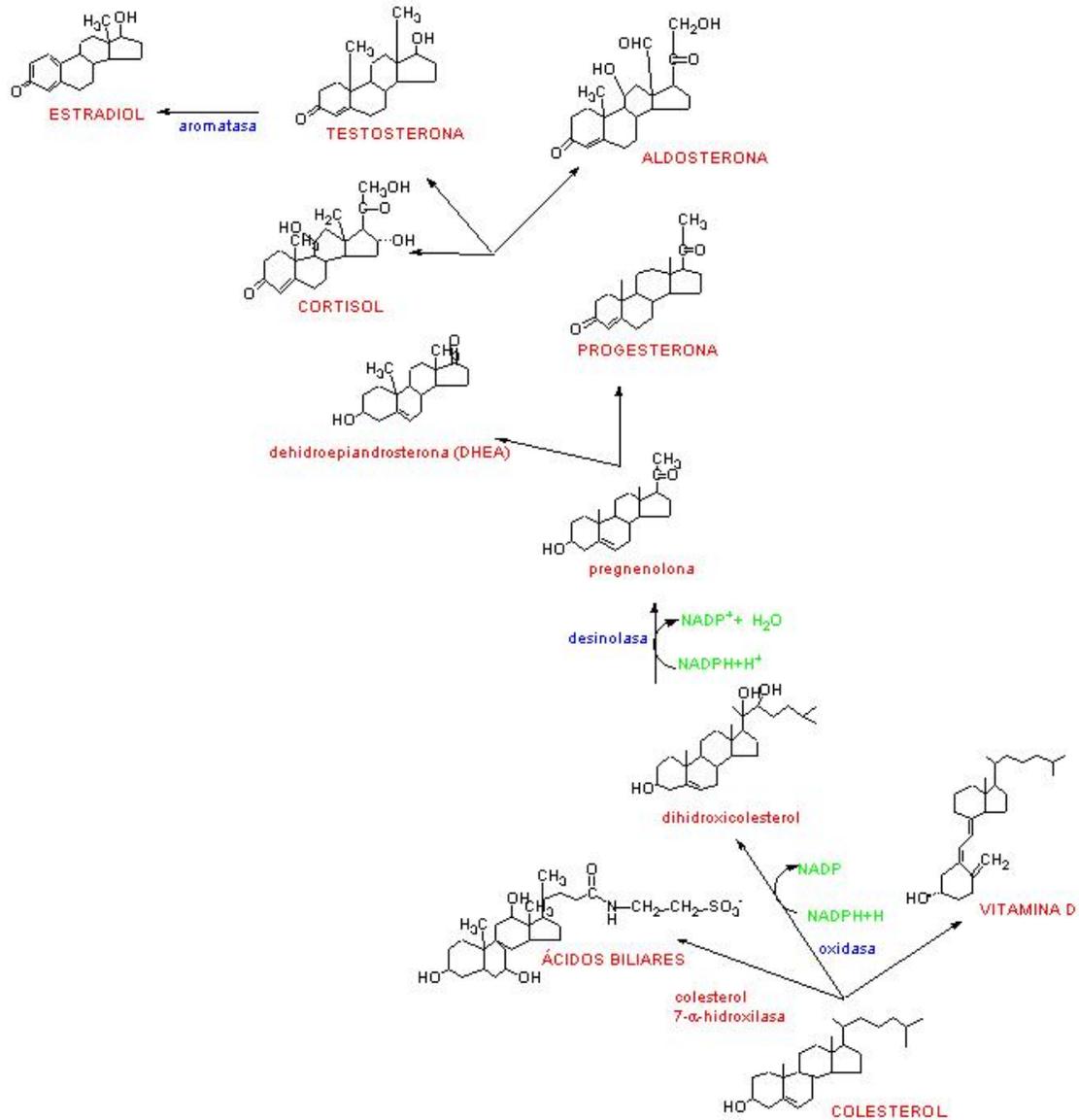


Figura No. 3 Ruta biosintética de los Estrógenos y Progestágenos a partir de Colesterol
 Tomada de la ruta 17 - ciclo del colesterol y de los esteroides - psicobiología net. (22)

La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembrana (familia P450 de monooxigenasas; Nebert y Gonzalez, 1987; Corbin y col., 1988); también es esencial una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA:

Los estrógenos actúan sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas

Los estrógenos tienen acciones promotoras del crecimiento sobre las células del útero, vagina, glándula mamaria y sobre los folículos de Graaf del ovario, favoreciendo e induciendo en el útero el desarrollo estrógeno y el crecimiento de los conductos en la mama, así como la síntesis de receptores de progesterona que son necesarios para que éstos tejidos respondan a la misma, causan la fase de crecimiento acelerado y el cierre de las epífisis de los huesos largos que se presenta en la pubertad, pero además, tienen efectos metabólicos generales en todo el cuerpo tales como el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo que podría ser un marcador de diferencia en la forma corporal y distribución de grasas en las mujeres (acumulación de grasa alrededor de las caderas y mamas). Altas cantidades estimulan el desarrollo de pigmentación en piel, principalmente en las regiones de pezones, areolas y genitales.

Cuando la producción de estrógeno está coordinada con la producción de progesterona durante el ciclo menstrual, se presentan periodos regulares de sangrado y eliminación del recubrimiento endometrial.

Los estrógenos, parecen provocar en parte el mantenimiento de la estructura normal de la piel y vasos sanguíneos en mujeres, disminuyen el índice de resorción de hueso al antagonizar el efecto de la hormona paratiroidea (PTH); pero no estimulan la formación de dicho hueso, tienen efectos importantes en la absorción intestinal, ya que reducen la movilidad de este órgano. Además de estimular la síntesis de enzimas que causan crecimiento uterino, alteran la producción y actividad de muchas otras enzimas en el cuerpo, aumentan la síntesis de proteínas de fijación y transporte en el hígado.

Los estrógenos pueden incrementar la coagulabilidad de la sangre, disminuyen la oxidación a cetonas de los lípidos del tejido adiposo e incrementan la síntesis de triacilgliceroles. Las alteraciones en la composición de los lípidos del plasma provocados por estrógenos incluyen: aumento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés high density lipoprotein), discreta reducción en las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés low density lipoprotein) y reducción en

los valores de colesterol plasmático. Aumentan los valores de triacilgliceroles plasmáticos lo mismo que los depósitos de grasas.

Los estrógenos solos disminuyen ligeramente las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (Barrett, Connor y Laakso, 1990), pero esto no parece tener acciones importantes sobre el metabolismo de carbohidratos

El estradiol (E2) es quizás el producto secretor más importante del ovario debido a su potencia biológica y diversos efectos fisiológicos en los tejidos blanco periféricos. Las concentraciones plasmáticas de estradiol durante la primera mitad de la fase folicular son bajas, en general menores de 50 pg/mL (0.18 nmol). Alrededor de una semana antes del surgimiento de la gonadotropina a mitad del ciclo, las concentraciones de estradiol empiezan a crecer con rapidez y se obtienen valores máximos de casi 200 a 300 pg/mL (0.73 a 1.1 nmol/L) en el día que precede al pico de la hormona luteinizante (LH) o, con menor frecuencia, el mismo día. La elevación en las cifras de estradiol plasmático, se correlaciona de manera estrecha con el aumento del tamaño del folículo preovulatorio. Después del pico de LH, los valores de estradiol sérico caen con rapidez durante varios días. Existe un incremento secundario en los valores de estradiol plasmático que alcanza un máximo en la porción media de la fase luteínica, lo cual refleja la secreción de estrógeno por el cuerpo lúteo. Los patrones plasmáticos de estrona durante el ciclo menstrual son similares a los del estradiol, pero los cambios en las concentraciones son menores que los de este último; así, la proporción de estrona y estradiol varía a través del ciclo. La proporción es mayor en el momento de la menstruación, cuando la secreción de estradiol es mínima, mientras que es menor en el periodo preovulatorio, cuando la secreción de estradiol es máxima. En tanto que la mayor parte del estradiol de la circulación periférica es el resultado directo de la secreción ovárica, una parte importante de la estrona circulante proviene del estradiol y de la conversión periférica de androstenediona.

MECANISMO DE ACCION/EFEECTO:

Se cree que los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides, actúan por medio de regulación de

la expresión de genes. Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, mamas, la hipófisis, el hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos, así como en diversos tejidos en varones.

El receptor interactúa con secuencias de nucleótido específicas denominadas elementos de reacción a estrógenos (ERE) presentes en genes precondicionados, y esta interacción incrementa, o en algunas situaciones disminuye, la transcripción de genes regulados por hormonas. Además de los elementos de reacción a estrógenos, muchos genes con capacidad de respuesta a estrógenos contienen elementos que median las acciones de otros factores reguladores. Esto puede proporcionar un mecanismo mediante el cual las señales provenientes de estrógenos y otros compuestos convergen en sitios genómicos comunes para integrar respuestas celulares a múltiples estímulos.

Los estrógenos, como otras hormonas esteroideas, actúan regulando la transcripción de un número limitado de genes. Estos circulan en la sangre en asociación con la albúmina y la globulina fijadora de hormonas sexuales, estas se difunden en forma pasiva a través de las membranas celulares, se distribuyen en las células y finalmente se fijan a proteínas receptoras citoplasmáticas de gran especificidad distribuidas en las células del aparato reproductor femenino, de la mama, de la hipófisis y del hipotálamo. La principal característica estructural responsable de la alta afinidad específica de los receptores de estrógenos esta dada por el anillo fenólico A.

Estos complejos estrógeno-proteína son transportados al núcleo, donde se une de forma definitiva a receptores de estrógenos en el ADN regulando la síntesis proteica merced a la activación de la ARN-polimerasa. Como resultado de la interacción, aumenta la síntesis de ARNm y de diversas proteínas específicas, aumenta la síntesis de ADN y ARN, reducen la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo, que trae como consecuencia una reducción en la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) de la pituitaria.

ABSORCIÓN:

Los estrógenos utilizados para terapia, se absorben fácilmente a través de la piel, mucosas, membranas y el tracto gastrointestinal. Cuando son administrados para acción local, la absorción observada a menudo es suficiente para obtener efectos sistémicos. La absorción del estradiol y sus derivados por el tracto gastrointestinal es rápida y completa.

UNIÓN A PROTEÍNAS:

Cuando se liberan hacia la circulación los esteroides, estos se unen a las proteínas plasmáticas. El estradiol se fija con avidez a la globulina de transporte llamada, globulina fijadora de hormona sexual (SHBG, del inglés sex hormone binding globulin) y se une con menor afinidad a la albúmina, a pesar de que esta molécula es mayor en plasma.

Los valores son dos veces más altos en mujeres que en hombres. Las proporciones de estradiol libre y unido no varían de modo significativo durante el ciclo menstrual; sin embargo, las diferencias en la unión pueden tener importancia clínica después de la menopausia o en mujeres con función ovárica anormal relacionada con exceso de andrógenos.

METABOLISMO:

El estradiol se une a la globulina fijadora de 17 β -Estradiol en el plasma circulante, no siendo así en el caso de la estrona y el estriol que sólo se une débilmente. El estradiol presenta un complejo metabolismo en los tejidos periféricos y en el hígado que comprende una oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16.

En el hígado se lleva a cabo la interconversión entre la estrona y el estradiol, catalizada por la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual se sirve de los nucleótidos de pirimidina como cofactores. Los metabolitos reducidos se conjugan por los grupos hidroxilo en forma de sulfatos o de glucuronatos que son precisamente los que circulan en la sangre y los que más rápidamente van a ser excretados por la orina oxidando el estradiol de forma reversible a estrona, ambos estrógenos pueden ser convertidos en estriol y una proporción en forma de conjugados, en particular sulfatos, que son excretados por el riñón.

Aproximadamente la quinta parte de estos productos conjugados es eliminada en la bilis, y cantidades menores pasan a la orina.

El hígado también combina los estrógenos en forma lábil para formar la denominada estroproteína; que es principalmente en esta forma como circulan los estrógenos en los líquidos extracelulares.

Los esteroides estrogénicos y progestágenos aparecen rápidamente en la bilis en sus formas conjugadas entrando en el tracto gastrointestinal y siendo reabsorbidos seguidamente por el sistema porta hepática de nuevo hacia el hígado.

A la hora de determinar las hormonas esteroides y sus metabolitos en sangre y orina, sólo se encuentran trazas de esteroides libres no reducidos en la orina, debido a su bajo índice de clarificación, que en parte, se debe, a su fijación a proteínas plasmáticas.

USOS CLÍNICOS:

Las aplicaciones más frecuentes de esos compuestos son en la terapia de reemplazo hormonal posmenopáusicas y como anticoncepción, a dosis que se utilizan en estos dos casos son diametralmente diferentes. Aun cuando los anticonceptivos orales se utilizan de manera primaria para prevenir el embarazo, también generan importantes beneficios para la salud, más allá de la anticoncepción.

Los estrógenos se utilizan ampliamente para trastornos menopáusicos, vaginitis atrófica, inhibición de la lactancia, trastornos menstruales, osteoporosis, y en algunos tipos de carcinoma prostático y mamario.

El empleo de estrógenos en la osteoporosis se sustenta en administrar estrógenos a pacientes posmenopáusicas.

Las dosis diarias para el síndrome menopáusico, son los siguientes: estrógenos equinos esterificados o conjugados, 1.25 mg; etinilestradiol, 0.05 mg; dienestrol, 0.5 mg y dietilestilbestrol, 0.2 mg.

EFECTOS ADVERSOS:

Se presentan una serie de efectos adversos, entre los que se encuentran, dolor de mama, edema periférico, agrandamiento de mamas (en mujeres) y ginecomastia (en hombres) con tratamiento de estrógenos para cáncer de próstata. Con menor frecuencia en amenorrea, sangrado intermenstrual, menorragia, ligeros sangrados

intermenstruales, tumores en mama, hepatitis, tromboembolismo o formación de trombos.

PROGESTERONA

NOMBRE GENÉRICO: Progesterona
NOMBRE QUÍMICO: Pregn-4-en-3,20-diona
FÓRMULA DESARROLLADA:

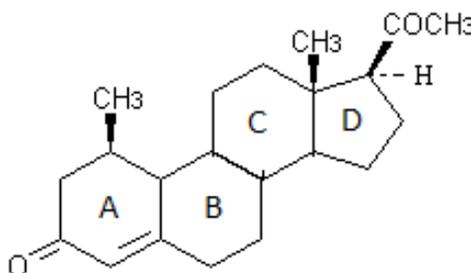


Figura No. 4 Estructura desarrollada de la Progesterona

FÓRMULA CONDENSADA: $C_{21}H_{30}O_2$
PESO MOLECULAR: 314.47 g/mol,
DESCRIPCIÓN: Polvo cristalino, inodoro, de color blanco o blanco cremoso. Es estable al aire.
SOLUBILIDAD: Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol, acetona, y en dioxano; escasamente soluble en aceites vegetales.
ROTACIÓN ESPECÍFICA: La rotación específica de la Progesterona se encuentra entre $+175^\circ$ y $+183^\circ$, determinada en una solución con 20 mg/mL de dioxano.
POLIMORFISMO: La progesterona presenta al menos dos formas polimórficas en estado cristalino: la forma α y β . A temperatura ambiente ambos polimorfos no parecen sufrir transformaciones. De manera espontánea al aumentar la temperatura ocurre una transformación unilateral de β a α , lo cual supone que la forma β es termodinámicamente inestable.

INTERVALO DE FUSIÓN: La Progesterona presenta dos intervalos de fusión. La forma α funde entre los 126° y 131 °C, mientras que la forma β funde a los 121°C.

Brändstatter-Kuhnert y col. han reportado la existencia de formas III – V, que al parecer son formas metaestables que generalmente pasan a la forma β . La forma α se obtiene por recristalización en disolventes orgánicos como etanol, benceno, acetona o mezclas binarias de estos disolventes.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA:

La Progesterona disuelta en alcohol deshidratado, presenta un máximo de absorción a 240 nm ($A_{1\% 1cm} = 540$).

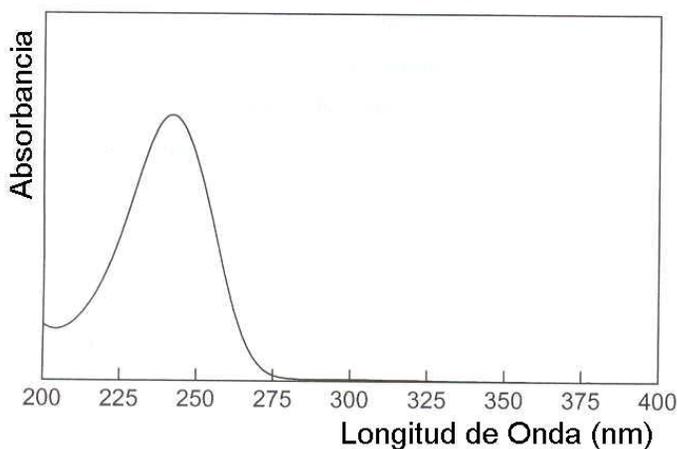


Figura No. 5. Espectro Ultravioleta de la Progesterona en alcohol deshidratado (36)

SINTESIS:

La Progesterona es un esteroide de 21 átomos de carbono que se secreta durante la fase lútea del ciclo ovárico y durante el embarazo. Como otras hormonas esteroideas, la Progesterona se sintetiza a partir del colesterol el cual es transformado en Pregnenolona, induciendo la formación de Progesterona. La Progesterona es secretada en el ovario, principalmente por el cuerpo amarillo durante la segunda mitad del ciclo menstrual. La secreción comienza en realidad justo antes de la ovulación, desde el folículo destinado a liberar el óvulo. La síntesis de la Progesterona y la secreción del cuerpo lúteo está mediada por el efecto estimulador de la LH, el efecto estimulante de la hormona luteinizante sobre la síntesis y secreción de progesterona por el cuerpo amarillo, está mediado por

un receptor unido a membrana enlazado a una vía de transducción de señales acoplada a proteína G que incrementa la síntesis de AMPc mediante estimulación de la adenilciclasa.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA:

La progesterona, al igual que el estradiol, en cantidades relativamente elevadas inhibe la ovulación por supresión de la estimulación gonadotrópica. Es necesaria para la implantación del óvulo fertilizado y para la inhibición de la contracción uterina en el mantenimiento del embarazo. Estimula el crecimiento de las zonas secretoras glandulares de tipo uterino y mamario después de la preparación por estrógenos.

La secreción de Progesterona pueden ir desde unos pocos miligramos por día durante la fase folicular del ciclo, durante la fase luteínica y durante la parte final del embarazo. Cantidades de 1 a 5 mg por día se han determinado en hombres y son comparables a los valores de las mujeres durante la fase folicular del ciclo. La hormona tiene efecto tanto en el endometrio como el miometrio. Actúa sobre el endometrio, induciendo la fase secretoria, en la que las glándulas endométricas crecen y secretan grandes cantidades de carbohidratos que posiblemente serán utilizados por el óvulo fecundado como fuente de energía. Con respecto al miometrio, la función principal consiste en detener las contracciones rítmicas espontáneas del útero, para que el embrión no sea desalojado del útero.

MECANISMO DE ACCION/EFEECTO:

La progesterona liberada durante la fase luteínica del ciclo disminuye la proliferación endometrial impulsada por estrógenos y conduce al desarrollo de un endometrio secretor. La declinación repentina de la liberación de progesterona a partir del cuerpo amarillo, al final del ciclo, constituye el principal determinante del inicio de la menstruación. Cuando se alarga artificialmente la duración de la fase luteínica, sea al sostener la función luteínica o mediante tratamiento con progesterona, es posible inducir cambios deciduales en el estroma endometrial similares a los que se observan al principio del embarazo. En circunstancias normales, los estrógenos anteceden y acompañan a la progesterona en esta acción sobre el endometrio y son esenciales en la aparición del patrón menstrual normal.

La progesterona también influye en las glándulas endocervicales, y la abundante secreción acuosa de las estructuras estimuladas por estrógenos se modifica hasta ser un material escaso y viscoso. Como se mencionó, esas acciones y otras de los progestágenos disminuyen la penetración de los espermatozoides en el cuello uterino.

Los progestágenos poseen muchos efectos metabólicos. La progesterona en sí incrementa las concentraciones basales de insulina y el aumento de esta última luego de ingestión de carbohidratos, pero normalmente no causa un cambio de la tolerancia a la glucosa. Sin embargo, la administración a largo plazo de progestágenos muy potentes, puede disminuir la tolerancia a la glucosa. La progesterona estimula la actividad de lipoproteína-lipasa y parece aumentar el depósito de lípidos. Se ha informado que la progesterona y sus análogos como el acetato de medroxiprogesterona, generan acciones nulas o reducciones moderadas de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de alta densidad. En contraste, los 19-norprogestágenos causan decrementos más pronunciados de las cifras de lipoproteínas de alta densidad, quizá debido a su actividad androgénica. Esto ha suscitado preocupaciones con respecto a que los progestágenos pueden disminuir los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre los comportamientos de lipoproteínas plasmáticas cuando los dos compuestos se administran juntos, por ejemplo, para anticoncepción y en posmenopáusicas. La progesterona también reduce las acciones de la aldosterona en los túbulos renales y causa decremento de la resorción de sodio que puede aumentar la secreción de mineralocorticoides a partir de la corteza suprarrenal.

La Progesterona como otras hormonas esteroideas, se difunde libremente en el núcleo celular donde se fijan a los receptores de la Progesterona y afectan la transcripción de un limitado grupo de genes, donde aumenta la síntesis de diversos ARNm específicos mediante la interacción con la cromatina (DNA).

Los receptores para Progesterona poseen una escasa distribución tisular, expresándose principalmente

en el tracto reproductor femenino. A diferencia del receptor para estrógenos que requiere un anillo fenólico-A para su fijación con alta afinidad, el receptor para progesterona prefiere una estructura con un anillo Δ^4 -3-ona en una conformación invertida $1\beta, 2\alpha.3w$

Para que la Progesterona ejerza su acción en el útero necesita la acción previa de los estrógenos; de hecho la síntesis de receptores citosólicos de Progesterona parece ser inducida por los estrógenos.

La progesterona es importante en la conservación del embarazo. Los principales efectos de la hormona constan de supresión de la menstruación y de la contractilidad uterina, pero otras acciones también pueden ser muy importantes. Esos efectos para conservar el embarazo han conducido al uso histórico de progestágenos para evitar amenaza de aborto. Como quiera que sea, el beneficio de ese tipo de tratamiento es cuestionable, tal vez porque el aborto espontáneo rara vez depende de progesterona disminuida.

Si el ovulo es fertilizado, la implantación se produce unos 7 días después y casi al mismo tiempo el trofoblasto en desarrollo secreta su hormona luteotrófica (gonadotrofina coriónica) en la circulación materna, prolongando así la vida funcional del cuerpo lúteo. Durante la segunda o tercera semana de embarazo, la placenta en desarrollo comienza a secretar Estrógeno y Progesterona en colaboración con las glándulas suprarrenales fetales y entonces ya no es necesario el cuerpo lúteo para que prosiga la gestación. La placenta continúa secretando estrógenos y progestágenos en gran cantidad hasta el momento del parto.

La Progesterona liberada durante la fase luteínica del ciclo lleva al desarrollo de un endometrio secretor. La declinación abrupta de la liberación de Progesterona por el cuerpo amarillo al final del ciclo es el principal determinante del comienzo de la menstruación. Si la duración de la fase luteínica es alargada en forma artificial. Ya sea por una función lútea sostenida o por tratamiento con Progesterona, aparecen cambios deciduales en el estroma del endometrio similares a los observados al comienzo de la gestación. En situaciones normales, el estrógeno antecede y acompaña a la

Progesterona en sus acciones sobre el endometrio y es esencial para el desarrollo del patrón normal.

- ABSORCIÓN:** La Progesterona natural micronizada y administrada por vía oral, es bien absorbida y presenta una eficacia significativa. Administrada por vía vaginal, rectal e intramuscular, también presenta buena absorción.
- UNIÓN A PROTEÍNAS:** La unión a proteínas es aproximadamente del 96 – 99 %, principalmente a la albúmina sérica (50 – 54 %).
- METABOLISMO:** El principal metabolito urinario de la progesterona es el glucorónido del pregnandiol. La Progesterona es metabolizada principalmente en el hígado a pregnandioles y pregnanolonas, los cuales se conjugan posteriormente con el ácido glucurónico y sulfúrico. La excreción del glucorónido de pregnandiol por la orina se utiliza como índice de producción de progesterona por el cuerpo lúteo y durante el embarazo.
- ELIMINACIÓN:** Los metabolitos de Progesterona se eliminan tanto por vía renal como biliar, siendo la principal vía la renal.
- USOS CLÍNICOS:** La Progesterona se usa sola o en combinación con estrógenos como anticonceptivo, el tratamiento de la dismenorrea, hemorragia uterina disfuncional debida a un desequilibrio hormonal en ausencia de patología orgánica.
- EFECTOS ADVERSOS:** El efecto adverso más común en el tratamiento con Progesterona es la hemorragia menstrual anormal (el sangrado intermenstrual, el manchado, cambios en la cantidad de flujo o la amenorrea). También se presentan náuseas, vómitos, y somnolencia con la administración de Progesterona durante un corto periodo. Con la terapia prolongada puede presentarse edema, aumento de peso y malestar en el pecho.

CROMATOGRAFIA

Introducción (2 – 7, 23 – 29, 33)

La palabra cromatografía (*kromatos*, color y *graphos*, escrito) fue utilizada por primera vez por el botánico ruso M. Tswett en 1907 para designar una técnica empleada por él para separar pigmentos vegetales; hizo pasar a través de una columna de vidrio, rellena de carbonato de calcio, un extracto de hojas verdes en éter de petróleo, posteriormente se adiciono el disolvente puro por la parte superior de la columna, obteniendo una serie de bandas horizontales diversamente coloreadas, debido a la diferencia de adsorción por el carbonato de calcio de los colorantes de la planta. Actualmente se sabe que la separación no esta condicionada por el color, sin embargo, se sigue utilizando el nombre de cromatografía por motivos históricos.

De acuerdo a la definición de la IUPAC, la cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases, una que es fija (fase Estacionaria) y otra la cual se encuentra en movimiento (fase Móvil).

La fase móvil que puede ser líquida o gaseosa se encarga de transferir la mezcla de solutos que se encuentran en la muestra a través de la fase estacionaria hasta que eventualmente emergen separados de la mezcla.

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, puede encontrarse extendida como una capa o distribuida como una película.

La cromatografía definida como un procedimiento por el cual los solutos son separados por una diferencia de migración en un sistema de dos o más fases, las sustancias exhiben diferentes movilidades por diferencias de absorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño de la molécula o densidad de carga iónica.

Clasificación Cromatográfica

La cromatografía puede clasificarse de acuerdo al tipo de equilibrio involucrado, mismo que es gobernado por el tipo de fase estacionaria utilizada. Así la cromatografía puede ser de adsorción, de partición, de intercambio iónico, de exclusión, y de afinidad (Figura 7).

Tipos de cromatografía

La cromatografía se clasifica en 4 grupos, dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación:

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 empleada 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 silica. Se subdivide en cromatografía en fase normal y en fase reversa. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente a la silica es un hidrocarburo y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias mas 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 disolventes 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 de tamaño: También denominada cromatografía de filtración de 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 de las moléculas. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.

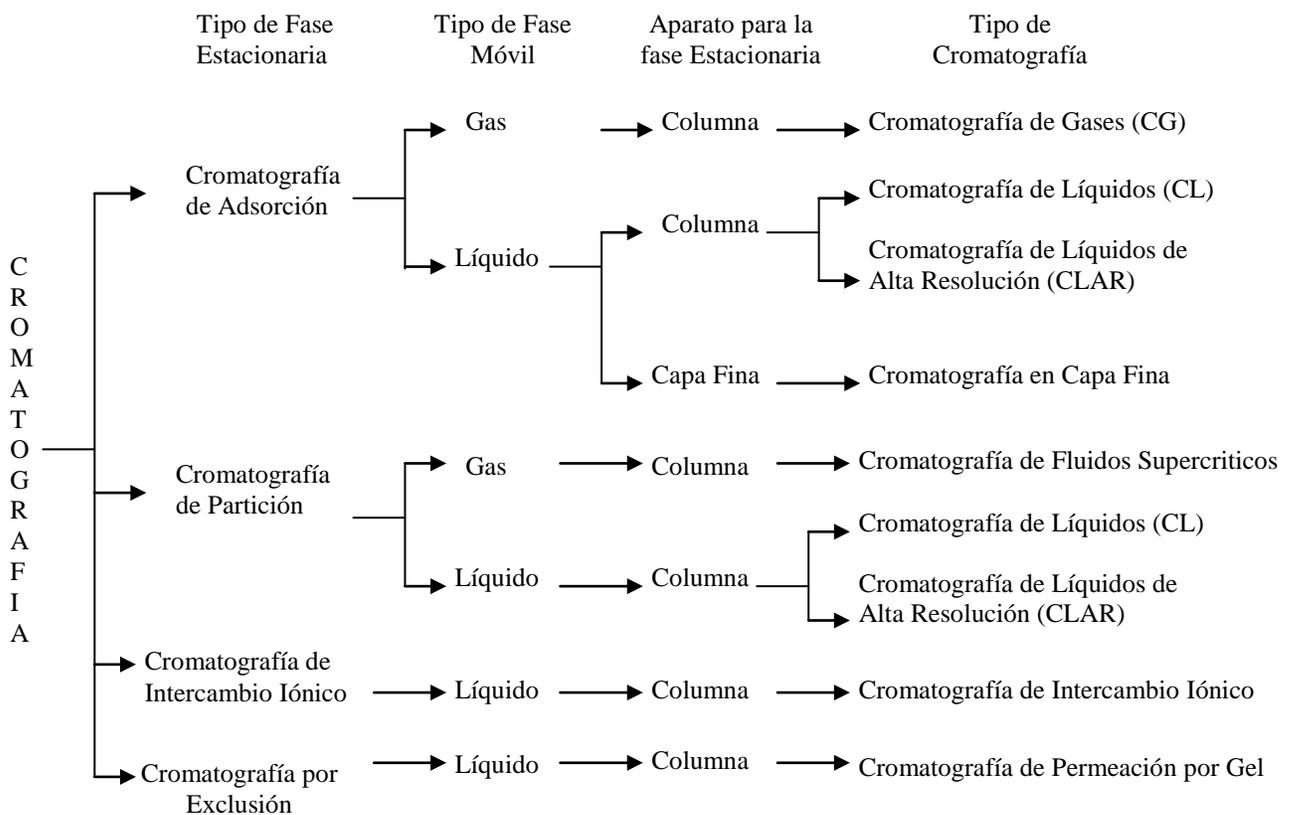


Figura No. 6 Clasificación Cromatográfica

Para solutos con masas moleculares superiores a los 10 000 daltons, 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 mas 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 compuestos (Figura 7).

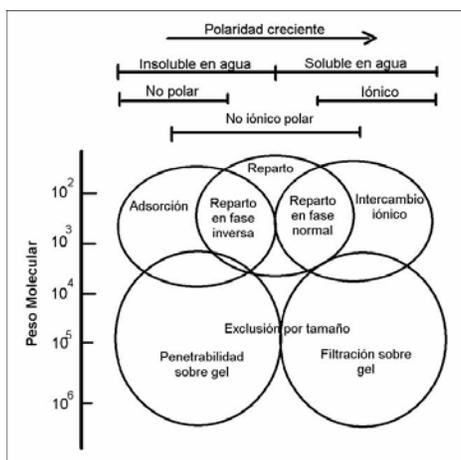


Figura No 7. Tipos de Cromatografía

Cromatografía Líquida

La cromatografía de líquidos también denominada como “cromatografía clásica”, se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de colocar la muestra en la parte superior de la fase estacionaria 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 micras, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución que requirió de instrumental especial que permitiera trabajar con altas presiones.

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 volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria.

Tabla No. 1 Aplicaciones características de la cromatografía de líquidos de alta resolución

Campo	Mezclas típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides analgésicos, etc.
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.

Parámetros Cromatográficos

Después de la separación cromatográfica, los compuestos separados generan una respuesta en función del tiempo la cual puede ser descrita por medio de un gráfico al cual se le denomina cromatograma. Idealmente se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original (Figura 8).

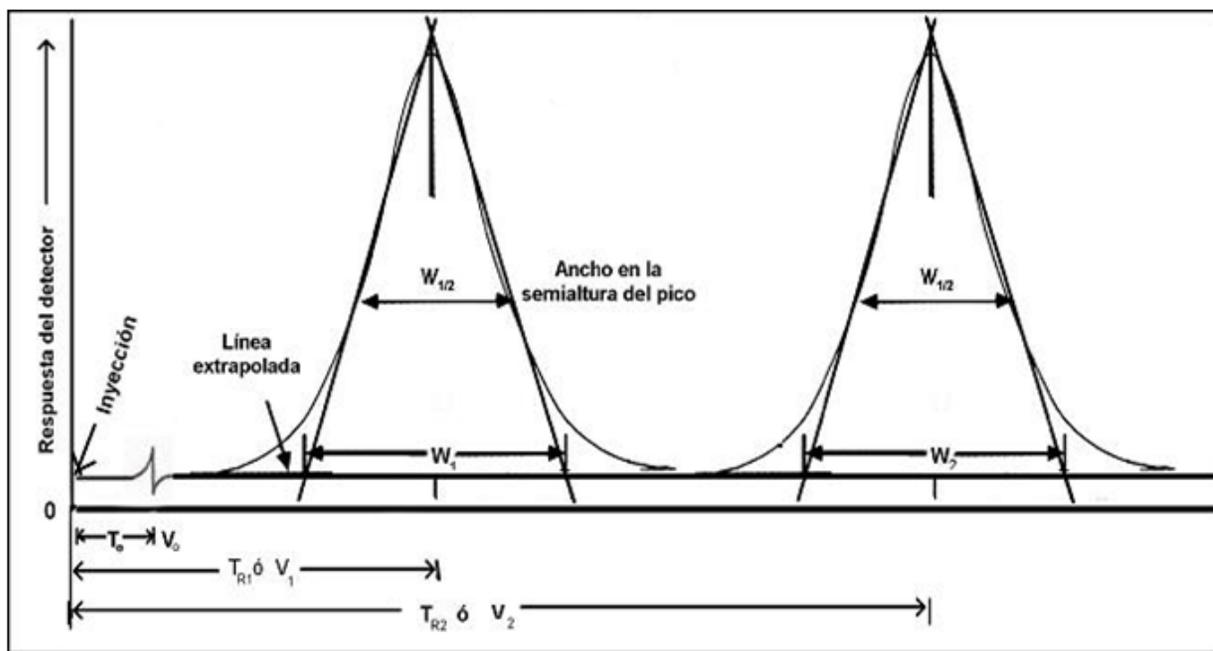


Figura No. 8 Cromatograma tipo de una separación de muestras

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 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.

Donde: T_{R1} y T_{R2} corresponde al tiempo que son retenidos dos compuestos en la columna.
 V_1 y V_2 son el volumen requerido de fase móvil para eluir al centro de los picos
 W_1 y W_2 son considerados como el ancho del pico.

El factor de capacidad (k'), que en ocasiones es llamado factor de retención o coeficiente retención, describe la relación entre la cantidad de sustancia a separar 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. El factor de capacidad se calcula de la siguiente manera:

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

Donde: t_{R1} es el tiempo de retención del analito de interés
 t_{R0} es el tiempo desde que se realiza la inyección hasta donde se observa el frente del disolvente (volumen muerto).

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 el 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 picos están resueltos.

La resolución (R), es la separación de los constituyentes de una muestra. El factor de separación (α) solo es la distancia o el tiempo entre los máximos de dos picos, la resolución sin embargo, toma en cuenta tanto el factor de separación (α) como el ancho del pico (w) y se expresa de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

donde:

t_2 y t_1 corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1 respectivamente
 w_2 y w_1 corresponden a los anchos de los picos 2 y 1 respectivamente medidos en su base

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

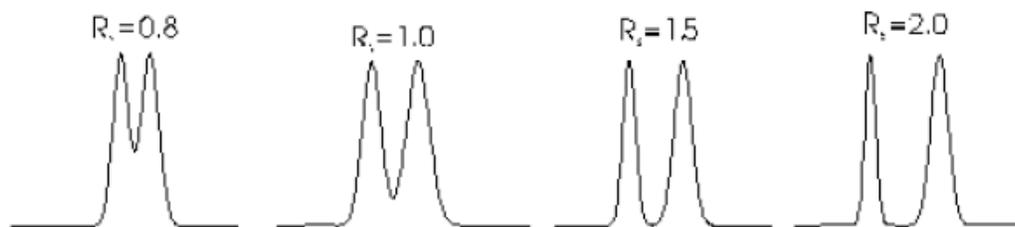


Figura No 9. Resolución Mínima

Platos Teóricos (N)

El concepto de Plato Teórico (N) fue desarrollado en 1941 por Martin y Synge para la cromatografía de partición líquido-líquido (LLC). Para explicar el fenómeno separativo, compararon la LLC con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia fundamental residía en que el proceso en cromatografía es un proceso continuo, donde la columna dividida en cortes o rodajas imaginarias se forma un equilibrio transitorio entre la fase móvil y un segmento de la fase estacionaria antes de que llegue al siguiente segmento. Así bien a cada segmento o corte se le dio el nombre de “plato” y al espesor del mismo “altura equivalente del plato teórico” (H ó HETP). Por lo tanto, la fórmula de la altura para una columna de longitud L, con N platos teóricos es la siguiente:

$$H = L/N$$

Así bien, la eficiencia de una columna cromatográfica y su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos, ya que para la separación de dos componentes dados, no solo deben eluir a distintos tiempos de retención, sino que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible. Por consiguiente el número de platos teóricos puede ser calculado en función del ancho del pico de la siguiente forma:

$$N = 16 (t_R/w_{tan})^2$$

donde:

t_R = Es el tiempo de retención del pico enésimo

w_{tan} = Es el ancho del pico medido sobre la línea base y esta expresado en unidades de tiempo (el cálculo puede expresarse en función del volumen de retención y el ancho del pico, en unidades de volumen).

Por lo tanto, H (y consecuentemente N) depende no sólo del diámetro, morfología y calidad de la partícula, sino también de la calidad del empaquetamiento, envejecimiento y el vaciamiento de los canales producidos por la disolución o los golpes. Por otra parte, otros factores determinantes del número de platos teóricos (N) y ajenos de manera física a la columna corresponden a los procesos por los cuales la geometría del pico se aleja del pico ideal, es decir de la curva normal o gaussiana.

Se han analizado las modalidades empleadas para la determinación del número de platos teóricos (N), de la cual, se concluye que tanto el cálculo basado en la medida del ancho del pico en la base, como la tomada a media altura del pico, son poco exactas cuando el gráfico se aleja de la normalidad; sin embargo, el método debe elegirse de acuerdo a las necesidades del analista usando la siguiente fórmula:

$$N = a (t_n / w)^2$$

Donde a: es una constante dependiente de la altura donde se mida el pico

t_n : es el tiempo de retención

W: es el ancho del pico

Tabla No 2. Calculo de N

W	a	MÉTODO	EXACTITUD
W_1	4	Inflexión	Baja
W_h	5.54	Media onda	Baja
W_3	9	3σ	-
W_4	16	4σ	Media
W_5	2.5	5σ	Alta
W_{tan}	16	Tangente	Baja

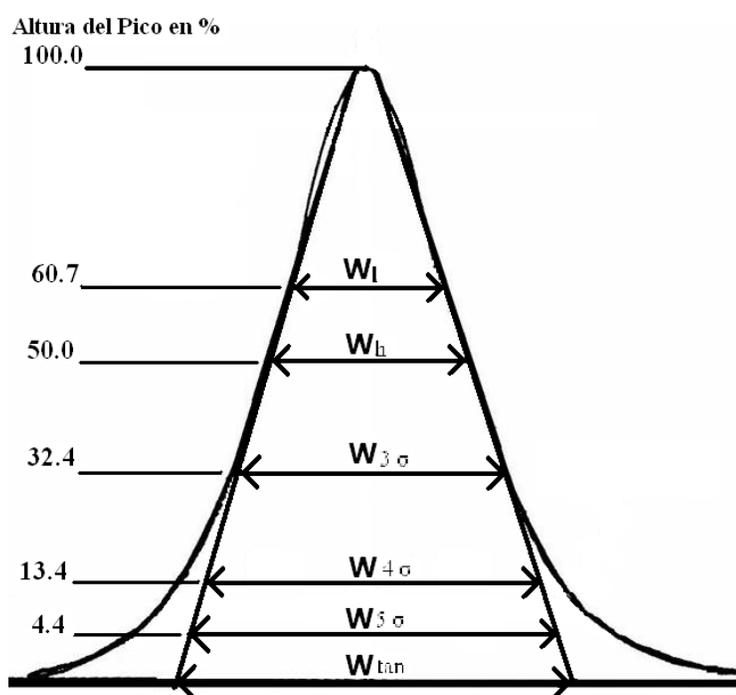


Figura No 10. Ancho del pico empleado para el cálculo de N (4)

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 están descritos por la ecuación de Van Deemter. Ésta define a la altura del plato teórico (**H**) como:

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

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

Aunque esta teoría 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 termino “ 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 del 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.

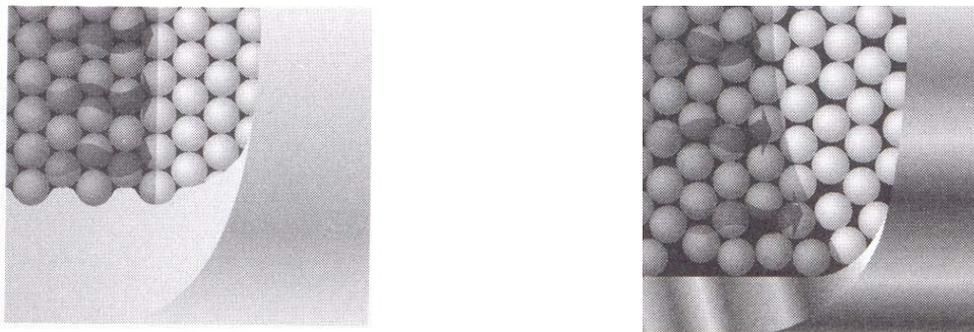


Figura No 11. Compactamiento de las partículas dentro de una columna

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 más lenta en los líquidos, el ensanchamiento de las bandas por este motivo en solo es significativo cuando la velocidad de flujo es excesivamente lenta.

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.

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.

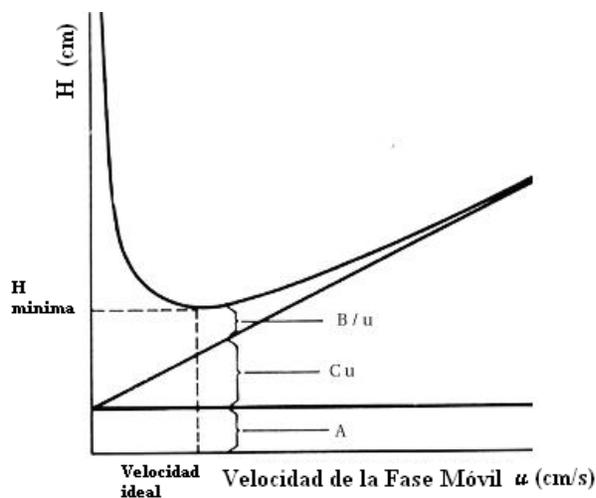


Figura No 12. Grafico de tipo Van Deemter (23)

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.

Equipo Cromatográfico

El notorio avance que la cromatografía de líquidos ha experimentado especialmente en el desarrollo de nuevas fases estacionarias, ha permitido acceder a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas que permiten entregar flujos estables que varían entre los microlitros y los mililitros; detectores con celdas intercambiables en las cuales se puede escoger el volumen, válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar procesos, integradores versátiles, conectados a una computadora que puede permitir no solo el control global de uno o más equipos cromatográficos, sino la libre manipulación y almacenamiento de datos, etc.

El equipo utilizado para la CLAR puede clasificarse como equipos integrados o modulares. En los equipos integrados cada una de sus partes (reservorio de solventes, bomba, inyector y detector) se encuentran reunidos en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o de diferente marca es difícil. En los equipos modulares, son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad, sino también aumentar la complejidad según la necesidad.

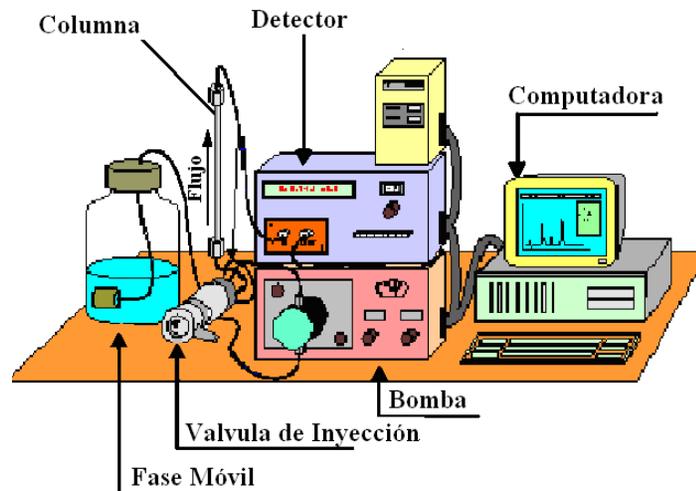


Figura No. 13 Esquema representativo de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Reservorios de Solventes

El tipo más común de depósito son recipientes de vidrio o de acero inoxidable que pueden contener hasta 1 litro de fase móvil la cual puede constar de solventes orgánicos puros o soluciones acuosas de sales o amortiguadoras. La mayoría de los fabricantes proveen estos con casquillos conectados a una tubería del Teflón con filtros especiales para conectar con la entrada de la bomba y/o con el gas (helio utilizado para eliminar el aire disuelto en el solvente).

Las soluciones que se utilizan para preparar estas mezclas deben ser de la mayor pureza posible dado que los contaminantes pueden depositarse sobre la columna e interrumpir la cromatografía. Las fases móviles deben ser filtradas para extraer el material particulado que pueda obstruir el sistema y eliminar los gases que pueda contener empleando vacío o sonicación.

Bombas

Dado que las partículas que se utilizan para empaquetar las columnas utilizadas en CLAR son lo suficientemente pequeñas como para evitar que el solvente fluya por gravedad se necesitan bombas que desarrollen presiones de hasta 5000 psi para forzar a la fase móvil a fluir a través del empaque de la columna. Mientras más pequeñas sean las partículas del empaque de la columna se requerirán presiones más altas.

Hoy en día, existen 2 tipos de bombas disponibles: mecánicas, que promueven una velocidad de flujo constante y neumáticas, que producen una presión constante.

Entre las bombas mecánicas la que se utiliza con mayor frecuencia es la de tipo de pistón recíproco, en la cual una palanca accionada a motor mueve un pistón de zafiro dentro de una pequeña cámara con líquido para hacer salir el solvente con válvulas de control que regulan

el flujo del solvente dentro del extremo del líquido y fuera de él y evitan el reflujo. Estas pueden tener dispuestas dos cámaras para fase móvil, de tal manera que mientras una de ellas se esta llenando, la otra se vacía.

Las bombas neumáticas pueden ser de dos tipos: 1) del tipo de desplazamiento utilizando un gas altamente comprimido a presión directa para hacer salir la fase móvil de un tubo ó 2) del tipo de amplificador neumático, en el cual el gas comprimido a baja presión choca con el extremo más grande de un pistón y forza el extremo más pequeño para que entregue el líquido. La amplificación de la presión del gas es proporcional a la relación de las áreas de los dos extremos del pistón.

Las bombas neumáticas poseen la ventaja de que realizan las operaciones sin pulsos.

Columnas

Las columnas típicas para la cromatografía de líquidos son de 5 a 25 cm de longitud, con partículas extremadamente pequeñas del diámetro (3 a 10µm). Algunas de las ventajas por las cuales se utilizan partículas más pequeñas, son: una resolución más alta, análisis más rápidos, y capacidad creciente de la carga de la muestra. Sin embargo, solamente las separaciones más exigentes requieren estos avances en cantidades significativas y el diámetro interno de las columnas generalmente es de 2 a 4.6 mm.

Otros componentes utilizados a parte de la columna analítica son la precolumna y guardacolumna.

Precolumna

La precolumna es un componente opcional y se le puede usar por dos motivos. Cuando las fases estacionarias constan de una delgada capa de líquido recubriendo un soporte sólido, el cual se disuelve de manera lenta en la fase móvil, provocando una disminución en la resolución. En este caso, la precolumna contiene el soporte sólido revestido con un mayor porcentaje de capa líquida que la columna analítica, con el fin de saturar la fase móvil y retardar la disolución de la misma. Dado que la mayoría de las fases estacionarias que se utilizan de modo corriente en CLAR están unidas en forma permanente y no están sujetas a disolución, la precolumna se usa sobre todo para proteger la columna principal mediante la captura de material particulado y la retención de sustancias que podrían ser adsorbidas de manera irreversible sobre la columna analítica.

Guarda Columna

La guarda columna es otro componente opcional, el cual se empaqueta con una fase estacionaria idéntica a la de la columna principal, excepto en que su tamaño de partícula puede ser mayor, de modo que no restrinja el flujo, su función principal es la de proteger a la columna del desgaste producido por la fase móvil y la presión. El material más grande es algo más barato y fácil de empaquetar por lo tanto el contenido de la guardacolumna se puede cambiar con frecuencia. Debido a su corta longitud (2 a 10 cm) por lo general no afecta la separación.

Columna Analítica

La columna analítica donde se lleva a cabo la separación de los componentes de una muestra, consta de un tubo de acero inoxidable, por lo general de 5 a 25 cm de largo, con un diámetro interno de 2 a 4.6 mm y de un empaquetamiento microparticulado de sílice (de 3 a 10 μm).

La columna analítica se puede emplear como tal para la cromatografía de adsorción, pero a menudo se unen químicamente fases líquidas a su superficie cuando se utilizan en la cromatografía de partición. Estas incluyen grupos alquilo con largas cadenas de 1, 2, 8 ó 18 carbonos, grupos cianopropilo, grupos fenilo e intercambiadores de iones. También se dispone de empaquetamientos con fases estacionarias quirales para la separación de isómeros ópticos.

Detectores

Hoy en día, los detectores ópticos son los más utilizados. Estos detectores pasan un haz de luz a través del efluente de la columna que fluye mientras que pasa a través de una celda de volumen (10 mL). Las variaciones en la intensidad de luz causada por la absorción ultravioleta (UV), la emisión de la fluorescencia, o el cambio en el índice de refracción (dependiendo del tipo de detector usado) de los componentes de la muestra que pasan a través de la celda, se supervisan como cambios en el voltaje de salida. Estos cambios del voltaje se registran en un registrador y se alimentan con frecuencia en un integrador o una computadora para proporcionar el tiempo de retención y datos del área máxima.

Aun no se ha desarrollado un sistema de detección satisfactorio para todo propósito, sin embargo, se emplean una serie de sistemas de detección sensibles y específicos basados en sus propiedades espectrofotométricas, refractométricas o electroquímicas de los solutos, entre los cuales tenemos el espectrofotómetro de UV-Visible y el espectrofotómetro de fluorescencia.

Espectrofotómetro de UV-Visible

El detector más comúnmente usado en la cromatografía de líquidos es el detector ultravioleta-visible al cual se ha dotado con una celda de flujo de volumen muy pequeño (8 μL). El más sencillo de estos se fija a una longitud de onda, por lo común 254 nm, dado que la mayoría de los compuestos orgánicos aromáticos absorben fuertemente en esa longitud de onda o cerca de ella y lámparas de mercurio de baja presión empleadas como fuente de luz.

También existen modelos de longitud de onda fija a 280 nm, en el cual absorben los aminoácidos aromáticos de las proteínas y los péptidos, o a 214 nm, que absorben las dobles ligaduras aisladas, como el grupo carbonilo. Los detectores de onda fija poseen las ventajas de ser económicos y de tener alta sensibilidad, y pueden detectar algunos compuestos en el orden de nanogramos.

Otros modelos más elaborados llamados *arreglo de fotodiodos* pueden rastrear todo el espectro de UV, de manera repetida durante la elución de un pico para determinar si hay más de una sustancia que coeluya.

Los detectores por disposición de díodos tiene la ventaja agregada de una mayor resolución de longitud de onda. La adaptación de la precisión del tamaño de las hendiduras a cada fotodiodo y el enfoque de espectro en un plano focal puede incrementar el poder de resolución de la longitud de onda a 1 o 2 nm.

Componentes

Fuente de radiación

La fuente de UV por lo común es una lámpara de descarga luminosa de hidrógeno (o deuterio) a alta presión, que cubre un espectro de 200 a 375 nm. La fuente empleada para el espectro visible es una lámpara de tungsteno de 6 o 12 V.

Monocromador

La función principal de un monocromador es la dispersión de la energía policromática por medio de un prisma o grilla. El rayo monocromático buscado, cuya longitud de onda está determinada por la posición angular del prisma o grilla, se dirige hacia el compartimiento de la muestra.

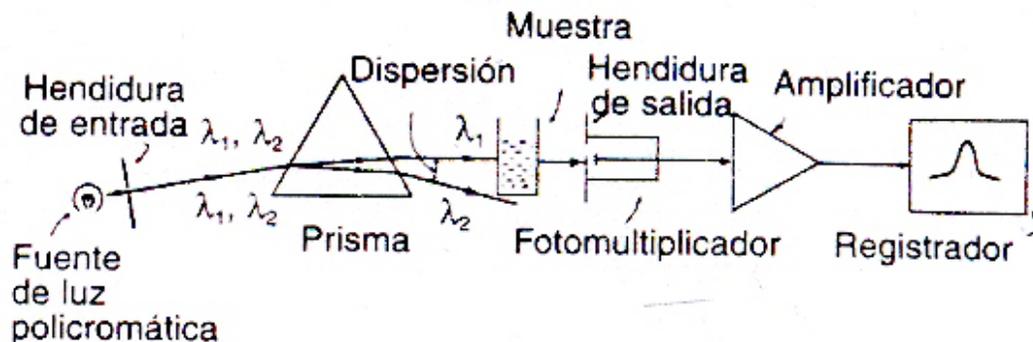


Figura No. 14 Esquema de un Monocromador (9)

Compartimiento de la Muestra

Es la sección donde la energía monocromática se encuentra con la muestra. En un equipo con doble haz, este compartimiento contiene un dispositivo que corta el haz o un montaje que lo modifica y permite que pase alternativamente a través de la muestra y las células de referencia (unas 35 veces/segundo) Esto permite que la relación muestra-referencia no sea modificada por cambios leves de la fuente o la óptica del instrumento.

Detector

El detector por lo común es un tubo fotomultiplicador compuesto de cátodos, los cuales, consisten en una superficie recubierta con una capa sensible a la luz. Cuando la energía choca contra la capa, está emite electrones y una serie de electrodos, denominados sínodos, que también están recubiertos por una capa sensible a la energía, conectados por una red de

resistores divisores de voltaje, donde los electrones que son atraídos, viajan desde el cátodo hacia el dínodo 1, de este hacia el 2 y así sucesivamente, de modo que cada cuanto que chocan, produce una avalancha de aproximadamente 10^6 electrones. La acumulación de estos electrones en el ánodo crea unos pocos miliamperes de corriente que puede medirse como voltaje a través de un resistor (Figura 15).

La salida del detector es amplificada y observada en un medidor, un registrador o un tubo de rayos catódicos y pueden ser puestos en interfase con una computadora digital a través de un convertidor analógico-digital para la determinación directa de los espectros de diferentes sustancias, así como para almacenamiento de espectros de referencia.

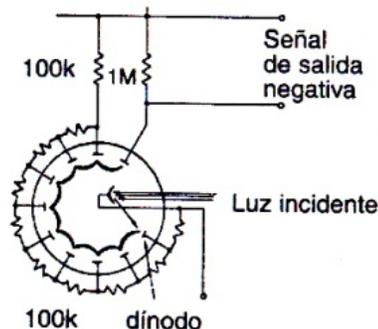


Figura No. 15 Esquema de un Fotomultiplicador (9)

Fluorescencia (9)

La fluorescencia es el fenómeno mediante el cual ciertas sustancias absorben energía emitiéndola en forma de luz o de otro tipo de radiación electromagnética. A diferencia de la fosforescencia, la fluorescencia tiene lugar únicamente mientras dura el estímulo que la provoca y todo este proceso ocurre en unas millonésimas de segundo.

El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando una molécula con electrones en estado basal S_0 (estado basal de singulete) absorben radiación visible o UV y sus electrones llevados a un estado S_1 o S_2 (estado de excitación del singulete) obteniendo electrones π excitados (π^*) los cuales al retornar a su estado basal emiten radiación con una longitud de onda más larga que la que fue absorbida originalmente.

Es decir cuando una molécula absorbe un fotón de alta energía, esta se disipa como calor emitiendo a su vez un fotón de baja energía y la diferencia de energía entre la absorción y la emisión, se le denomina *fluorescencia*.

Así cuando alguna sustancia es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X, las radiaciones absorbidas invisibles para el ojo humano, son transformadas en luz visible, o sea, a una longitud de onda mayor a la incidente.

Características de las moléculas

Para que una molécula sea capaz de producir fluorescencia es necesario que posea una estructura molecular absorbente. En general puede esperarse que haya fluorescencia con moléculas que contenga un sistema altamente conjugado, por lo menos con un grupo dador de electrones, como el NH_2 o el OH que forme parte del grupo conjugado.

De igual forma, la fluorescencia crece a medida que aumenta la rigidez de la molécula; es decir, a medida que hay una reducción de la vibración interna de la molécula.

Por otra parte, si la molécula posee grupos capaces de extraer electrones, como el COOH o el NO_2 , el fenómeno de fluorescencia se vera reducido e incluso en algunos casos se vera eliminada.

Espectrofotómetro de Fluorescencia

Los espectrofotómetros 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 y lograr sensibilidades en el orden de los picogramos, es posible inducir fluorescencia a determinados analitos mediante el uso de reactivos apropiados (derivatización).

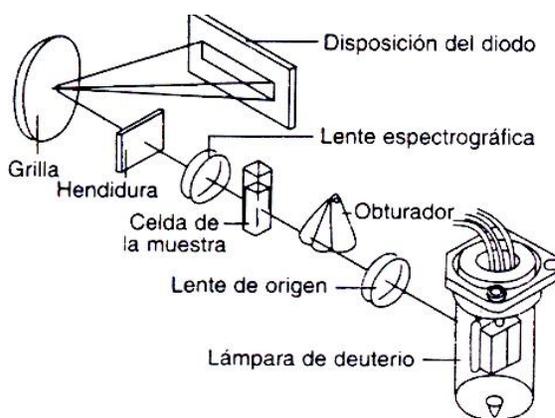


Figura No. 16 Esquema de un Espectrofotómetro de Fluorescencia (9)

Cuando ciertas sustancias químicas son excitadas electrónicamente por la absorción de radiación UV o visible y estas emiten luz con una longitud de onda más larga. Este fenómeno se denomina *luminiscencia* y, según el período de vida de las especies excitadas, para la fluorescencia el fenómeno de luminiscencia se detiene entre los 10^{-8} y 10^{-4} segundos después de la remoción de la fuente de excitación.

Instrumento

Un espectrómetro de fluorescencia en general emplea dos monocromadores, uno para la fuente de excitación y otro para el análisis de la emisión de fluorescencia. Si el espectro de fluorescencia es fuerte, el espectro de excitación puede determinarse colocando la solución deseada en el instrumento y evaluando la fluorescencia mientras se varía la longitud de onda de la luz excitadora (Figura 17).

El detector es un tubo fotomultiplicador cuya salida está conectada a un medidor y un registrador.

Aplicación

La espectrometría de fluorescencia tiene la mayor sensibilidad inherente de todas las técnicas espectrofotométricas. Pueden medirse concentraciones tan pequeñas como 10^{-7} M en forma exacta y precisa. También tiene una gran selectividad por lo que es de gran utilidad para el análisis de fármacos y metabolitos en líquidos biológicos y es menos utilizada en otras técnicas de absorción debida a la cantidad relativamente limitada de compuestos orgánicos a los cuales pueden inducirse la fluorescencia.

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.

Detectores Electroquímicos

El detector electroquímico es una alternativa para la detección de moléculas que no presentan absorción de la 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:

- Detectores Amperométricos
- Detectores Conductimétricos
- Detectores Potenciométricos

Inyectores

La introducción de la muestra se puede lograr de varias maneras. Una es utilizar inyectores de tabique, en los cuales las soluciones de muestra se inyectan a través de una goma autosellante o de un disco de teflón con una jeringa de microlitros. Esto se puede hacer mientras la fase móvil esta fluyendo o mientras está se ha detenido en forma temporal. Aunque estos dispositivos son baratos y fáciles de usar, es difícil lograr inyecciones reproducibles y la automatización en su operación. Por lo tanto la introducción de la muestra se realiza casi siempre usando un inyector de válvula rotatoria-espiral.

Está consta de un bloque de teflón y acero inoxidable que ha sido perforado para proveer dos vías alternativas para el flujo del solvente, y se puede seleccionar cada una de ellas mediante una válvula rotatoria. Cuando la válvula esta en la posición de “llenado” el solvente fluye a través de una vía directamente sobre la columna. En otra vía un volumen fijo (10 a 1000 μL) dentro de un tubo en espiral estrecho de acero inoxidable que se llena con la solución de muestra usando una jeringa o por aspiración. Así, cuando se mueve la válvula a la posición de “inyección”, la vía de la fase móvil se desvía a través de la espiral y lavando su contenido sobre la columna. Los resultados son muy reproducibles y el inyector puede ser automatizado si se usa un solenoide para cambiar la posición de la válvula.

En sistemas más sofisticados de cromatografía de líquidos, se incorporan dispositivos automáticos de muestreo donde la introducción de la muestra se hace con la ayuda de automuestreadores y microprocesadores.

En la cromatografía de líquidos, las muestras líquidas pueden ser inyectadas directamente y las muestras sólidas necesitan solamente ser disueltas en un solvente apropiado. El solvente no necesita ser la fase móvil, pero se elige con frecuencia para evitar interferencia con el detector o los componentes de la columna.

Se recomienda eliminar partículas de las muestras por filtración o centrifugación puesto que las inyecciones continuas del material podrían causar eventualmente la obstrucción de los dispositivos o de las columnas.

Sistemas de los datos

Puesto que el detector emite una señal eléctrica, es necesario el uso de técnicas modernas para la adquisición de datos en el análisis de la señal. Además, algunos sistemas pueden almacenar datos en una forma recuperable para el análisis computarizado altamente sofisticado.

La meta principal al usar sistemas de los datos electrónicos es aumentar la exactitud y la precisión del análisis. En análisis de rutina, donde no es necesaria la automatización, un integrador programado puede ser suficiente.

VALIDACION DE METODOS ANALÍTICOS (2, 8, 11)

De acuerdo a las Buenas Practicas tanto de Fabricación como de Laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos que se utilicen estén validados.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, la capacidad del método al satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada, con la evidencia documentada para demostrar su confiabilidad dentro de límites previamente definidos.

Elementos Requeridos para la Prueba de Validación

Considerando la gran variedad de pruebas, es lógico que existan diferentes esquemas de validación y por consiguiente el esquema de validación de un método analítico varía de acuerdo a la naturaleza del método:

En la sección Validación de Procedimientos Farmacopeicos (1225) de la USP 32 se muestran las categorías más comunes y las pruebas requeridas para la validación de métodos de acuerdo a la categoría.

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos.

Categoría: II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas de fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Incluye análisis cuantitativos y pruebas límite.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características del desempeño de un producto, como disolución o liberación del fármaco.

Categoría IV: Pruebas de Identificación.

En la tabla No. 3 se muestran los parámetros requeridos para cada categoría.

Tabla No 3. Parámetros Analíticos de Validación

Parámetros Analíticos	Categoría Tipo I	Categoría Tipo II		Categoría Tipo III	Categoría Tipo IV
		Cuantitativo	Prueba Limite		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Robustez	SI	SI	*	*	NO

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba.

El método desarrollado y propuesto en este trabajo de tesis se identifica dentro de la categoría I y III, por consiguiente, los parámetros analíticos requeridos para la validación del método son Precisión, Exactitud, Especificidad, Linealidad y Robustez.

Una vez revisado lo anterior para la validación del método cromatográfico propuesto en este trabajo de tesis se propusieron los siguientes parámetros:

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Sistema

- Linealidad
- Precisión

Método

- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

Estabilidad

- A temperatura ambiente
- En condiciones de refrigeración

Especificidad

Robustez

Linealidad

Es la habilidad que posee el método o sistema para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Exactitud

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes concentraciones de una muestra homogénea o de una referencia.

Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el laboratorio, pero bajo diferentes condiciones de análisis, tales como equipo, columnas, analistas, etc.

Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico, expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones.

Especificidad

Es la respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a los componentes de la muestra.

Estabilidad

Con este parámetro se conocen las condiciones en las cuales, las muestras que se obtienen durante el proceso de análisis, conservan su integridad fisicoquímica para su cuantificación de un determinado analito con precisión y exactitud durante un periodo de tiempo determinado. Esto proporciona una mayor confiabilidad de los resultados, pues permite determinar si la muestra presenta degradación durante el tratamiento o el almacenamiento, por medio de la medición de una respuesta o propiedad para ser cuantificada.

Robustez

Es el grado de reproducibilidad bajo diferentes condiciones o parámetros de operación.

Tolerancia

Es la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos del análisis de la muestra bajo diferentes condiciones de operación, como pueden ser equipos, columnas, etc.

Selectividad

Es la capacidad que tiene un método para que la respuesta obtenida proceda del fármaco de interés pueda ser distinguida de otros componentes que estén presentes en la matriz y que pudieran tener características químicas y cromatográficas muy semejantes al fármaco de interés.

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPOS, MATERIAL, REACTIVOS Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Equipo

Equipo Cromatográfico marca Waters

Bomba Cuaternaria Mod. 515 TM
Automuestreador Mod. 717 plus
Detector UV de Fotodiodos Mod. 2487
Detector de Fluorescencia Mod. 2475
Controlador de Temperatura Mod TCM2

Equipo Purificador de Agua Mili-Q Waters
Equipo de Filtración por membrana Millipore

Columna Phenomenex Phenyl-Hexyl 50 x 2.0 mm, 3 μ m
Computadora Dell Optiplex GX620
Software Empower Pro versión 2.0

Balanzas

Balanza Analítica Mettler Toledo Mod. XS205DU
Balanza Mettler Toledo de 0.5 a 3100 g
Refrigerador REVCO Mod. REC 5004A18
Ultrasonido Branson Mod. 3510MR-T
Repipeteadora Eppendorf Mod. Multipette plus

Reactivos

Acetonitrilo Grado cromatográfico (HPLC)
Metanol Grado cromatográfico (HPLC)
Agua purificada grado cromatográfico (HPLC)
Polisorbato 80 (Tween 80)
Vehículo para dispersión de microesferas ME2004050 (proporcionado por el departamento de microesferas)

Sustancias de Referencia

Estradiol, Sustancia de Referencia Secundaria con pureza de 99.9 %
Progesterona, Sustancia de referencia Secundaria con pureza de 100.1 %
Metilparabeno NF
Propilparabeno NF
Manitol NF

TRABAJO PREVIO (30-32)

A través de una investigación bibliográfica, se encontraron métodos analíticos capaces de cuantificar 17- β Estradiol y Progesterona, los cuales sirvieron como fundamento para este trabajo de tesis, los cuales se describen a continuación:

Método Analítico 1 (12)

Leticia Mayumi H. reporta un método para cuantificar por CLAR 17- β Estradiol y Progesterona de formulaciones de microesferas de Estradiol:Colesterol y Progesterona, el cual fue utilizado para pruebas de perfiles de disolución utilizando dodecilsulfato de sodio como medio de disolución, el método cromatografico consistió de lo siguiente:

Fase Móvil:	Acetonitrilo:Fosfato de Sodio Monobásico 0.05M:2-Propanol (10:80:10) pH 5.0 \pm 0.05
Columna:	μ Bondapak CN 3.9 mm x 150 mm, 10 μ m de tamaño de partícula
Flujo:	2.0 mL/min
Vol. de Inyección:	100 μ L
Detección para el 17 β -Estradiol:	Fluorescencia λ_{Ex} 281 nm - λ_{Em} 305 nm
Detección para la Progesterona:	UV 254 nm
Respuesta:	Áreas

Posteriormente el medio de disolución utilizado para los perfiles de disolución fue reemplazado por una solución de Tween 80 al 0.3% obligando nuevamente a modificar las condiciones cromatográficas para obtener un método analítico sensible, selectivo y confiable.

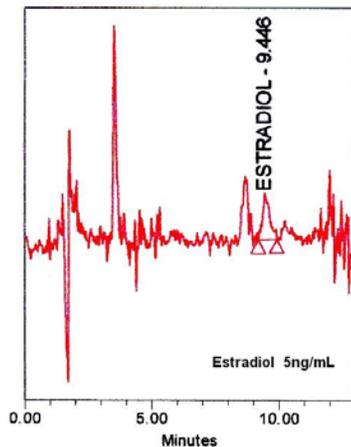
Método Analítico 2

Dentro de las instalaciones del Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, S.A., y continuando con el desarrollo del método, se modifico la polaridad de la fase móvil, se sustituyo la fase estacionaria, se modifico el volumen de inyección y se modifico la velocidad de flujo, dando como resultado el siguiente sistema cromatográfico:

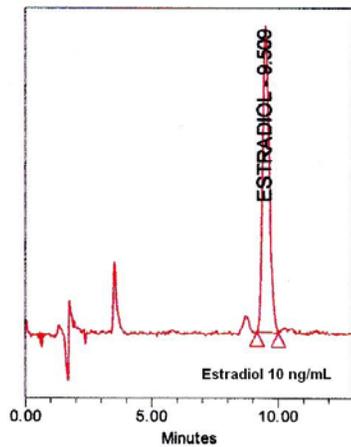
Fase Móvil:	Acetonitrilo/Agua/Isopropanol (25:65:15)
Columna:	Symmetry C18 3.9 x 150 mm, 5 μ m de tamaño de partícula.
Flujo:	1.5 mL/min
Vol. de Inyección:	80 μ L
Detección para el 17 β -Estradiol:	Fluorescencia λ_{Ex} 281 nm - λ_{Em} 305 nm
Detección para la Progesterona:	UV 254 nm
Respuestas para el 17- β Estradiol:	Áreas
Respuesta para la Progesterona:	Áreas

Este método presentó ciertas limitaciones concernientes a la sensibilidad para el 17- β Estradiol (cuantificable hasta una concentración de 5 ng/mL), así como problemas en la cuantificación e identificación tanto del 17- β Estradiol como de la Progesterona, ya que

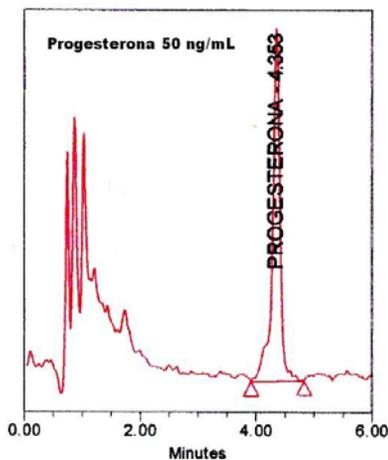
durante periodos de análisis largos, los tiempos de retención aumentaban, obligando a trabajar con tiempos de corrida mayores. (Cromatogramas 1, 2, 3 y 4).



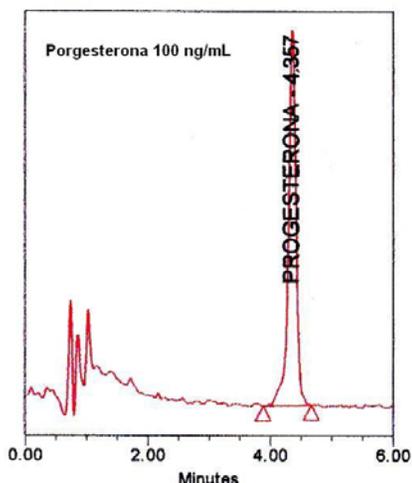
Cromatograma No.1 17- β Estradiol 5 ng/mL (Método Analítico 2)



Cromatograma No.2. 17- β Estradiol 10 ng/mL (Método Analítico 2)



Cromatograma No.3. Progesterona 50 ng/mL (Método Analítico 2)



Cromatograma No.4. Progesterona 100 ng/mL (Método Analítico 2)

Método Analítico 3

Se modifico nuevamente la polaridad de la fase móvil, se sustituyo la fase estacionaria y se modificó la velocidad de flujo dando como resultado el siguiente sistema cromatográfico:

Fase Móvil:	Acetonitrilo/Agua (30:70)
Columna:	Sinergy Hydro RP 4.0 x 20 mm, 2µm de tamaño de partícula.
Flujo:	2.0 mL/min
Vol. de Inyección:	80 µL
Detección para el 17 β-Estradiol:	Fluorescencia λ_{EX} 281 nm - λ_{Em} 305 nm
Detección para la Progesterona:	UV 254 nm
Respuestas:	Áreas

Sin embargo, bajo estas condiciones, el método aun presento problemas durante su aplicación, debido a una pobre resolución entre las señales del 17-β Estradiol y los componentes del vehículo empleado para dispersar las microesferas de la formulación.

Como propósito de este trabajo de tesis, se desarrolló un método analítico que presentara una mayor sensibilidad (detección de 2 ng/mL para el 17-β Estradiol y 20 ng/mL para la Progesterona), mayor resolución entre las señales del 17-β Estradiol y los componentes del vehículo y tiempos de análisis cortos tanto para el 17 β-Estradiol como para la Progesterona.

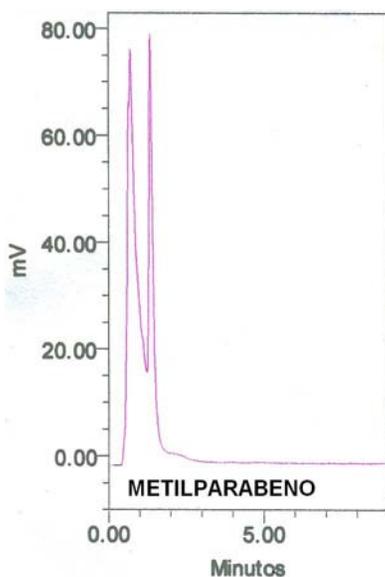
Desarrollo del Método

Considerando que los métodos anteriormente descritos no presentaron problemas para la cuantificación y detección de la Progesterona, el desarrollo del método se enfocó principalmente en resolver la resolución entre el 17- β Estradiol y el vehículo de la formulación.

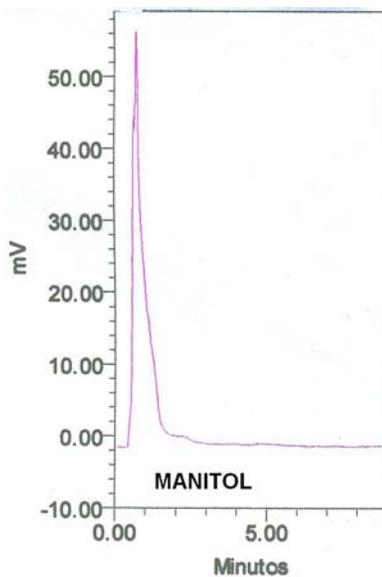
Por lo cual, el desarrollo del método se enfocó en los siguientes puntos:

- 1) La obtención de las condiciones cromatográficas adecuadas capaces de permitir la resolución entre el 17- β Estradiol y el vehículo de la formulación.
- 2) Obtener el menor tiempo de elución tanto del 17- β Estradiol como de la Progesterona en el análisis.
- 3) La selección del Intervalo de la Curva de Cuantificación
- 4) Tiempos de análisis cortos, sencillez en su ejecución, alta sensibilidad para la cuantificación del 17- β Estradiol (2 ng/mL) y la Progesterona (20 ng/mL).
- 5) Ser un método lineal, exacto y preciso tanto para el 17- β Estradiol, como para la Progesterona.

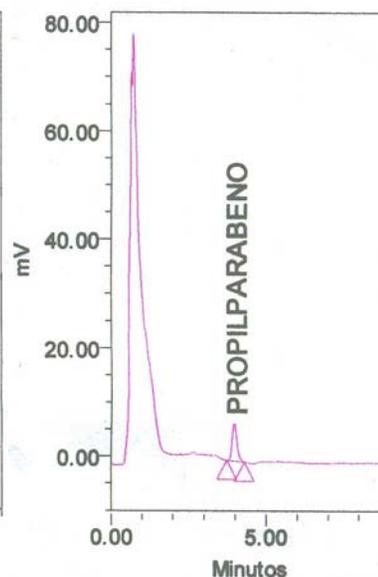
Partiendo de las condiciones cromatograficas descritas anteriormente (Método 3) y como primer paso en el desarrollo, fue necesario conocer los componentes del vehículo, para esto, se inyectaron por separado y se encontro que el propilparabeno era el principal componente en el vehiculo que debía ser resuelto del pico cromatografico del 17- β Estradiol.



Cromatograma No. 5
Metilparabeno,



Cromatograma No. 6
Manitol
(Método Analítico 3)



Cromatograma No. 7
Propilparabeno

Posteriormente se continuó con el desarrollo del método en el siguiente orden:

- Selección de Columna
- Selección de Fase Móvil y Velocidad de Flujo
- Selección de Condiciones de Detección para el 17-β Estradiol
- Selección de Volumen de Inyección

Selección de Columna

La selección de la columna, se basó en la afinidad de sus grupos funcionales con la molécula del 17 β-Estradiol y de la Progesterona. Para ello se realizó una investigación bibliográfica sobre métodos de separación de mezclas de esteroides por cromatografía de líquidos de alta resolución encontrándose referencias útiles en revistas de investigación científica como el “Journal of Pharmaceutical and Bimomedical Analysis” (31), el “Water Research” (32) y el “Journal of Chromatography A” (30, 37, 38), así como en catálogos de proveedores de refacciones y equipos cromatográficos (Waters Chromatography Columns and supplies Catalog y Agilent Chromatography Columns and supplies Catalog).

Se encontró que la columna más adecuada para la resolución entre el 17-β Estradiol y el vehículo de la formulación, es la Phenomenex Phenyl Hexyl, por poseer en sus cadenas grupos funcionales fenilo y hexilo, los cuales proporcionarían una mayor selectividad a través de las interacciones π de los anillos aromáticos del 17-β Estradiol y de la Progesterona con el anillo fenilo de la fase estacionaria y una mayor interacción con los compuestos hidrofóbicos presentes en la muestra debido a las interacciones de los puentes de hidrógeno por parte del grupo hexilo (Figura No 17).

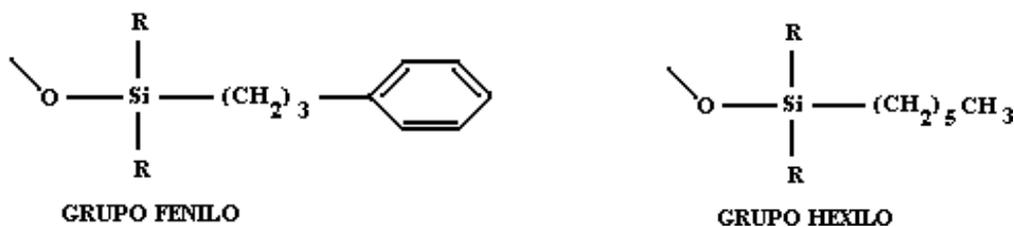
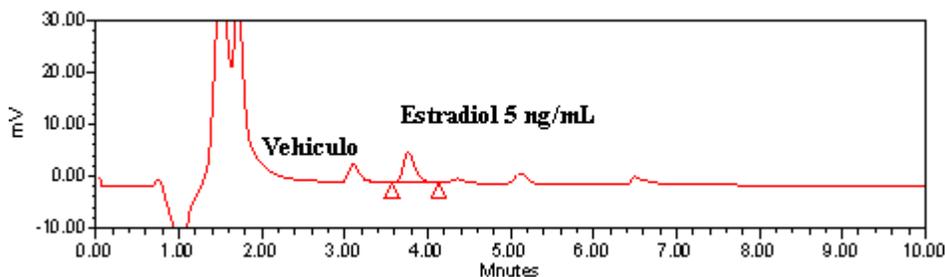
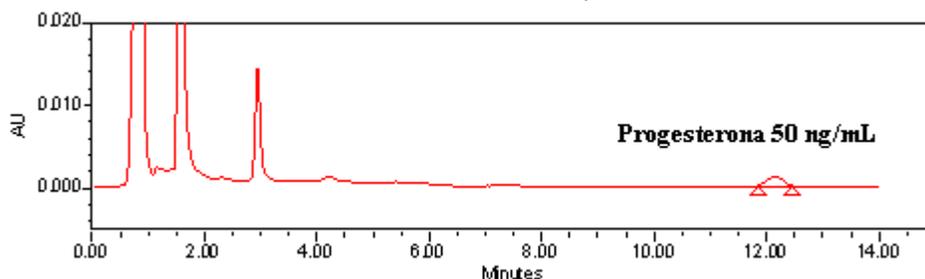


Figura No. 17 Grupos funcionales presentes en la columna Phenomenex Phenyl Hexyl

La columna seleccionada fue una Phenomenex Phenyl Hexyl con un diámetro interno de 4.6 mm, una longitud de 50 mm y un tamaño de partícula de 3 μm, pero al utilizarla bajo las condiciones cromatográficas descritas en el método analítico No 3, se observó que el tiempo de elución para la Progesterona era mayor a los 20 minutos, por consiguiente se decidió probar con una columna con las mismas características pero con un diámetro interno menor con el fin de disminuir el número de platos teóricos para la Progesterona y por consiguiente su tiempo de retención, encontrándose que la columna más adecuada es la Phenomenex Phenyl Hexyl con un diámetro interno de 2.0 mm, una longitud de 50 mm y tamaño de partícula de 3μm; obteniendo una buena resolución entre el 17-β Estradiol y el vehículo de la formulación y un tiempo de retención de 12 minutos para la Progesterona (Cromatograma 8 y 9)



Cromatograma No.8 17-β Estradiol 5 ng/mL (Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm)



Cromatograma No.9 Progesterona 50 ng/mL (Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μm)

Selección de Fase Móvil y Velocidad de Flujo

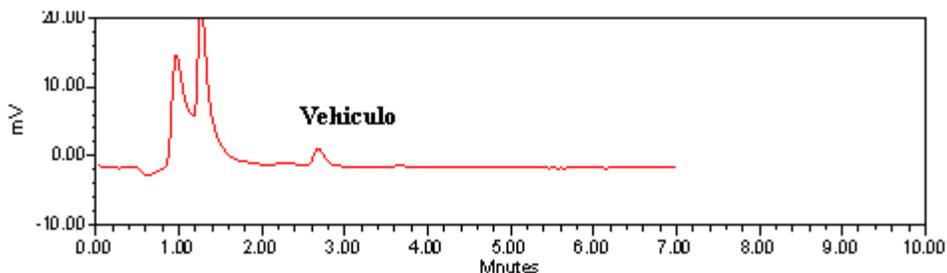
Para encontrar la fase móvil y la velocidad de flujo óptima, para obtener una buena resolución entre el 17-β Estradiol y el vehículo de la formulación, así como el menor tiempo de elución para la Progesterona, se probaron fases móviles a diferentes velocidades de flujo descritas en la tabla No.4

Tabla No 4. Condiciones de Fase Móvil y Flujo

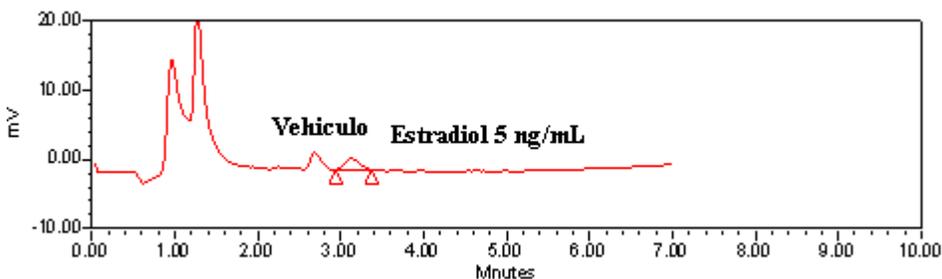
Fase Móvil	Flujo
Acetonitrilo/Agua (25:75)	0.6 mL/min
Acetonitrilo/Agua (20:80)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Agua (30:70)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Agua (30:70)	0.6 mL/min
Acetonitrilo/Agua (30:70)	0.65 mL/min
Acetonitrilo/Metanol/Agua (30:40:30)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Metanol/Agua (25:35:40)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Metanol/Agua (40:30:30)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Metanol/Agua (30:30:40)	0.4 mL/min
Acetonitrilo/Metanol/Agua (20:05:75)	0.4 mL/min

Al probar las fases móvil Acetonitrilo:Agua (25:75) a flujo de 0.6 mL/min y Acetonitrilo:Agua (20:80) a flujo de 0.4 mL/min, no presentaron una buena resolución entre el 17-β Estradiol y los componentes del vehículo. Al utilizar la fase móvil Acetonitrilo:Metanol:Agua en las proporciones (30:40:30), (25:35:40), (40:30:30),

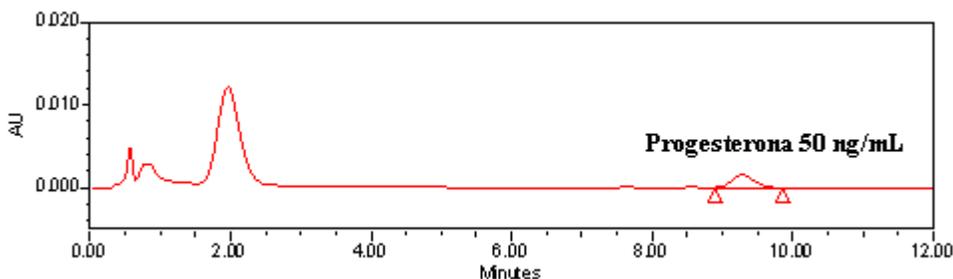
(30:30:40) y (20:05:75) a flujo de 0.4 mL, se observó que la línea base se desestabiliza debido a la presencia del Metanol aún cuando la proporción de este fuera pequeña; afectando el equilibrio entre la fase estacionaria y dificultando la cuantificación del 17- β Estradiol, por lo tanto se eliminó de la fase móvil y al utilizar la fase móvil Acetonitrilo:Agua en la proporción (30:70) a flujo de 0.4, 0.6, y 0.65 mL/min, se observo una buena resolución entre el 17- β Estradiol y los componentes del vehículo. La mejor resolución entre el 17- β Estradiol y los componentes del vehículo se encontró a un flujo de 0.65 mL/min (cromatogramas 10 y 11), también se puede apreciar que al inyectar la progesterona bajo las condiciones de fase móvil Acetonitrilo:Agua (30:70) a flujo de 0.65 mL/min el tiempo de elución de la Progesterona fue de alrededor de 9 minutos (cromatograma 12), por lo cual la fase móvil y velocidad de flujo más adecuadas fueron Acetonitrilo:Agua (30:70) a flujo de 0.65 mL/min .



Cromatograma No.10 Vehiculo (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μ m)



Cromatograma No.11 17- β Estradiol 5 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μ m)



Cromatograma No.12 Progesterona 50 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μ m)

Durante corridas prolongadas se observo que el tiempo de elución de la Progesterona era afectada por la temperatura ambiente, específicamente durante la noche, por lo cual se decidió controlar la temperatura de trabajo a 35°C para mantener el tiempo de elución de la misma

Selección de Condiciones de Detección para el 17-β Estradiol

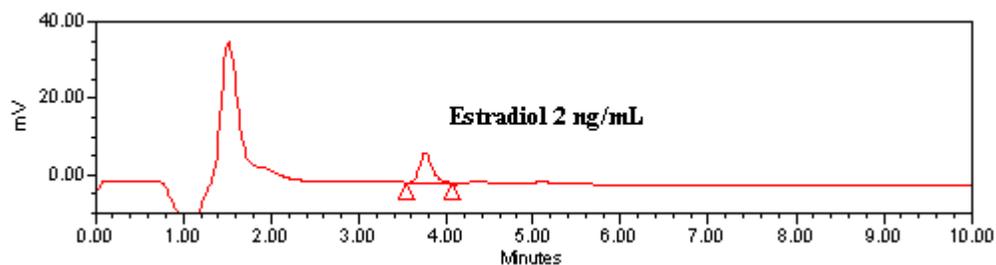
Con el fin de aumentar la sensibilidad del método analítico para poder cuantificar concentraciones pequeñas de 17-β Estradiol (2 ng/mL) se decidió probar algunos parámetros propios del detector de fluorescencia como son la ganancia (GAIN) y la atenuación (ATTEN).

Para encontrar las condiciones de ganancia y atenuación más adecuadas se trabajo a una concentración de 2 ng/mL de 17-β Estradiol bajo las condiciones descritas en tabla No. 5.

Tabla No.5 Condiciones de Atenuación y Ganancia

GAIN	ATTEN
100	128
1000	256
100	32
10	64
1	128
1000	1
100	256

Al emplear las condiciones de ATTEN 64, GAIN 10 y ATTEN 128, GAIN 1 respectivamente no se obtuvo una señal significativa, que pudiera ser cuantificada. Las condiciones de ATTEN 32, GAIN 100 y ATTEN 256, GAIN 100, se presento una débil señal debida al 17-β Estradiol la cual dificulta su correcta integración y cuantificación. Por otro lado bajo las condiciones de ATTEN 256, GAIN 1000 y ATTEN 1, GAIN 1000 se observaron señales debidas al 17-β Estradiol de mayor magnitud a las anteriores pero a la vez presentaron una línea base ruidosa, lo cual dificultò una adecuada integración de la señal y por último, bajo las condiciones de ATTEN 128 y GAIN de 100 se obtuvo una señal aceptable en lo concerniente al 17 β-Estradiol ya que presenta una línea base estable, sin señales de ruido significativas, permitiendo una adecuada integración (cromatograma 13), por lo cual se consideró como la condición de detección más adecuada a utilizar en el detector de fluorescencia para la cuantificación del 17-β Estradiol.

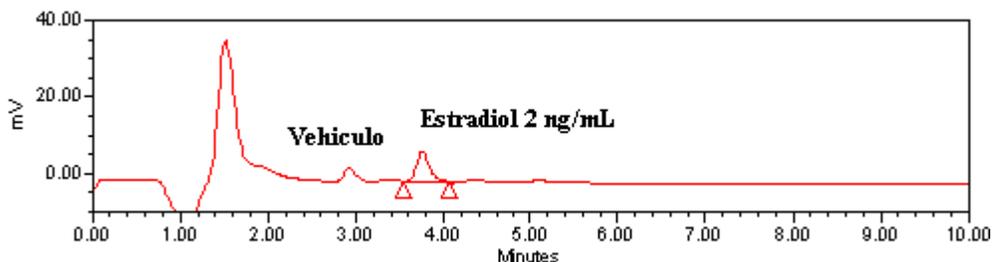


Cromatograma No. 13 17- β Estradiol 2 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μ m, Atten 128, Gain 100, 35 °C)

Selección de Volumen de Inyección

Como el analito limitante para el método analítico es el 17- β Estradiol por el nivel de concentración en relación con la Progesterona, la búsqueda del volumen de inyección estuvo en función de la señal dada por este, ya que no se observó ningún problema en cuanto a la detección y cuantificación para la Progesterona.

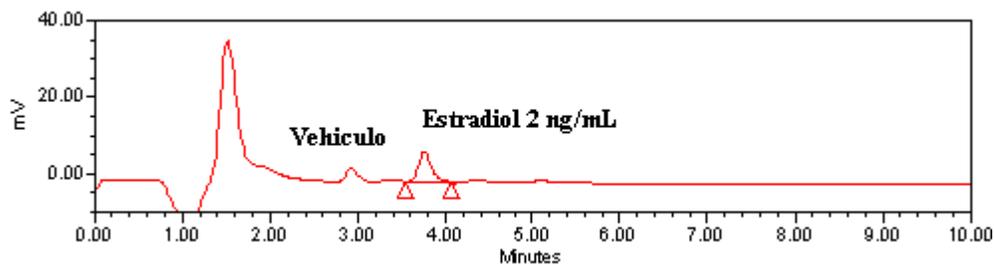
Se probaron bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas los siguientes volúmenes de inyección: 30, 50, 80 y 100 μ L encontrándose como volumen de inyección óptimo 80 μ L (Cromatograma 14) y no mayores a este, ya que se observó que al trabajar bajo volúmenes de inyección mayores (100 μ L) se sobrepasó la capacidad de carga de la columna y esta se saturó.



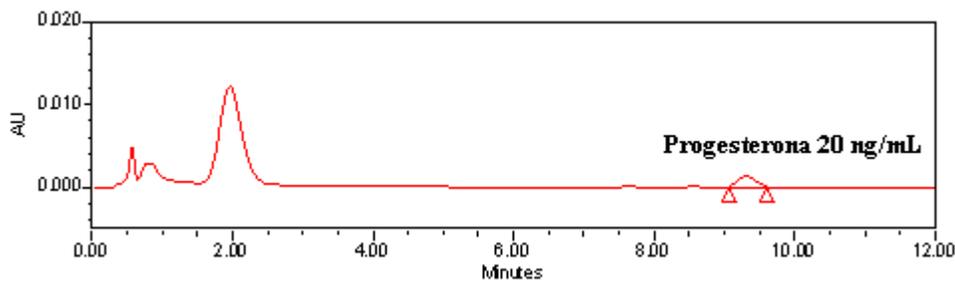
Cromatograma No. 14 17- β Estradiol 2 ng/mL (Fase Móvil Acetonitrilo/Agua (30:70), Flujo 0.65 mL/min, Columna Phenomenex Phenyl Hexyl 2.0 x 50 mm, 3 μ m, Atten 128, Gain 100, 80 μ L, 35 °C)

Finalmente las condiciones cromatográficas óptimas para obtener una mayor sensibilidad, una resolución adecuada entre el 17- β Estradiol y el vehículo de la formulación, así como el menor tiempo de elución para el 17- β Estradiol y la Progesterona (Cromatograma 15 y 16) en el método fueron las siguientes:

Fase Móvil:	Acetonitrilo/Agua (30:70)
Columna:	Phenomenex Phenyl Hexyl 50 x 2.0 mm, 3 μ m de tamaño de partícula.
Flujo:	0.65 mL/min
Temperatura:	35°C
Vol. de Inyección:	80 μ L
Detección para el 17 β -Estradiol:	Fluorescencia λ_{Ex} 281 nm - λ_{Em} 305 nm , GAIN 100 y ATTEN 128
Detección para la Progesterona:	UV 256 nm
Respuestas:	Áreas



Cromatograma No.15 17- β Estradiol 2 ng/mL



Cromatograma No.16 Progesterona 20 ng/mL

Posteriormente se procedió a buscar las condiciones de trabajo para el cual el método fuera lineal y sensible tanto para el 17 β -Estradiol como para la Progesterona y poder validar el método analítico y evaluar su confiabilidad y aplicación.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

SISTEMA

LINEALIDAD

La linealidad del sistema se evaluó, al determinar la relación entre la concentración de Progesterona o 17- β Estradiol “X” y la respuesta del 17- β Estradiol o Progesterona “Y”, preparando por triplicado curvas a partir de pesadas independientes, la preparación de las curvas se indica en la tabla No. 6.

Tabla No. 6 Curva Patrón

Identificación	Concentración del 17- β Estradiol (ng/mL)	Concentración de la Progesterona (ng/mL)
P1	2	20
P2	5	50
P3	10	100
P4	25	250
P5	50	500
P6	200	2000
P7	400	4000
P8	800	8000

Cálculos

Se realizó el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, donde la variable independiente “X” es la concentración nominal (ng/mL) del 17- β Estradiol o Progesterona y la variable dependiente “Y” es la respuesta (área absoluta), calculando los siguientes estadísticos para las tres curvas: Pendiente (B), ordenada al origen (A), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza al 95% de la pendiente (ICB), así como las gráficas de los datos y el porcentaje de error relativo por la regresión de los puntos de la curva. La linealidad se evaluó en los siguientes intervalos de: 2 a 800 ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.

Criterios de Aceptación

El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0.98, con un error relativo por la regresión de los puntos no mayor al 2% y el intervalo de confianza de la pendiente no debió incluir al cero.

PRECISION

Se preparó una solución a una concentración de 200 ng/mL de 17- β Estradiol y 2000 ng/mL de Progesterona y se inyectó por sextuplicado para realizar la prueba de adecuabilidad. Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones establecidas para la curva de calibración y muestras analíticas.

Cálculos

Se calculó el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación de la respuesta debe ser menor o igual al 2.0%.

MÉTODO

LINEALIDAD

Se evaluó la linealidad del método al determinar la relación que existe entre la concentración adicionada de 17-β Estradiol y/o Progesterona (X) contenidas en el vehículo utilizado y la concentración recuperada (Y), preparando tres concentraciones por triplicado a partir de pesadas independientes e interpolando los valores a curvas patrón en el rango de 8 a 200 ng/mL para 17-β Estradiol y de 80 a 2000 ng/mL para Progesterona (tabla No. 6).

Tabla No. 7 Muestras Adicionadas para la prueba de Linealidad del Método

Identificación	Concentración de 17-β Estradiol (ng/mL)	Concentración de la Progesterona (ng/mL)
MA	2	20
MB	100	1000
MC	800	8000

Cálculos

Con los datos que se obtuvieron se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados tanto para el 17-β Estradiol como para la Progesterona, utilizando como variable independiente “X” a la concentración adicionada (ng/mL) y como variable dependiente “Y” a la concentración recuperada (ng/mL), calculando lo siguiente: ordenada al origen (A), pendiente (B), coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de variación de la regresión, intervalo de confianza al 95% para la pendiente, intervalo de confianza al 95% de la ordenada al origen, así como la pendiente relativa y el porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación.

El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente (ICB) debe incluir a la unidad y el intervalo de confianza de la ordenada al origen (ICA) debe incluir el cero. La pendiente relativa debe encontrarse entre 0.98 y 1.02.

EXACTITUD

Para la exactitud del método, se calculó el porcentaje recuperado, para cada una de las réplicas de los niveles de concentración probados en la prueba de linealidad del método, el promedio del porcentaje recuperado para cada nivel de concentración probado y global, el coeficiente de variación del porcentaje recuperado y el intervalo de confianza al 95% para el porcentaje cuantificado.

Criterio de aceptación.

El promedio del porcentaje recuperado por nivel y global, así como el intervalo de confianza al 95%, deben encontrarse entre 98 y 102%, el coeficiente de variación debe ser menor al 2%.

PRECISION (Repetibilidad y Reproducibilidad)

Repetibilidad

De las muestras que se emplearon para evaluar la exactitud del método, se obtuvo el coeficiente de variación (C.V.) para cada nivel y el global, el cual debió ser menor o igual al 2%.

Reproducibilidad

Para la prueba de reproducibilidad, dos analistas prepararon su fase móvil, soluciones estándar y curva patrón, para analizar por triplicado las muestras indicadas en la tabla de preparación de muestras para la prueba de reproducibilidad. Estas se prepararon a partir de las soluciones madre preparadas por uno de los analistas, lo anterior se realizó durante dos días.

Tabla No. 8 Muestras para la Prueba de Reproducibilidad

Identificación	Concentración de 17-β Estradiol (ng/mL)	Concentración de la Progesterona (ng/mL)
RA	2	20
RB	100	1000
RC	800	8000

Cálculos

Con los datos obtenidos, se calculó el coeficiente de variación para cada nivel para los dos analistas en los dos días y el coeficiente de variación global para los dos analistas.

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación global del porcentaje cuantificado para los dos analistas en los dos días y el global debe ser menor o igual al 2.0%.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

A TEMPERATURA AMBIENTE

Para la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, se utilizaron las muestras preparadas por uno de los analistas de la prueba de reproducibilidad y se almacenaron a temperatura ambiente a ciclos normales de luz y oscuridad, analizándolas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

EN CONDICIONES DE REFRIGERACION

Para la estabilidad de las muestras en refrigeración, se utilizaron las muestras preparadas por uno de los analistas de la prueba de reproducibilidad y se almacenaron en refrigeración (2-8°C) y analizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas de su preparación.

Cálculos

Para cada tiempo de análisis se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las muestras y el valor absoluto de la diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado de cada uno de los tiempos analizados, con respecto al promedio del porcentaje cuantificado al tiempo cero.

Criterio de aceptación

La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado de las muestras en cada tiempo de análisis con respecto al porcentaje al tiempo cero no debe ser mayor al 2%, para ser consideradas estables dentro de las condiciones de almacenamiento.

ESPECIFICIDAD

Se prepararon las soluciones blanco de Tween 80 al 0.3%, de Fase móvil [Acetonitrilo: Agua (30:70)] y del Vehículo solo con Tween 80 al 0.3 % e inyectaron al sistema cromatográfico.

Criterio de aceptación

No se debe observar señal alguna por parte de las soluciones blanco en los tiempos de elución correspondientes al 17-β Estradiol o la Progesterona.

ROBUSTEZ

La prueba de Robustez del método se evaluó al cambiar las proporciones de la fase móvil a 25 partes de acetonitrilo HPLC y 75 partes de agua HPLC y al utilizar una velocidad de flujo de 0.68 mL/min.

Para ello, se utilizaron las soluciones muestras descritas en la linealidad del método.

Cálculos

Los cálculos se realizaron como se indica en la prueba de exactitud del método.

Con los datos de porcentaje recuperados y calculados, se determinó la media aritmética de la condición normal de operación (Y_0) y de cada condición de operación de prueba diferente a la condición normal (Y_i).

Se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de prueba respecto a la condición normal ($|d_i|$).

Criterio de Aceptación

El porcentaje global recuperado para cada nivel en la condición normal de operación y la condición de prueba debe encontrarse entre 98 y 102%.

La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de prueba respecto a la condición normal no debe ser mayor al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SISTEMA

LINEALIDAD

En las tablas 9 y 10 se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente “X” a la concentración (ng/mL) y como variable dependiente “Y” a la respuesta dada por el 17- β Estradiol o la Progesterona, en los intervalos de 2 a 800 ng/mL y de 20 a 8000 ng/mL respectivamente, se presenta la ecuación de la línea recta y los resultados estadísticos, donde el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98, el error relativo por la regresión de los puntos no es mayor al 2 % y el intervalo de confianza (ICB) al 95% de la pendiente no incluye al cero.

Tabla No. 9 Linealidad del Sistema para el 17-β Estradiol (Intervalo de 2 - 800 ng/mL)

Identificación de las Muestras	Concentración (ng/mL)	Respuesta	Concentración Cuantificada (ng/mL)	% Error
P1-1	2.0	9168	2.0	-1.3
P1-2	2.0	9421	2.0	1.3
P1-3	2.0	9238	2.0	-0.6
P2-1	5.0	24001	5.0	0.1
P2-2	5.0	24301	5.1	1.3
P2-3	5.0	23698	4.9	-1.2
P3-1	10.0	48603	10.0	0.3
P3-2	10.0	48931	10.1	0.9
P3-3	10.0	48318	10.0	-0.3
P4-1	25	123022	25.2	0.9
P4-2	25	122342	25.1	0.3
P4-3	25	122815	25.2	0.7
P5-1	50	245647	50.3	0.5
P5-2	50	240444	49.2	-1.6
P5-3	50	243937	49.9	-0.2
P6-1	200	982228	200.7	0.3
P6-2	200	977687	199.8	-0.1
P6-3	200	974274	199.1	-0.5
P7-1	400	1961983	400.8	0.2
P7-2	400	1969443	402.3	0.6
P7-3	400	1947445	397.8	-0.6
P8-1	800	3932032	803.0	0.4
P8-2	800	3913451	799.3	-0.1
P8-3	800	3904614	797.4	-0.3

Ecuación de la recta

$$y = 4897.0142 x - 499.6927$$

$$r^2 = 0.99998$$

Intervalo de Confianza al 95 % para la Ordenada al Origen y la Pendiente

	Ordenad al Origen	Pendiente
t Tablas	2.074	2.074
Límite Superior =	2420.7119	4906.0094
Límite Inferior =	-3420.0972	4888.0191

Tabla No. 10 Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo de 20 – 8000 ng/mL)

Identificación de las Muestras	Concentración (ng/mL)	Respuesta	Concentración Cuantificada (ng/mL)	% Error
P1-1	20.0	6772	19.7	-1.4
P1-2	20.0	6952	20.3	1.3
P1-3	20.0	6920	20.2	0.8
P2-1	50.0	16896	49.1	-1.9
P2-2	50.0	17444	50.7	1.3
P2-3	50.0	16986	49.3	-1.3
P3-1	100.0	33970	98.6	-1.4
P3-2	100.0	34890	101.2	1.2
P3-3	100.0	34566	100.3	0.3
P4-1	250.0	84853	246.0	-1.6
P4-2	250.0	86605	251.1	0.4
P4-3	250.0	86096	249.6	-0.2
P5-1	500.0	171132	496.1	-0.8
P5-2	500.0	172192	499.1	-0.2
P5-3	500.0	172671	500.5	0.1
P6-1	2000.0	692289	2006.5	0.3
P6-2	2000.0	692129	2006.0	0.3
P6-3	2000.0	692109	2006.0	0.3
P7-1	4000.0	1381191	4003.0	0.1
P7-2	4000.0	1374316	3983.1	-0.4
P7-3	4000.0	1380817	4002.0	0.0
P8-1	8000.0	2757966	7993.2	-0.1
P8-2	8000.0	2760865	8001.6	0.0
P8-3	8000.0	2762723	8007.0	0.1

Ecuación de la recta

$$y = 345.0446 x - 35.2225$$

$$r^2 = 0.999997$$

Intervalo de Confianza al 95 % para la Ordenada al Origen y la Pendiente

	Ordenada al Origen	Pendiente
t Tablas	2.074	2.074
Límite Superior =	855.8906	345.3191
Límite Inferior =	-926.3357	344.7701

En las Figuras 18 y 19 se aprecian los gráficos del análisis de regresión lineal donde se puede observar, que existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta debida al 17-β Estradiol o la Progesterona respectivamente.

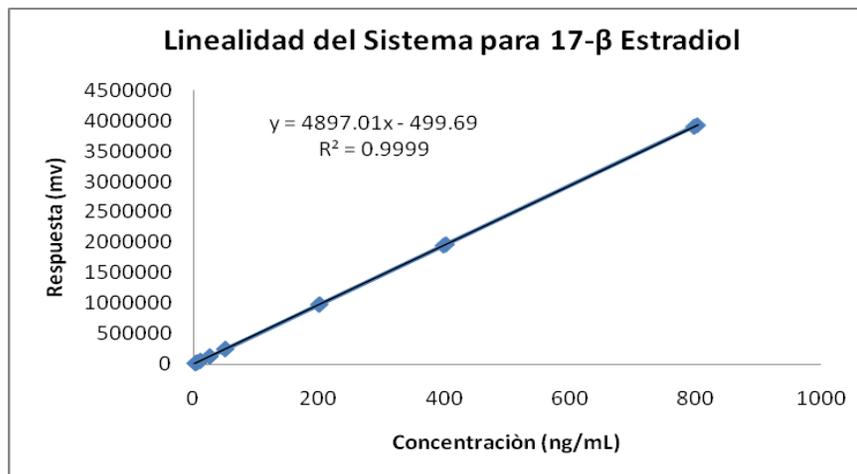


Figura No. 18 Gráfica de Linealidad del Sistema para 17-β Estradiol (Intervalo de 2 a 800 ng/mL)

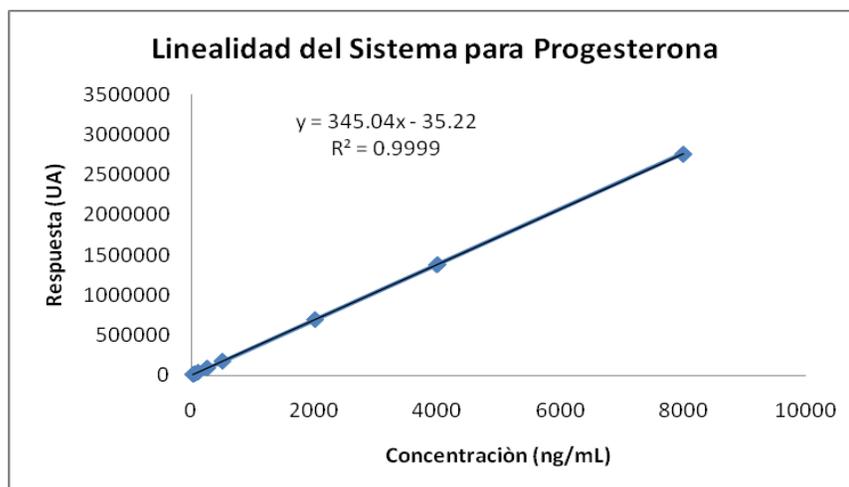


Figura No. 19 Gráfica de Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo de 20 a 8000 ng/mL)

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el sistema es lineal en los intervalos de 2 a 800 ng/mL para el 17-β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.

PRECISIÓN

Los resultados de la precisión del sistema se muestran en las Tablas 11 y 12, donde el C.V. de la respuesta no es mayor al 2%, por lo que se concluye que el sistema es preciso.

Tabla No. 11 **Precisión del Sistema para el 17- β Estradiol**

Identificación de las Muestras	Concentración (ng/mL)	Respuesta Área
SR1	200	795148
SR2	200	813618
SR3	200	793777
SR4	200	782391
SR5	200	797047
SR6	200	796094
n =		6
Promedio =		796346
D.E. =		10017
C.V. =		1.3

Tabla No. 12 **Precisión del Sistema para Progesterona**

Identificación de las Muestras	Concentración (ng/mL)	Respuesta Área
SR1	2000	635455
SR2	2000	635470
SR3	2000	643352
SR4	2000	644400
SR5	2000	644864
SR6	2000	640901
n =		6
Promedio =		640740
D.E. =		4312
C.V. =		0.7

MÉTODO

LINEALIDAD

En las tablas 13 y 14 se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente “X” a la concentración nominal (ng/mL) y como variable dependiente “Y” a la concentración cuantificada para el 17-β Estradiol o la Progesterona (ng/mL), se presenta la ecuación de la recta y los resultados estadísticos, donde se observa que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98.

Tabla No.13 Linealidad del Método para el 17-β Estradiol

Identificación de las Muestras	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración Cuantificada (ng/mL)
MA-1	2.0	1.9879
MA-2	2.0	1.9858
MA-3	2.0	1.9821
MB-1	100.0	98.5445
MB-2	100.0	98.6218
MB-3	100.0	98.5169
MC-1	800.0	800.4088
MC-2	800.0	797.3656
MC-3	800.0	801.0128

Ecuación de la Recta

$$y = 1.0002 x - 0.6918$$
$$r^2 = 1.0000$$
$$C.V. = 0.4$$

Intervalo de Confianza al 95 % para la Ordenada al Origen y la Pendiente

	Ordenada al Origen	Pendiente
t Tablas	2.365	2.365
Límite Superior =	0.5929	1.0030
Límite Inferior =	-1.9764	0.9975

Pendiente relativa

$$\text{Pend. Rel. (Bo)} = 1.0023$$

Tabla No. 14 Linealidad del Método para Progesterona

Identificación de las Muestras	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración Cuantificada (ng/mL)
MA-1	20.0	20.2493
MA-2	20.0	20.2461
MA-3	20.0	20.2038
MB-1	1000.0	1012.8231
MB-2	1000.0	1019.5141
MB-3	1000.0	1020.1481
MC-1	8000.0	8143.5352
MC-2	8000.0	8158.8939
MC-3	8000.0	8151.4031

Ecuación de la Recta

$$y = 1.00190 x - 0.7796$$

$$r^2 = 1.00000$$

$$C.V. = 0.2$$

Intervalo de Confianza al 95 % gl = 7 para la Ordenada al Origen y la Pendiente

	Ordenada al Origen	Pendiente
t Tablas	2.365	2.365
Límite Superior =	4.0593	1.0200
Límite Inferior =	-5.6185	1.0180

Pendiente Relativa

$$\text{Pend. Rel. (Bo)} = 1.0003$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen (IC-A), tanto para el 17-β Estradiol como para la Progesterona incluye al cero. En el caso del intervalo de confianza de la pendiente (IC-B) para el 17-β Estradiol incluye la unidad, mientras que para la Progesterona no. Para la pendiente de Progesterona, debido a que el intervalo de confianza de la pendiente (IC-B) no incluye a la unidad, se consideró el valor de la pendiente relativa **1.0003**, la cual debe encontrarse entre 0.98 y 1.02, de forma que cumple con el criterio de aceptación.

En las Figuras 20 y 21 se aprecian los gráficos del análisis de regresión lineal para el 17-β Estradiol y la Progesterona donde se puede observar, que existe una relación lineal entre la concentración adicionada (ng/mL) y la concentración cuantificada (ng/mL).

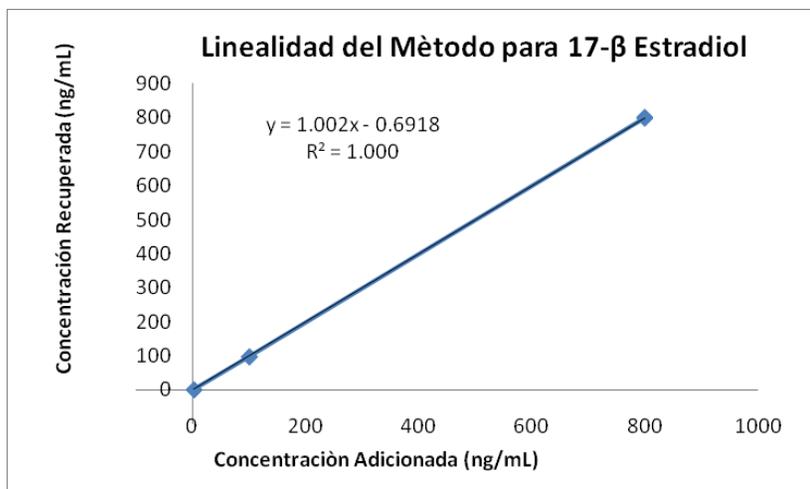


Figura No. 20 Gráfica de Linealidad del Método para 17-β Estradiol (Intervalo de 2 a 800 ng/mL)

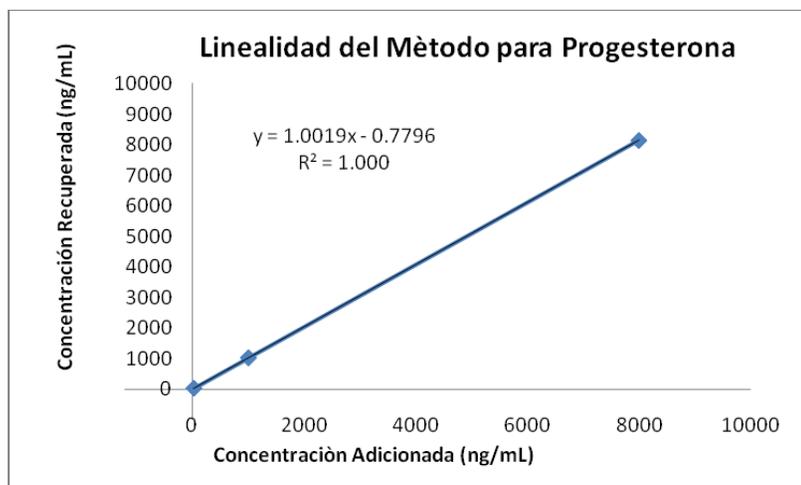


Figura No. 21 Gráfica de Linealidad del Método para Progesterona (Intervalo de 20 a 8000 ng/mL)

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el método es lineal en el intervalo de 2 a 800 ng/mL para el 17-β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.

EXACTITUD

En la tabla 15 y 16, se muestran los resultados de la evaluación de la exactitud del método, para el 17-β Estradiol y para la Progesterona, donde a partir de los ng/mL cuantificados, en la prueba de Linealidad del método, se calculó el porcentaje cuantificado para cada réplica en los niveles de concentración probados, los cuales se encuentran entre el 98 y 102%, así como el porcentaje global, por lo que se cumple con el criterio de exactitud del método.

PRECISION

Repetibilidad

En las tablas 15 y 16, se observan los resultados de la evaluación de la repetibilidad, donde el coeficiente de variación (C.V.) del porcentaje recuperado por nivel y el global no fue mayor al 2% , por lo cual, se concluye que el método es repetible.

Tabla No. 15 Exactitud y Repetibilidad del Método para 17- β Estradiol

Replica	Concentración Nominal 17 β -Estradiol (ng/mL)		
	2	100	800
	% Recuperado		
1	99.4	98.5	100.1
2	99.3	98.6	99.7
3	99.1	98.5	100.1
n =	3	3	3
Promedio =	99.3	98.6	99.9
D. E. =	0.1	0.1	0.2
C.V. =	0.1	0.1	0.2
Global			
n =	9		
Promedio =	99.3		
D.E. =	0.6		
C.V. =	0.6		

Intervalo de Confianza al 95% para el % Cuantificado

Límite Superior = 99.7 %

Límite Inferior = 98.8 %

Tabla No. 16

Exactitud y Repetibilidad de Método para Progesterona

	Concentración Nominal Progesterona (ng/mL)		
	20	1000	8000
Replica	% Recuperado		
1	101.2	101.3	101.8
2	101.2	102.0	102.0
3	101.0	102.0	101.9
n =	3	3	3
Promedio	101.2	101.7	101.9
D. E. =	0.1	0.4	0.1
C.V. =	0.1	0.4	0.1
Global			
n =	9		
Promedio =	101.6		
D.E. =	0.4		
C.V. =	0.4		

Intervalo de confianza al 95%, para el % Cuantificado

Límite Superior =	101.9	%
Límite Inferior =	101.3	%

Reproducibilidad

En las tablas 17 y 18 se muestran los resultados de la prueba de reproducibilidad realizada por dos analistas, en dos días, el coeficiente de variación global del porcentaje cuantificado para cada nivel probado y para cada analista tanto para el 17-β Estradiol como para la Progesterona, no fue mayor al 2%, por lo cual se considera que el método es reproducible.

Tabla No. 17

Reproducibilidad del Método para 17 β-Estradiol

Porcentaje Cuantificado

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
2.0	99.9	100.6	101.5	101.9
2.0	100.3	100.9	99.9	99.7
2.0	100.2	99.3	100.1	101.1
n	3	3	3	3
Promedio	100.1	100.3	100.5	100.9
D.E.	0.2	0.9	0.9	1.1
C.V.	0.2	0.9	0.9	1.1
n	12			
Promedio	100.5			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
100.0	99.1	100.3	101.3	99.6
100.0	100.8	99.7	101.1	99.3
100.0	99.5	98.5	101.1	99.1
n	3	3	3	3
Promedio	99.8	99.5	101.2	99.4
D.E.	0.9	0.9	0.1	0.2
C.V.	0.9	0.9	0.1	0.2
n	12			
Promedio	100.0			
D.E.	0.9			
C.V.	0.9			

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
800.0	101.2	99.8	101.8	101.0
800.0	100.5	99.2	101.3	99.4
800.0	98.9	98.8	101.3	99.3
n	3	3	3	3
Promedio	100.2	99.2	101.5	99.9
D.E.	1.2	0.5	0.3	1.0
C.V.	1.2	0.5	0.3	1.0
n	12			
Promedio	100.2			
D.E.	1.1			
C.V.	1.1			

Tabla No. 18 Reproducibilidad del Método para Progesterona
Porcentaje Cuantificado

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
20.0	99.2	101.5	101.3	101.4
20.0	100.4	100.9	101.0	101.1
20.0	100.1	100.1	99.3	99.4
n	3	3	3	3
Promedio	99.9	100.8	100.5	100.7
D.E.	0.6	0.7	1.1	1.1
C.V.	0.6	0.7	1.1	1.1
n	12			
Promedio	100.5			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1000.0	99.8	99.7	100.1	99.6
1000.0	100.2	99.4	99.8	99.6
1000.0	99.1	99.0	101.5	100.9
n	3	3	3	3
Promedio	99.7	99.4	100.5	100.0
D.E.	0.6	0.3	0.9	0.8
C.V.	0.6	0.3	0.9	0.8
n	12			
Promedio	99.9			
D.E.	0.7			
C.V.	0.7			

Nivel (ng/mL)	Analista A		Analista B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
8000.0	99.4	99.7	100.9	100.6
8000.0	100.3	99.6	100.8	101.4
8000.0	99.3	99.7	101.4	101.3
n	3	3	3	3
Promedio	99.7	99.7	101.0	101.1
D.E.	0.5	0.1	0.3	0.4
C.V.	0.5	0.1	0.3	0.4
n	12			
Promedio	100.4			
D.E.	0.8			
C.V.	0.8			

ESPECIFICIDAD

En las figuras 22 a 29, podemos observar las soluciones blanco preparados para la prueba de Especificidad tanto para el 17- β Estradiol como para la Progesterona, las cuales, no presentan señal alguna que interfiera con la señal cromatográfica. Por consiguiente, el método se considera específico para la cuantificación del 17- β Estradiol y Progesterona.

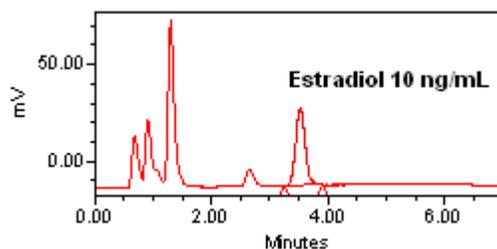
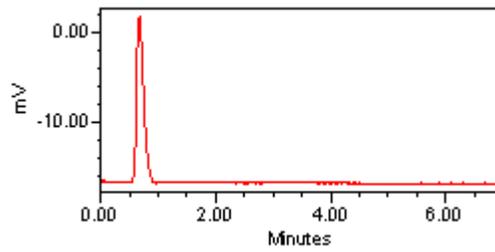
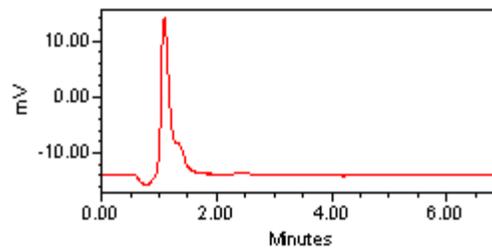


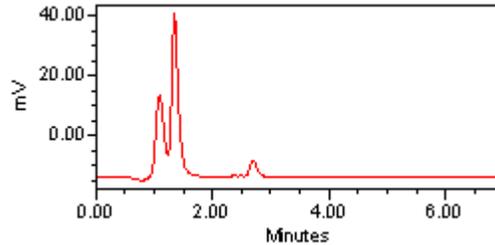
Figura No. 22 Cromatograma Típico del 17- β Estradiol



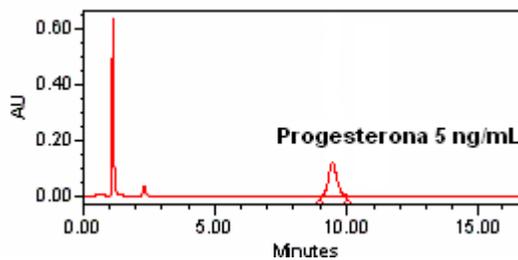
Cromatograma No 17. Fase Móvil (Acetonitrilo/ Agua (30:70)) (Especificidad para 17-β Estradiol)



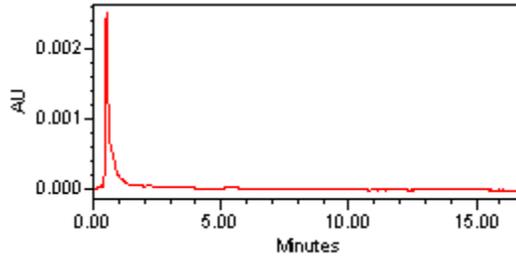
Cromatograma No. 18 Solución Tween 80 al 0.3% (Especificidad para 17-β Estradiol)



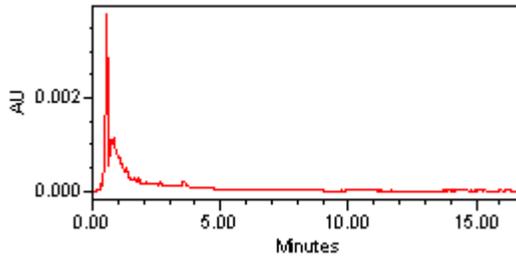
Cromatograma No.19 Vehículo de la Formulación (Especificidad para 17-β Estradiol)



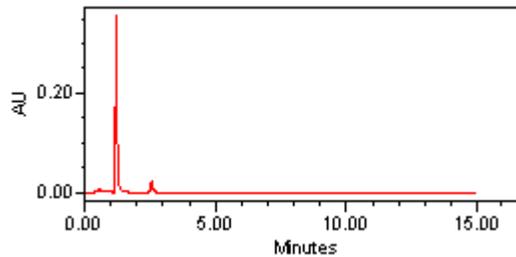
Cromatograma No.20 Típico de Progesterona



**Cromatograma No. 21 Fase Móvil (Acetonitrilo/ Agua (30:70))
(Especificidad para Progesterona)**



**Cromatograma No. 22 Solución Tween 80 al 0.3 %
(Especificidad para Progesterona)**



**Cromatograma No. 23 Vehículo de la Formulación
(Especificidad para Progesterona)**

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

A TEMPERATURA AMBIENTE

En las tablas 19 y 20, se muestran los resultados de la prueba de estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, en ellas se observa que la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial para todos los niveles de concentración para el 17- β Estradiol probados, no es mayor al 2%, hasta las 72 horas y para todos los niveles de concentración de Progesterona probados, no es mayor al 2% hasta las 96 horas.

Tabla No. 19

**Estabilidad de Muestras de 17-β Estradiol
(Temperatura Ambiente)**

NIVEL 2 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	101.4	-----
24	101.2	0.2
48	100.6	0.8
72	100.7	0.7
96	80.4	21.0

NIVEL 100 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.6	-----
24	100.0	1.4
48	98.9	0.3
72	98.0	0.6
96	96.9	1.7

NIVEL 800 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.2	-----
24	100.3	1.1
48	99.6	0.4
72	99.7	0.5
96	98.6	0.6

Tabla No. 20

**Estabilidad de Muestras de Progesterona
(Temperatura Ambiente)**

NIVEL 20 g/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.8	-----
24	101.3	0.5
48	100.7	0.1
72	100.4	0.4
96	100.2	0.6

NIVEL 1000 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.0	-----
24	100.4	1.4
48	100.1	1.1
72	100.4	0.5

NIVEL 8000 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.9	-----
24	100.0	1.1
48	100.0	1.1
72	99.9	1.0
96	99.0	0.1

EN REFRIGERACIÓN.

En las tablas 21 y 22, se muestran los resultados de la prueba de estabilidad de las muestras en refrigeración (2-8 °C), en ellas se observa que la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial para todos los niveles de concentración para el 17-β Estradiol probados, no es mayor al 2%, hasta las 72 horas y para todos los niveles de concentración de Progesterona probados, no es mayor al 2% hasta las 96 horas.

Tabla No. 21 Estabilidad de Muestras de 17 β Estradiol (Refrigeración)

NIVEL 2 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	101.4	-----
24	100.6	0.8
48	100.7	0.7
72	100.3	1.1
96	72.9	28.5

NIVEL 100 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.6	-----
24	100.1	1.5
48	99.1	0.5
72	98.4	0.2
96	92.4	6.2

NIVEL 800 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.2	-----
24	100.3	1.1
48	99.0	0.2
72	99.6	0.4
96	97.5	1.7

Tabla No. 22 Estabilidad de Muestras de Progesterona (Refrigeración)

NIVEL 20 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.8	-----
24	101.4	0.6
48	100.5	0.3
72	100.1	0.7
96	100.7	0.1

NIVEL 1000 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.0	-----
24	99.5	0.5
48	99.5	0.5
72	100.3	1.3
96	99.5	0.5

NIVEL 8000 ng/mL

Tiempo Horas	Promedio % Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.9	-----
24	100.0	1.1
48	99.9	1.0
72	99.9	1.0
96	99.4	0.5

ROBUSTEZ.

Cambio de Fase Móvil Acetonitrilo : Agua (25:75)

En las tablas 23 a 28 se muestran los resultados del porcentaje de cuantificación debido al cambio de fase móvil y se observa que para todos los niveles de concentración probados, tanto para el 17-β Estradiol como para la Progesterona se encuentran dentro del 98 y 102%, el CV para cada nivel y el CV global son menores al 2% y la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de prueba con respecto a la condición normal no es mayor al 2%.

Tabla No. 23 Robustez del Método para cuantificar 17-β Estradiol (Cambio de Fase Móvil)

Concentración Nominal (ng/mL)	Condición Normal Yo			Condición de Prueba Yi		
	2	100	800	2	100	800
Replica	% Cuantificado			% Cuantificado		
1	100.3	100.6	100.9	101.1	99.6	101.7
2	101.4	100.3	101.1	99.8	98.5	101.9
3	100.7	101.2	101.1	99.4	99.2	101.9
n =	3	3	3	3	3	3
Promedio	100.8	100.7	101.0	100.1	99.1	101.8
D.E.	0.5	0.4	0.1	0.9	0.6	0.1
C.V.	0.5	0.4	0.1	0.9	0.6	0.1

Yo = Condición Normal, utilizando ACN:Agua (30:70)

Yi = Condición de Prueba, utilizando ACN:Agua (25:75)

Tabla No. 24 Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar 17-β Estradiol (Cambio de Fase Móvil)

Identificación de Muestras	% Cuantificado			
	n	Promedio Yo	Promedio Yi	/di/
MA	3	100.8	100.1	0.7
MB	3	100.7	99.1	1.6
MC	3	101.0	101.8	0.8

Tabla No. 25 Robustez del Método para cuantificar Progesterona (Cambio de Fase Móvil)

Concentración Nominal (ng/mL)	Condición Normal Yo			Condición de Prueba Yi		
	20	1000	8000	20	1000	8000
Replica	% Cuantificado			% Cuantificado		
1	101.9	99.9	100.5	101.1	100.1	100.8
2	101.3	100.5	100.1	100.9	98.9	101.1
3	99.6	100.5	100.0	99.6	100.7	100.6
n =	3	3	3	3	3	3
Promedio	100.9	100.3	100.2	100.5	99.9	100.8
D.E.	1.2	0.4	0.3	0.8	0.9	0.3
C.V.	1.2	0.4	0.3	0.8	0.9	0.3

Yo = Condición Normal, utilizando ACN:Agua (30:70)

Yi = Condición de Prueba, utilizando ACN:Agua (25:75)

Tabla No. 26 Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar Progesterona (Cambio de Fase Móvil)

Identificación de Muestras	% Cuantificado			
	n	Promedio Yo	Promedio Yi	/di/
MA	3	100.9	100.5	0.4
MB	3	100.3	99.9	0.4
MC	3	100.2	100.8	0.6

Cambio de Flujo (0.68 mL/min)

En las tablas 29 a 34 se muestran los resultados del porcentaje de cuantificación debido al cambio de flujo, donde se observa que para cada replica en todos los niveles de concentración probados, tanto para el 17- β Estradiol como para la Progesterona se encuentran dentro del 98 y 102%, el CV para cada nivel y la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de prueba respecto a la condición normal no es mayor al 2%.

Tabla No. 27 Robustez del Método para cuantificar 17- β Estradiol (Cambio de Flujo 0.68 mL/min)

Concentración Nominal (ng/mL)	Condición Normal Yo			Condición de Prueba Yi		
	2	100	800	2	100	800
Replica	% Cuantificado			% Cuantificado		
1	100.3	100.6	100.9	100.6	100.0	100.1
2	101.4	100.3	101.1	100.9	100.0	100.3
3	100.7	101.2	101.1	100.0	101.3	101.3
n =	3	3	3	3	3	3
Promedio	100.8	100.7	101.0	100.5	100.4	100.6
D.E.	0.5	0.4	0.1	0.5	0.7	0.6
C.V.	0.5	0.4	0.1	0.5	0.7	0.6

Yo = Condición Normal, utilizando flujo de 0.65 mL/min.

Yi = Condición de Prueba, utilizando flujo de 0.68 mL/min.

Tabla No. 28 Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar 17- β Estradiol (Cambio de Flujo 0.68 mL/min)

Identificación de Muestras	% Cuantificado			
	n	Promedio Yo	Promedio Yi	/di/
MA	3	100.8	100.5	0.3
MB	3	100.7	100.4	0.3
MC	3	101.0	100.6	0.4

**Tabla No. 29 Robustez del Método para cuantificar Progesterona
(Cambio de Flujo 0.68 mL/min)**

Concentración Nominal (ng/mL)	Condición Normal Yo			Condición de Prueba Yi		
	20	1000	8000	20	1000	8000
Replica	% Cuantificado			% Cuantificado		
1	101.9	99.9	100.5	101.0	100.4	100.9
2	101.3	100.5	100.1	100.0	100.0	101.7
3	99.6	100.5	100.0	100.7	100.8	101.0
n =	3	3	3	3	3	3
Promedio	100.9	100.3	100.2	100.6	100.4	101.2
D.E.	1.2	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4
C.V.	1.2	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4

Yo = Condición Normal, utilizando flujo de 0.65 mL/min.

Yi = Condición de Prueba, utilizando flujo de 0.68 mL/min.

**Tabla No. 30 Diferencia Absoluta de la Robustez del Método para cuantificar
Progesterona
(Cambio de Flujo 0.68 mL/min)**

Identificación de Muestras	% Cuantificado			
	n	Promedio Yo	Promedio Yi	/di/
MA	3	100.9	100.6	0.3
MB	3	100.3	100.4	0.1
MC	3	100.2	101.2	1.0

Por tanto, podemos concluir que el método es robusto al cambio en la composición de la Fase Móvil, al cambio de Flujo y al cambio de Temperatura, sin embargo, para fines de análisis, conviene utilizar las condiciones normales con las cuales se validó el método.

CONCLUSIONES

- El método analítico es selectivo a los componentes del vehículo y del medio de disolución para el 17- β Estradiol como para la Progesterona.
- El método es específico a la cuantificación del 17- β Estradiol y de la Progesterona.
- El método presenta una sensibilidad superior a los métodos analíticos anteriormente desarrollados, presentando una sensibilidad de 2 ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 ng/mL para la Progesterona.
- El sistema es lineal, en los intervalos de 2 a 800 ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.
- El sistema es preciso, con un coeficiente de variación de respuesta no mayor al 2%.
- El método es lineal, en los intervalos de 2 a 800 ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.
- El método es exacto al demostrar que el porcentaje cuantificado en cada réplica de los niveles de concentración probados se encuentran entre el 98 y 102% en el intervalo de cuantificación de 2 a 800ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.
- El método es reproducible al presentar un coeficiente de variación global no mayor al 2%, en el intervalo de cuantificación 2 de a 800 ng/mL para el 17- β Estradiol y de 20 a 8000 ng/mL para la Progesterona.
- Las muestras conteniendo 17- β Estradiol al ser almacenadas en refrigeración (2-8 °C) o temperatura ambiente (20-25 °C) son estables hasta 72 horas.
- Las muestras conteniendo Progesterona al ser almacenadas en refrigeración (2-8 °C) o temperatura ambiente (20-25 °C) son estables hasta 96 horas.
- El método es robusto al cambio de fase móvil de Acetonitrilo:agua (25:75), al cambio de temperatura de la columna de 37.5 °C y al cambio de la velocidad de flujo a 0.68 mL/min.

BIBLIOGRAFÍA

Libros:

- 1- **Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop**, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3er Edition, Pharmaceutical Press, Great Britain, 2004, páginas 986, 1485 y 1486.
- 2.- **THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION**; The United States Pharmacopeia, 29 ed; The National Formulary 24 ed. Rockville MD., U.S.A., 2006, páginas 2639, 3052.
- 3.- **R.W. Yost, L.S. Ettre, R.D. Conlon**, Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica, PERKIN-ELMER, U.S.A.,1918; páginas 3-5
- 4.- **Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Abelaira, Raúl Laba**, Introducción a la HPLC Aplicación y Practica, Artes Gráficas Farro S.A., California; 1992, páginas 3-7, 10
5. **Skoog D.** Introducción a las separaciones analíticas en Fundamentos de química analítica. Barcelona. Ed. Reverte S.A. 4ª edición., 1997, página 373
6. **Romero García Aida Susana** Cromatografía, Curso de Métodos Instituto de Biotecnología, UNAM, Semestre 2/2002.
7. **Comisión de Validación de Métodos Analíticos**, Métodos Analíticos Guía de Validación, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. 2002.
8. **Alfonso R. Genaro**, Farmacía, 20ª Edición, Tomo 1, Editorial Panamericana, 2003, páginas 705 -708, 723 -727, 741 – 742.
9. **Alfonso Velasco Martín**, Farmacología Fundamental, McGraw-Hill Interamericana, España, 2004, páginas 660-664
10. **Alfred Goodman Gilman**, Las bases farmacológicas de la terapéutica, Editorial Panamericana, Octava edición, Argentina, 1991, páginas 1340-1355.
11. **Alfred Goodman Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies,Palmer Taylor**. GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS , 8 th Edition, McGraw-Hill Inc., 1993, páginas 1384 - 1395.
12. **Georg G. Guilbault**, FLUORESCENCE. Theory, Instrumentation, and Practice, Marcel Dekker, Inc., New York, 1967, páginas 37 - 52
13. **Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog** 1999 – 2000, páginas 52, 55, 112

Revistas:

14. Lucie Nováková, Petr Solich, A comparison of performance of various analytical columns in pharmaceutical analysis: conventional C₁₈ and high throughput C₁₈ Zorbax columns, Journal of Chromatography A, (2005) páginas 24 – 31.

15. R. Gatti, M.G. Gioia, A.M. Di Pietra, V. Cavrini, HPLC-fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals, Pharmaceutical and Biomedical Analysis 18 (1998) páginas 87 – 192.

16. Yeomin Yoon, Paul Westerhoff, Shane A. Snyder, Mario Esparza. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl Estradiol on powdered activated carbon, Water Research 37 (2003), páginas 3530 – 3537.

17. Florey K; Analytical Profiles of Drug Substances, vol 15, Academic Press, U.K. 1986, páginas 286 – 312.

18. Mills, T., Roberson, J. C. , Instrumental Data for Drugs Analysis, 2nd ediction, Elseiver Science Publishing In.c vol, 2, 3, U.S.A. 1987, páginas 835, 1938 – 1939.

19. Maria J. López de Alda, Damia Barcelo. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupted in water by liquid chromatography – diode array detection – mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 892 (200), páginas 391 – 406.

20. Jianying Hu, Haifeb Zhang, Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1070 (2005) páginas 221 – 224.

21. R.S. Mathur, A.B. Leaming and H.O. Williamson, An assessment of the total estron stradiol 17 β and estriol in high risk pregnancy plasma, Journal of Steroid Biochemistry, Volumen 6, Issue 10, October 1975, páginas 1421 – 1427

22. Vinop P. Shah, Kamal K. Midha, Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 81, No.3, March 1992, páginas 309 – 312.

Tesis:

23. Francisco Vidal Tovar Lopez, “Desarrollo de un método para cuantificar Lisinopril en orina utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución”, México D.F., 2004; páginas 19-23

24. Leticia Mayumi Hoshinko Hayashida, “Desarrollo de un Método Analítico para cuantificación de Estradiol y Progesterona en Perfiles de Disolución de Microesferas”, México D.F., 1996, página 1

25. Ernesto Ortega Escamilla, Estudio Comparativo de la Farmacocinética de la Liberación y Biodisponibilidad de Formulaciones de Microesferas de Estradiol y Estradiol-Colesterol en diferentes proporciones en conejos machos Nueva Zelanda, México D.F., 2004, página 2

26. Ana Belem Trujeque García, “Desarrollo de Métodos Analíticos y Estudios de Estabilidad para Sulfametazina Sodica en materia prima y plasma. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la cuantificación de Sulfametazina en plasma de Cabra por CLAR”, Facultad de Estudios superiores Cuautitlan, 1998, páginas 24- 27.

27. Juan Manuel Jiménez Vargas, “Desarrollo y Validación de un Método Analítico para cuantificar Doxicilina en plasma mediante CLAR”, Facultad de Química, Mexico D.F., 2006, páginas 4 – 23.

28. Delia Reynoso Rodriguez, Gregorio Ruben Tecuapetla Chantes “ Metodología para determinar hidrocarburos poliaromaticos (HPA´S) en muestras de suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, 2000, páginas 20 – 34.

Paginas Web:

29. Biopsicologia.net “ 7.1 ESTROGENOS – N3: Participación Funcional – psicobiologia net ” http://www.biopsicologia.net/fichas/page_906.html

30. Biopsicologia.net “ 7 HORMONAS ESTEROIDES – N3: Participación Funcional – psicobiologia net ” http://www.biopsicologia.net/fichas/page_893.html

31. Biopsicologia.net “ 7.2 PROGESTAGENOS – N3: Participación Funcional – psicobiologia net ” http://www.biopsicologia.net/fichas/page_930.html

32. Biopsicologia.net “ Ruta 17: Ciclo del colesterol y de los esteroides – ciclos metabolicos – N2: glosario - psicobiologia net” <http://www.biopsicologia.net/fichas/fic-17-4.html>

33. Wikipedia The Free Encyclopedia “Van Deemter equation” http://en.wikipedia.org/wiki/Van_Deemter%27s_equation

34. Publimed.com “Estradiol Longitud de onda” www.pubmed.gov/estradiol-longituddeonda.html

35.- Monografias.com Los Estrogenos” <http://www.monografias.com/trabajos11/estrog/estrog.shtml>

36. Analytical Spectroscopy Research Group “Column Efficiency” http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/column_efficiency.html

37. ANALITYCAL CHEMESTRY, HPLC Textbook, “Basic Liquid Chromatography” http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/index.html

38. Monografias.com, “Estadística Inferencial. Regresión y correlación” <http://www.monografias.com/trabajos26/estadistica-inferencial>