



1
2010

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO VALIDACION Y APLICACION DE
UN METODO ANALITICO PARA LA CUANTI-
FICACION DE α -METILDOPA EN PLASMA POR
CROMATOGRFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION EMPLEANDO DETECCION
ELECTROQUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Dolores Patricia Aguilar Rodriguez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	4
1. FARMACO α -METILDOPA	5
A. HISTORIA	5
B. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS	5
C. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS	12
D. PARAMETROS FARMACOCINETICOS	13
E. METODOS DE ANALISIS PARA LA DETERMINACION DE α -METILDOPA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	15
2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	16
A. INTRODUCCION	16
B. PRINCIPIOS BASICOS	19
C. INSTRUMENTACION	23
a. Recipientes de Almacenamiento de la fase móvil	23
b. Bombas	24
c. Inyectores	25
d. Columnas	25
- Fase normal	26
- Fase inversa	26
- Intercambio iónico	27
- Exclusión o permeación en gel	27
e. Detectores	27
- Detector ultravioleta	28
- Detector de fluorescencia	28
- Detector electroquímico	29
f. Integradores	33
D. CROMATOGRAFIA POR PAR IONICO	38
3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	42
A. INTRODUCCION	42
B. CONCEPTOS BASICOS	42

III DESARROLLO EXPERIMENTAL	45
1. REACTIVOS	46
2. EQUIPO Y MATERIALES	47
3. CONDICIONES EXPERIMENTALES	47
A. PREPARACION DE SOLUCIONES	47
B. PREPARACION DE CURVAS ESTANDAR	49
a. Curva Estándar Sin Tratar	49
b. Curva Estándar en Plasma	49
C. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	52
4. PARAMETROS DE VALIDACION	53
A. LINEALIDAD	53
a. Linealidad del Sistema	53
b. Linealidad del Sistema en Plasma.	56
c. Linealidad y Exactitud del Método	65
B. PRECISION	71
a. Precisión del Sistema	71
b. Precisión del Método	72
C. CANTIDAD MINIMA CUANTIFICABLE	74
D. REPRODUCIBILIDAD.	77
E. ESPECIFICIDAD	81
F. TOLERANCIA	87
a. Cambios de pH	87
b. Cambios en el Porcentaje de Cosolvente	91
G. ESTABILIDAD	95
a. Estabilidad en Plasma	95
b. Estabilidad en el Disolvente de Elución	96
5. APLICACION DEL METODO.	100
A. TOMA DE MUESTRAS	100
B. ANALISIS DE LAS MUESTRAS	100
C. RESULTADOS	101

IV RESULTADOS FINALES	105
1. METODO ANALITICO	106
A. REACTIVOS	106
B. EQUIPO Y MATERIALES	106
C. PROCEDIMIENTO	106
2. RECOMENDACIONES	108
V CONCLUSIONES	110
VI BIBLIOGRAFIA	113

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

I INTRODUCCION

En la actualidad, el uso de agentes terapéuticos se ha visto incrementado dadas las características socio-económicas del país. Esto ha obligado a que la industria farmacéutica esté cada vez más consciente de la responsabilidad que ha adquirido, para que los medicamentos que produzca sean igualmente eficaces, seguros y de bajo costo.

En el mercado nacional existen productos de diferentes laboratorios farmacéuticos que contienen al mismo principio activo, por lo que es recomendable establecer si éstos producen el mismo efecto terapéutico. Una herramienta útil para ello son los estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad, que hasta la fecha no se les ha dado la debida importancia.

Uno de los requisitos primordiales para poder realizar este tipo de estudios de manera confiable, es contar con un método analítico suficientemente sensible y preciso que permita la cuantificación del fármaco a los niveles plasmáticos adecuados.

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un método para cuantificar α -metildopa en plasma. Este fármaco es un agente antihipertensivo sintético, estructuralmente relacionado a las catecolaminas. Su uso es amplio, entre otras causas, por el stress en el que se vive actualmente.

Este método emplea cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector electroquímico, que como se verá, es altamente sensible y específico. El fundamento de la metodología analítica es la adsorción de catecolaminas en alúmina en medio básico y su elución a pH ácido. De esta manera, se logra una limpieza total de la muestra.

El método presenta un límite de cuantificación bajo, así como una buena linealidad en un intervalo amplio de concentraciones, y exactitud, precisión, reproducibilidad y especificidad aceptables. Dichas características permiten que el método pueda emplearse en estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad de medicamentos cuyo principio activo sea α -metildopa.

C A P I T U L O I I

G E N E R A L I D A D E S

- II.1 FARMACO : α -METILDOPA
- II.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION
- II.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

II GENERALIDADES

II.1. FARMACO: α -METILDOPA

II.1.A. HISTORIA(1)

La metildopa es uno de los agentes antihipertensivos más antiguos y más ampliamente usados. Es un derivado de la fenilalanina, se sintetizó como un inhibidor de la L-dopa (aminoácido aromático) descarboxilasa y se encontró que tenía actividad antihipertensiva.

II.1.B. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS(2,3,4)

La α -metildopa también recibe los nombres de:

- Alfa-metildopa
- Metildopa
- 3-hidroxi- α -metil-l-tirosina
- L-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina
- L- α -metil-3,4-dihidroxifenilalanina.
- Acido L-2-amino-2-metil-3-(3,4-dihidroxifenil)propionico

Es un polvo fino de color blanco a amarillento o cristales incoloros e inodoro.

Su estructura se muestra en la figura No. 1.

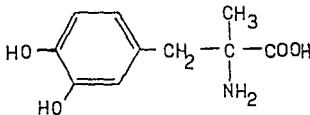


FIGURA No. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE METILDOPA

Su fórmula condensada es $C_{10}H_{13}NO_4$

Su peso molecular es P.M. 211.21

Se encuentra en forma sesquihidratada (P.M. 238.2) y es altamente higroscópica.

Punto de fusión aproximadamente 310 °C.

Constantes de disociación:

pK_{a_1}	2.2	(-COOH)	
pK_{a_2}	9.2	(-NH ₂)	
pK_{a_3}	10.6	(-OH)	(5)
pK_{a_4}	12.0	(-OH)	

Solubilidad

Poco soluble en agua. (1 en 100)
Ligeramente soluble en etanol (1 en 400)
Muy soluble en ácido clorhídrico diluido (1 en 0.5)
Prácticamente insoluble en los disolventes orgánicos comunes.

Rotación óptica

$[\alpha]_D^{23} = -4.0 \pm 0.5$ (Soln. de 1 g en 100 ml de HCl 0.1N)

Espectro de Ultravioleta

Solución ácida (pH 1) λ_{max} 279 nm ($A_1^1 = 130$) ($\epsilon = 2780$)
(Fig. 2).

Solución alcalina (pH 14) λ_{max} 302 nm

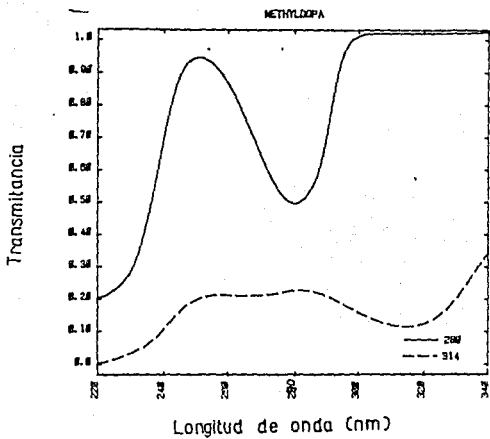


FIGURA No. 2 ESPECTRO DE UV DE α -METILDOPA EN SOLUCION ACIDA.

Espectro de Infrarrojo(Figura No. 3)

Los principales picos están en:

NUMERO DE ONDA (cm^{-1})	CORRESPONDE A:
3400 y 3480	amina primaria
1550 - 1700	grupo α -metil-aminoácido
1540 (1530)	metilo
1495 (1491)	fenilo
1300 (1288)	ácido carboxílico

Espectro de Masas (Figura No. 4)

Los picos principales están a m/z 88, 42, 123, 124, 89, 77.

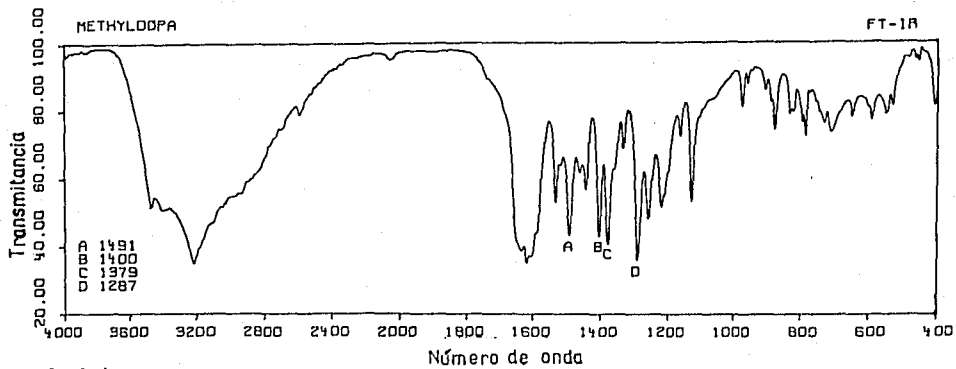


FIGURA No. 3 ESPECTRO INFRARROJO DE α -METILDOPA

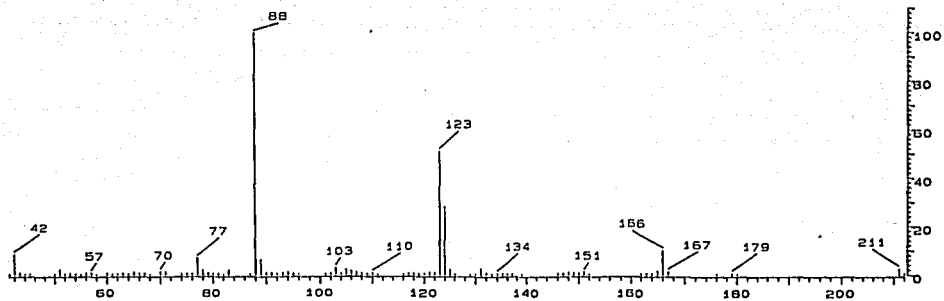


FIGURA No. 4 ESPECTRO DE MASAS DE α -METILDOPA

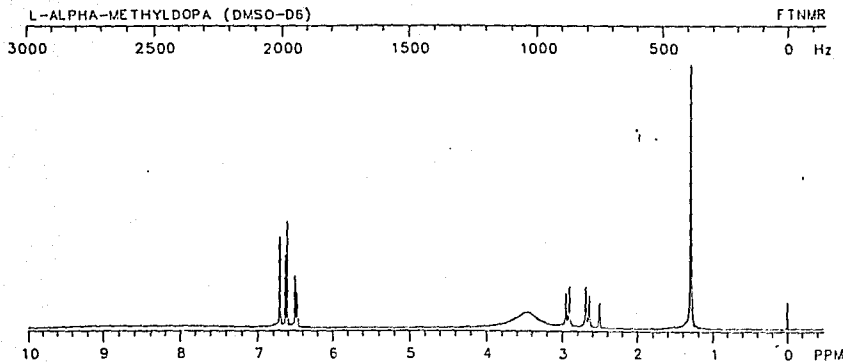


FIGURA No. 5 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE α -METILDOPA

II.1.C. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS(1,6)

La metildopa es un buen agente antihipertensivo. Ejerce su acción sobre el sistema nervioso central mediante su conversión a α -metilnoradrenalina que es un potente agonista α_2 -adrenérgico. Sus efectos hemodinámicos consisten en reducciones significativas de la presión arterial y resistencia periférica total, manteniendo el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo renal.

El efecto de la metildopa se inicia lentamente, el efecto completo se observa después de unos días de tratamiento, y cuando se suspende el tratamiento la presión arterial que se tenía anterior al inicio del tratamiento se recupera en 48 horas.

Se ha observado el desarrollo de tolerancia para la acción antihipertensiva debido a un aumento compensado del volumen líquido circulante.

Existe sinergismo de la metildopa con otros fármacos antihipertensivos, habiéndose empleado antagonistas de adrenerreceptores β (propranolol) y fármacos vasodilatadores, pero al igual que cuando se administra metildopa sola, en la terapéutica combinada es necesario administrar un diurético (hidroclorotiazida) para alcanzar el efecto máximo con la cantidad mínima de cada fármaco.

Efectos Secundarios.

La metildopa oral o parenteral, principalmente y en general causa sedación, aunque también se han observado efectos en el SNC como vértigos, pesadillas y depresión psíquica; sequedad bucal, así como disfunciones gastrointestinales: estreñimiento, distensión gástrica, anorexias y flatulencias.

Usos

Se usa ampliamente en pacientes con hipertensión asociada a enfermedades renales ya que no se aumenta la disfunción renal. En

estos casos el efecto hipotensor es mayor y más prolongado que en sujetos sanos, lo que se puede deber a la acumulación de metabolitos que pudieran tener actividad farmacológica.

Así mismo, la metildopa es uno de los fármacos de elección para el tratamiento prolongado de la hipertensión durante el embarazo, aparentemente no hay efecto en el flujo sanguíneo a la placenta, y los niños cuyas madres tuvieron un tratamiento con metildopa durante el embarazo mostraron un desarrollo motor e intelectual normal (7).

II.1.D. PARAMETROS FARMACOCINETICOS (7)

Absorción, biodisponibilidad y eliminación.

La absorción de la metildopa en el tracto gastrointestinal es incompleta y variable, siendo el valor de la concentración plasmática máxima ($C_p \text{ max}$) de $2.0 \mu\text{g/ml}$ (1.0 a $4.6 \mu\text{g/ml}$) en un tiempo de 2 horas (con intervalo de 2 a 4 horas). Después de la administración intravenosa (250 mg), se estima que la fracción de metildopa en la circulación sistémica es del 25 % (8 al 62 %), siendo esto igual para una dosis oral de 750 mg ($C_p \text{ max}$ $2.62 \mu\text{g/ml}$) en un tiempo de 3 horas.

La absorción también se ve modificada día a día y esto se puede deber a los alimentos, por interferir con la excreción en el túbulo renal de aminoácidos.

Como existe correlación entre la dosis y la $C_p \text{ max}$, pero no entre $C_p \text{ max}$ y el efecto, durante la terapia se recomienda medir la presión sanguínea.

Distribución, Unión a Proteínas y Eliminación.

La eliminación de la metildopa ocurre mediante un modelo de dos compartimentos (eliminación bifásica) con una vida media de distribución (α) de 0.21 horas (0.16 a 0.26) y de 1.29 horas (1.02 a 1.69) en la fase de eliminación (β).

Respecto a la fase β , debido a problemas analíticos no se ha podido determinar con precisión y exactitud las concentraciones plasmáticas entre las 6 y las 8 horas del monitoreo, que corresponden a un intervalo de concentraciones de 100 a 200 ng/ml.

De cualquier manera, por datos en orina, parece ser que la eliminación se completa hasta las 24 a 48 horas después de la administración, lo cual se puede deber a un tercer compartimento o a circulación enterohepática.

El volumen aparente de distribución en el compartimento central (V_d) es de 0.23 L/kg (0.19 a 0.32) y el volumen de distribución aparente total es de 0.60 L/kg (0.41 a 0.72).

La unión de metildopa a proteínas es de 10 a 15 % y de los metabolitos ácido lábiles es del 50 al 60 %.

Metabolismo

El metabolismo de la α -metildopa es complejo. Se han identificado varios metabolitos de los cuales el principal es la α -metildopamina que probablemente tenga actividad farmacológica y generalmente en los métodos reportados se cuantifica conjuntamente con alfa-metildopa.

Otros metabolitos son la 3,4-dihidroxi-fenilacetona, 3,4-dihidroxi-fenil-isopropanol, 3-metoxi-4-hidroxi-fenilacetona, la 3-metoxi-metildopa, el 3-metoxi-4-hidroxi-fenil-isopropanol y la 3-metoxi-metildopamina.

Después de la administración oral, del 25 al 50 % de la dosis excretada por el hígado son metabolitos conjugados lábiles al ácido, pero estos metabolitos no se observan después de la administración intravenosa, por lo que es probable que se formen en las células del intestino.

A las dos horas de la administración oral, se observa que los metabolitos forman cerca de las dos terceras partes de la concentración de la metildopa no metabolizada.

Depuración Plasmática.

La depuración total es de 207 ml/min/m^2 (174 a 266 ml/min/m^2) debiéndose en mayor proporción a excreción renal y metabolismo.

La depuración renal es de 93 a 96 ml/min/m^2 siendo el 50 % de la eliminación total del fármaco. Esta depuración es aproximadamente 1.7 veces la depuración de creatinina endógena lo cual se debe a la existencia de filtración glomerular y secreción tubular.

II.1.E. METODOS DE ANALISIS PARA LA DETERMINACION DE α -METILDOPA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Para la determinación de α -metildopa en fluidos biológicos se han reportado numerosos métodos analíticos tanto fluorométricos como cromatográficos de líquidos de alta resolución con diferentes sistemas de detección tales como ultravioleta y electroquímico.

Métodos Fluorométricos

Los métodos fluorométricos se basan en la formación de un derivado fluorescente por medio de la oxidación de la metildopa. Para mejorar la selectividad de este método, Kim y Koda (8) reportan un paso previo a la derivación que consiste en la adsorción de la catecolamina en alúmina y su elución con un disolvente orgánico, seguido de la oxidación adicionando ferricianuro de potasio y después hidróxido de sodio con ácido ascórbico. Este compuesto se lee a una longitud de onda de excitación de 400 nm y una de emisión de 510 nm. El método presenta una sensibilidad de 100 ng/ml y no se tienen interferencias de las catecolaminas endógenas dado que las concentraciones terapéuticas de la metildopa son cientos de veces mayores que las normales de las catecolaminas (8). Sin embargo, cuando el método convencional se emplea para el diagnóstico de feocromocitoma en pacientes hipertensos, se ha visto que los derivados metabólicos de α -metildopa y otras catecolaminas

endógenas como adrenalina, noradrenalina y dopamina interfieren dando falsos positivos (9).

Métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Ultravioleta (10)

Walson et al. (10) reportan un método en el cual precipitan las proteínas plasmáticas con HClO_4 4 M y el sobrenadante ácido lo inyectan al sistema cromatográfico empleando una columna de intercambio catiónico y la longitud de onda para la detección es de 280 nm. Este método aunque es rápido tiene una sensibilidad muy baja (5 $\mu\text{g/ml}$) además de presentarse la interferencia de altos niveles de L-Dopa, pero no de otras catecolaminas.

Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Electroquímica

Dentro de estos métodos se pueden hacer dos subgrupos de acuerdo al tratamiento que se le da a la muestra previo a su inyección al sistema cromatográfico, es decir la extracción de catecolaminas con algún disolvente o la adsorción de ellas en alúmina.

a. Extracción.

Estos métodos se han empleado para cuantificar α -metildopa en varios fluidos biológicos: plasma, orina y leche materna.

- Extracción ácida. (11, 12)

Estos métodos se basan en una precipitación de las proteínas plasmáticas con ácido perclórico, extrayendo así la metildopa. Las muestras se centrifugan y el sobrenadante ácido se inyecta al sistema cromatográfico. Aunque el método es rápido y sensible (50 ng/ml), los cromatogramas obtenidos no muestran una resolución a la línea base. Además, debido a que no se tiene una limpieza suficiente de la muestra, la columna cromatográfica se deteriora rápidamente.

- Extracción orgánica. (13, 14)

En este método, Kochack y Mason (13) describen que la muestra se mezcla con butanol, se centrifuga y la fase alcohólica se diluye y se inyecta al sistema cromatográfico. El límite de detección es de 2 a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Debido a que la metildopa se puede encontrar tanto en plasma como en leche materna conjugada a sulfato o sola, Honskinsy (14) reporta un método donde se realiza la incubación de la muestra con sulfatasa a 37 °C durante 48 horas y de ahí se extrae con éter etílico; las proteínas remanentes se precipitan con ácido perclórico. El residuo se lava con agua y los sobrenadantes se juntan e inyectan al sistema cromatográfico donde la columna es de intercambio catiónico. De esta manera, el método se puede emplear para cuantificar de α -metildopa en leche materna con una sensibilidad de 80 ng/ml de metildopa libre y de 260 ng/ml de la conjugada a sulfato.

b. Adsorción en alúmina (5, 15)

Basándose nuevamente en la adsorción en alúmina de las catecolaminas en medio básico, Kochack y Mason (5) reportan un método donde la muestra de plasma se mezcla con alúmina, se lava dos veces con agua destilada. Luego, las catecolaminas se eluyen al mezclar la alúmina con ácido fosfórico y se inyecta el sobrenadante al sistema cromatográfico. Esta última agitación se realiza durante 15 minutos. El método lo emplean para cuantificar metildopa con dihidroxi-bencilamina como estándar interno.

Este método con pequeñas modificaciones fué empleado por Jenner et al (15) para medir concentraciones plasmáticas en un intervalo de 0.2 a 2.0 ng/ml de α -metildopa en pacientes bajo terapia.

II.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

II.2.A. INTRODUCCION (17)

La cromatografía de líquidos se puede definir como un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases: una fase móvil líquida y una fase estacionaria cuya naturaleza puede variar. La diferencia entre cromatografía de líquidos tradicional (capa fina, en papel, en columna abierta, etc.) y la cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR se ha dado por el mejoramiento de equipo, materiales, técnica y aplicación de la teoría, lo cual ofrece ventajas como la posibilidad de realizar separaciones difíciles, exactitud y velocidad de análisis.

Comparando CLAR con la cromatografía de líquidos tradicional, se tienen como principales características que la columna se puede emplear un número repetido de veces, con lo que se pueden usar fases estacionarias más caras para mejorar las separaciones. La introducción de la muestra al sistema se realiza de manera fácil y rápida, ya sea manual o automáticamente al inyectarla por medio de una jeringa a un sistema de válvulas. El flujo de la fase móvil se consigue por medio de bombas de alta presión, dando un flujo controlado y rápido, por lo tanto operaciones reproducibles y análisis exactos y precisos. Además se cuenta con detectores de flujo continuo e integradores de varios tipos.

En comparación con la cromatografía de gases, CLAR no está limitada por la volatilidad o inestabilidad térmica de los compuestos, por lo que las macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos y fármacos se pueden separar adecuadamente. Además se tiene la ventaja de contar con dos fases donde la muestra interactúa selectivamente aumentando la separación de los compuestos y se puede recuperar los compuestos puros colocando un recipiente a la salida de la columna.

II.2.B. PRINCIPIOS BASICOS (16,17,18)

Dentro de cromatografía se manejan algunos términos y símbolos característicos, siendo los más importantes:

Tiempo de Retención (t_R).

Es el tiempo que la muestra permanece en la columna y se mide desde el momento en que se introduce la muestra al sistema hasta que se obtiene el máximo de su respuesta. Este tiempo de retención es característico para cada compuesto bajo las mismas condiciones de operación. (Figura No. 6)

Tiempo Muerto (t_0 o t_m).

Es el tiempo que se necesita para eluir un compuesto que no se retenga en la columna, o sea, que no interacciona con la fase estacionaria. (Figura No. 6).

Tiempo de Retención Ajustado (t'_R)

Es la diferencia entre t_R y t_0 , y este es el tiempo que el compuesto permanece en la fase estacionaria. (Figura No. 6)

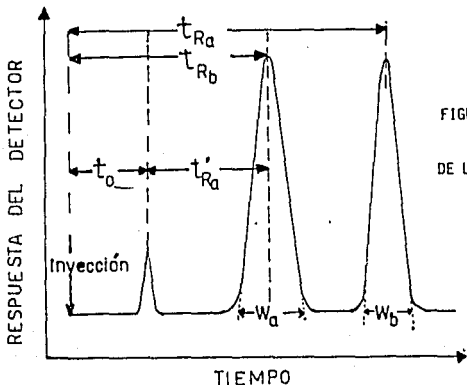


FIGURA No. 6 CROMATOGRAMAS
DE LOS COMPUESTOS A Y B

Ancho de la Base del Pico (W_b)

Es la línea base interceptada por las tangentes trazadas a ambos lados de la señal cromatográfica (pico del cromatograma).

Resolución

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos, y se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\Delta t}{1/2 (W_a + W_b)}$$

donde: $\Delta t = t_{R2} - t_{R1}$

W_a y W_b son los anchos de los picos de los compuestos a y b. (Figura No. 7)

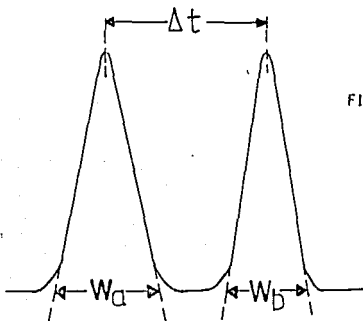


FIGURA No. 7 RESOLUCION DE LOS
COMPUESTOS a Y b

La resolución se puede optimizar al cambiar cualquiera de los siguientes parámetros: platos teóricos, selectividad y/o factor de capacidad, los cuales se relacionan por:

$$R = \frac{1}{4} N \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{k' + 1} \right]$$

Número de Platos Teóricos (N).

El número de platos teóricos mide la eficiencia de la columna y se puede expresar como:

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2 = \left[\frac{t_R}{\sigma} \right]^2$$

donde: t_R = tiempo de retención del compuesto

W = ancho del pico a la base

σ = desviación estándar del pico

Un plato teórico es un equilibrio del compuesto entre las dos fases, y los factores que lo afectan son el tiempo de retención, la longitud de la columna, el compuesto, el flujo, el tamaño de la muestra, la técnica de inyección y las características de la columna, por lo que para comparar N entre diferentes columnas se emplea el siguiente término.

Altura Equivalente a un Plato Teórico (AEPT).

Es la longitud de la columna necesaria para obtener un equilibrio del compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria; por lo tanto, entre menor sea este valor, mejor será la eficiencia de la columna. Este parámetro se relaciona con la velocidad de la fase móvil mediante la siguiente ecuación:

$$H = A u^{0.33} + \frac{B}{u} + C u + D u$$

donde: $A u^{0.33}$ - Se debe tanto al efecto multicanal como a la transferencia de masa en la fase móvil.

$\frac{B}{u}$ - Difusión longitudinal

$C u$ - Transferencia de masa retenida en la fase móvil.

$D u$ - Transferencia de masa en la la fase estacionaria (en caso de fases pelliculares).

Cada uno de los parámetros anteriores se ve modificado por la velocidad de la fase móvil, el tamaño de partícula de la fase

estacionaria, el ancho de la película que cubre la superficie del soporte y el coeficiente de difusión de la muestra tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria.

Es importante señalar que para obtener una separación eficiente, se requiere de un valor pequeño de H, lo cual se logra con lo siguiente:

-Empleando columnas cuya fase esté empacada de manera uniforme y compacta, empleando tamaños de partícula pequeños, por ejemplo de 5 a 10 μm de diámetro. Así se logra disminuir la difusión parásita o camino múltiple, o sea, las diferentes velocidades de flujo de las moléculas a través de la columna lo cual provoca su dispersión.

-Disminuir el tiempo de difusión molecular empleando caudales rápidos a una presión elevada dentro de la columna.

Otros factores que afecta la AEPT son el ensanchamiento de la banda debido a la longitud y diámetro interno de la tubería, por lo que deben tener un valor mínimo, así como el tamaño de la muestra.

Selectividad o Retención Relativa.

Esto es la eficiencia del disolvente y su valor es:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k'_1}{k'_2}$$

donde:

t'_R son los tiempos de retención ajustados de los compuestos 1 y 2

K son los coeficientes de distribución

k' son los factores de capacidad

Para optimizar la selectividad se pueden hacer cambios de la fuerza iónica de la fase móvil cambiando el porcentaje del cosolvente, el pH, la temperatura, el empaque de la columna o realizar efectos químicos especiales tales como complejación o par iónico.

Factor de Capacidad (k').

Este es la medida del equilibrio de distribución que existe para un determinado compuesto entre las fases móvil y estacionaria. Dada la forma en la que afecta este parámetro a la resolución, su valor debe permanecer entre 2 y 10.

II.2.C. INSTRUMENTACION

Básicamente, un sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución requiere de los siguientes componentes:

- a. Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.
- b. Sistema de bombeo de alta presión.
- c. Inyector.
- d. Columna.
- e. Detector.
- f. Registrador.

Dentro de los equipos cromatográficos de líquidos de alta resolución se han seguido dos tendencias, una es el equipo por módulos que da una gran versatilidad, se pueden cambiar accesorios para mantenimiento preventivo o reparación. La desventaja de estos equipos es la longitud de tubería e interfases que se requieren. En cambio, el otro tipo de equipos, en gabinete, tiene la ventaja de que cada parte está en un lugar prediseñado, se optimiza la longitud de las tuberías pero cada componente es difícil de manipular para servicio.

a. Recipientes de Almacenamiento de la Fase Móvil.

Se pueden emplear recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte. La toma del disolvente se hace a través de un filtro para eliminar partículas pequeñas que puedan obstruir y dañar al sistema de bombeo y a la columna. Es recomendable también filtrar la fase móvil antes de introducirla al sistema cromatográfico por un filtro de 0.2μ de poro, así como eliminar los gases disueltos (generalmente presentes en las fases polares) como el oxígeno que pueda provocar formación de burbujas que afectan a la bomba, la eficiencia de la columna y al detector. Esto se elimina mediante sonicación, aplicación de vacío sobre el

recipiente que contiene a la fase mientras se agita el líquido con un agitador magnético y/o ligero calentamiento del líquido mientras se purga con N_2 ó algún otro gas inerte menos soluble.

b. BOMBAS.

Las columnas empleadas en CLAR ofrecen una resistencia al flujo muy elevada y para evitar que los análisis sean extremadamente lentos, se requiere de un sistema de bombeo que permita aumentar la velocidad de flujo de la fase móvil.

Estos sistemas deben ofrecer una presión alta de operación (aproximadamente 6000 psi), un intervalo de volúmenes amplio de 0.5 a 10 ml/min, flujo constante y reproducible, así como facilidad para hacer cambios de fase móvil y limpiar el sistema.

Existen dos tipos de bombas: las neumáticas y las mecánicas, de las cuales hay recíprocas (pistón) y de desplazamiento continuo.

TIPO DE BOMBA	PRESION MAXIMA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
RECIPROCA	600 atm	Se cambia fácil y rápido de fase móvil Fácil mantenimiento	Flujo en pulsos y no en forma continua y uniforme.
DESPLAZAMIENTO CONTINUO	340 atm	Flujo uniforme y continuo libre de pulsaciones.	Costo elevado. Dificultad para llenar la bomba con la nueva fase móvil. Tiempo de análisis limitado
NEUMATICAS	400 atm	Flujo libre de pulsaciones y son de presión constante.	Capacidad limitada en el volumen total que puede bombear.

c. INYECTORES.

Estos deben tener un diseño especial ya que deben resistir presiones elevadas, tener volúmenes pequeños para que al introducir la muestra no se contribuya al ensanchamiento de los picos significativamente. La mayoría de los inyectores son de flujo continuo con límites de presión adecuados.

Generalmente se emplean válvulas inyectoras en las que la muestra se introduce mediante una jeringa, desplaza al líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción de un tubo capilar de acero. La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se coloca en posición para que el flujo pase a través del tubo capilar. De esta manera es posible inyectar volúmenes pequeños con alta reproducibilidad.

En el monitoreo de fármacos, así como en el trabajo rutinario son una gran ventaja los inyectores automáticos en los que se puede programar hasta 96 viales con muestra para que se inyecten de 1 a 9 veces, ya sea a volúmenes constantes o variables en alícuotas desde 1 hasta 2000 μ l.

En los inyectores automáticos, el operador define ciertos parámetros respecto a la toma de la muestra, así como un diagnóstico interno que permite monitorear al sistema, a la fase móvil y a las muestras antes y durante cada corrida para identificar las condiciones del instrumento que pudieran afectar el análisis de la muestra.

El funcionamiento de este tipo de inyector es manejado por cinco sistemas: el de control (electrónico), el de flujo, el neumático, el de transporte de la muestra y el lavador de la jeringa.

d. COLUMNAS.

La columna es la parte medular del sistema cromatográfico, ya que ahí se lleva a cabo la separación de los compuestos. Está compuesta de un segmento de tubo de algún material inerte como acero inoxidable capaz de resistir altas presiones. La longitud

varía de 10 a 25 cm y de 3 a 4 mm de diámetro interno. En los extremos de las columnas se tiene un disco de teflón o metal poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o se pierda. Sin embargo, este disco no debe producir una caída de presión grande.

Los empaques de las columnas idealmente deberían ser de tamaño muy pequeño y regular, tal que en un tiempo mínimo, se obtuviera el máximo de resolución de los compuestos, así como la máxima capacidad de la muestra con facilidad de introducción a la columna y producir una mínima caída de presión.

Los empaques de las columnas se pueden dividir en dos:

a. No poliméricos. Básicamente son a base de sílice; algunos son de óxido de aluminio y otros materiales como el sulfato de calcio. Este tipo de empaques son los empleados en la mayoría de las columnas de fase inversa, fase normal, algunas de intercambio iónico y exclusión.

b. Poliméricos. Principalmente consisten en uniones cruzadas como estireno-divinil benceno y son empleadas principalmente en intercambio iónico.

Fase normal.

La mayoría de los empaques son de sílice. La separación de los compuestos se lleva a cabo por la interacción entre los grupos silanoles activos y los analitos. Dado el largo tiempo para llegar al equilibrio, es de poco uso para el monitoreo de fármacos, además de que la fase móvil está constituida por disolventes no polares como el cloroformo, que además de tóxicos (en su mayoría) son de costo elevado.

Fase inversa.

Estos empaques son de sílice de 5 a 10 μ de tamaño de partícula con cadenas de C-18, C-8 o algún otro grupo no polar unido químicamente como el grupo ciano, fenilo, amino, etc. Las fases móviles empleadas en este tipo de cromatografía son polares, y en general se usan soluciones amortiguadoras de diferentes sales mezcladas con algún cosolvente: metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc.

La separación se basa en varios mecanismos tal como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, mecanismos de partición.

Intercambio iónico.

La separación se basa en las diferencias en la interacción de la molécula con el empaque dado el grado de ionización debido al pH de la fase móvil. Estos empaques son resinas que pueden ser de intercambio aniónico ($-\text{NH}_4^+$ y NH_2) y se obtiene en forma de cloruros, o de intercambio catiónico ($-\text{SO}_3$) que se adquiere en forma de sales de sodio. En general, son menos eficientes que las de fase inversa y su aplicación al monitoreo de fármacos es reducido.

Exclusión, o permeación en gel.

En este tipo de cromatografía, las moléculas se separan de acuerdo a su tamaño y el compuesto de mayor peso molecular eluye primero. El intervalo de pesos moleculares dentro del cual es útil la columna, está determinado por dos límites: el inferior, llamado volumen de permeación, por debajo del cual todas las moléculas de menor tamaño son difundidas dentro de los poros del material y el volumen de exclusión, por encima del cual todas las moléculas de mayor tamaño no penetran en los poros.

e. DETECTORES.

Existen diferentes tipos de detectores que se pueden clasificar como universales y específicos. Dado que la mayoría de los compuestos orgánicos, especialmente los fármacos, tienen en su estructura química dobles enlaces, el detector que se podría clasificar como universal es el de ultravioleta. De cualquier manera se cuenta con una serie de detectores sumamente específicos y selectivos como el de fluorescencia, el electroquímico, el de fotoconductividad, el de radioactividad, el espectrómetro de masas, el de índice de refracción y el de infrarrojo. A continuación se mencionan algunas de las características de los detectores más empleados en el monitoreo de fármacos.

Detector Ultravioleta.

Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromático ultravioleta.

Existen dos tipos de detectores UV. El de longitud de onda variable, cuya principal ventaja es la de poder seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra, o sea, donde se tenga el máximo de absorbancia, y el de longitud de onda fija que emplea filtros a 214, 254, 280 y 313 nm y una lámpara de deuterio a baja presión como fuente de luz UV.

Estos detectores son insensibles a cambios en el flujo y en la temperatura, además tienen como característica que el volumen de la celda es de 10 μ l o menos para evitar el ensanchamiento de los picos dado a factores externos.

En la actualidad existen detectores capaces de hacer el barrido del compuesto para su posible identificación en un flujo continuo mediante un arreglo de diodos, con lo cual se puede monitorear simultáneamente desde 190 hasta 600 nm en milisegundos. La radiación de la lámpara de deuterio pasa a través de un lente y un obturador hacia la celda de flujo. La radiación emitida se dispersa por una rejilla de difracción hacia el arreglo de fotodiodos. Estas señales obtenidas pasan a un procesador de datos con lo cual resulta la respuesta (absorbancia) en función del tiempo y de la longitud de onda. (19)

Para el empleo de los detectores de UV, la pureza espectroscópica de la fase móvil es importante, sin embargo se recomienda usar disolventes grado cromatográfico en vez de grado espectro, ya que estos contienen conservadores que afectan las separaciones.

Detector de Fluorescencia.

Es uno de los detectores para CLAR más sensibles con que³ se cuenta, ya que se puede cuantificar hasta el orden de picogramos. Existen dos diseños: los espectrofluorómetros que utilizan

monocromadores y los fluorómetros de filtros que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión.

En algunos casos, cuando la muestra no tiene propiedades fluorescentes se pueden formar derivados antes o después de la columna que sí tengan esta propiedad.

Detector Electroquímico. (20,21,22)

La detección electroquímica se basa en un potencial amperométrico controlado. La diferencia de potencial predeterminado se aplica entre el electrodo de trabajo y el de referencia, por medio del cual se lleva a cabo la reacción electroquímica. Si el potencial aplicado es positivo, el electrodo es un fuerte oxidante (receptor de electrones) y por el contrario, siendo el potencial más negativo, el electrodo es un reductor más fuerte (donador de electrones).

Cuando un flujo del soluto pasa sobre la superficie del electrodo colocado a un potencial con un valor lo suficientemente positivo, las moléculas adyacentes a ella son inmediatamente oxidadas y la corriente eléctrica provocada es monitoreada como una función del tiempo (Fig. 8). Dado que la cantidad de reactivo es proporcional a la concentración, la corriente se puede relacionar directamente a la cantidad del compuesto eluido de la columna en función del tiempo. Si las condiciones cromatográficas se controlan cuidadosamente, la detección amperométrica es muy precisa y sensible hasta el orden de picomoles.

Las celdas más comunes del detector son de una capa delgada en la que el(los) electrodo(s) activo(s) está embebido en la pared de un canal formado por dos bloques que están presionando a una membrana delgada. El volumen de esta celda es de 0.1 a 1 μ l, por lo que el perfil de concentración de la muestra no se ve distorsionado.

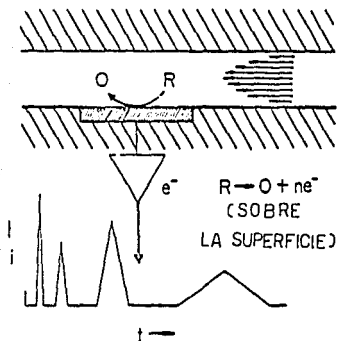


FIGURA No. 8
TRANSFERENCIA DE
ELECTRONES EN LA
SUPERFICIE DEL
ELECTRODO.

Dadas las características del detector el electrodo debe escogerse con cuidado, ya que la superficie de éste tiene que ser física y químicamente inerte a la fase móvil en el potencial fijado. Los electrodos más empleados son el de carbón vidriado, el de pasta de carbón y el de mercurio, de los cuales el más versátil es el primero que es de un material químicamente resistente a casi todos los disolventes empleados en cromatografía, altamente conductor de corriente eléctrica y mecánicamente rígido. Está firmemente embebido en un bloque de carbono fluorado (fluorocarbono) para formar el electrodo, y puede emplearse en un intervalo amplio de potencial.

Otro factor importante para la detección electroquímica es la temperatura, ya que se requiere del transporte de moléculas o iones en solución, por lo que antes de llegar a la celda la muestra pasa a través de un precalentador (Fig. 9).

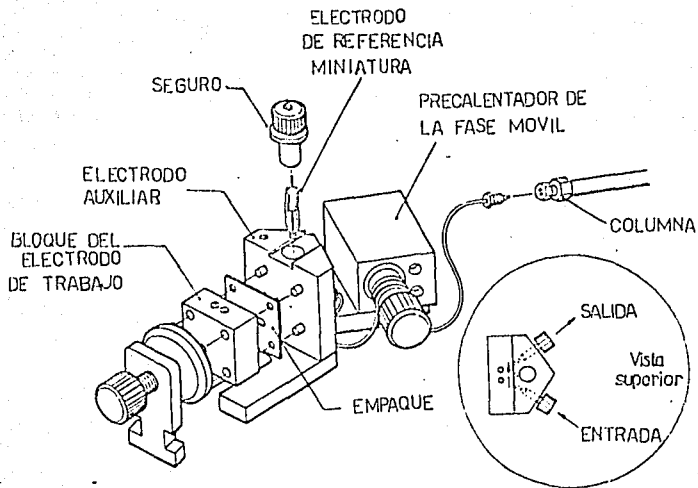


FIGURA No. 9 COMPONENTES DEL DETECTOR ELECTROQUIMICO.

Aunque lo más común es que los análisis se realicen con un solo electrodo, existe la posibilidad de utilizar simultáneamente dos electrodos de material, forma y área superficial igual o diferente, así como mantenerlos al mismo o diferentes potenciales de trabajo, con lo que se logra un incremento en los aspectos cualitativos y cuantitativos, incrementando la sensibilidad y las aplicaciones de la detección electroquímica.

Al trabajar con dos electrodos, estos pueden estar en forma paralela o en serie (Fig. 10) y cada una tiene amplias aplicaciones.

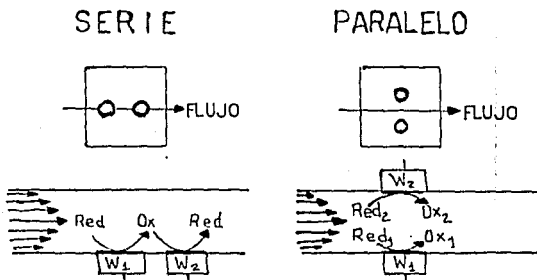


FIGURA No. 10 ELECTRODOS ACOPLADOS.

Al emplear el modo en paralelo, los compuestos que eluyen de la columna pasan sobre cada electrodo al mismo tiempo, con lo cual se pueden determinar más de un compuesto en un cromatograma al fijar, los electrodos a dos potenciales diferentes, siendo uno más selectivo que el otro.

Al utilizar los electrodos en serie, el compuesto pasa por un electrodo e inmediatamente por el otro y, en algunos casos, se pueden aumentar los límites de detección y la selectividad, debido a que algunos compuestos se oxidan o reducen irreversiblemente y por lo tanto ya no se detectan en el segundo electrodo (18).

La fase móvil que se emplee con este detector tiene algunas limitaciones. La primera es que debe existir un electroólito, generalmente a una concentración entre 0.01 a 0.1 M; el disolvente debe tener una constante dieléctrica lo suficientemente alta para permitir la ionización del electroólito y finalmente, la fase móvil debe ser electroquímicamente inerte a la superficie del electrodo. Por esta razón es que básicamente se emplean métodos basados ya sea en fase inversa o en intercambio iónico.

Finalmente, cabe mencionar que las sustancias que pueden analizarse mediante el detector electroquímico son aquellas susceptibles a ser oxidadas o reducidas. De las primeras se tienen los compuestos fenólicos, aminas aromáticas y tioles entre otros, y para emplear el modo reductivo, se tienen a las quinonas, compuestos nitro, nitroso, etc. (Fig. 11)

f. Integradores.

Para obtener resultados óptimos, se requiere de un registrador de alta velocidad, el cual dé una respuesta en escala completa en 1 segundo o menos, un valor de impedancia de entrada alto, un ruido de rechazo mínimo y velocidades de carta variables.

Conjuntamente con los registradores, pero en mayor proporción, en la actualidad se están empleando los integradores, los cuales calculan las áreas o las alturas de los picos de los cromatogramas y ofrecen diversas perspectivas, dependiendo de la marca y modelo.

FIGURA No. 11 GRUPOS FUNCIONALES SUSCEPTIBLES A SER DETECTADOS ELECTROQUIMICAMENTE

MEDIANTE OXIDACION

GRUPO FUNCIONAL ACTIVO

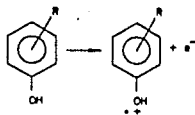
CLASE

REACCION ELECTROQUIMICA TIPICA

EJEMPLOS



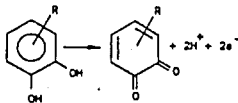
FENOLES



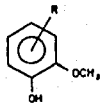
FENOLES
PARABENOS
MORFINA
TIROSINA



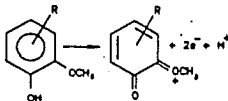
HIDROQUINONAS



CATECOLAMINAS



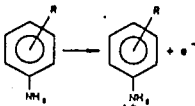
COMPUESTOS
VAINILLILICOS



ACIDO
FERULICO



AMINAS
AROMATICAS



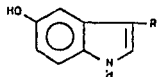
ANILINA
BENZIDINA

GRUPO FUNCIONAL
ACTIVO

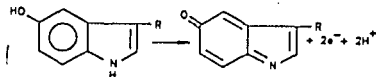
CLASE

REACCION ELECTROQUIMICA
TIPICA

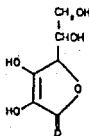
EJEMPLOS



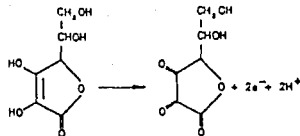
INDOLES



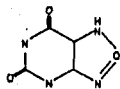
TRIPTOFANO
SEROTONINA



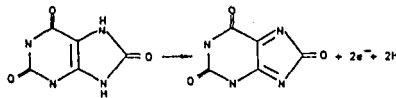
ACIDO ASCORBICO



ACIDO
ASCORBICO



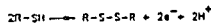
XANTINAS



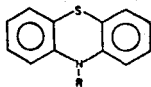
ACIDO URICO
TEOFILINA

R-SH

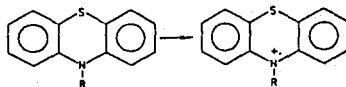
TIOLES



CISTEINA
GLUTATION



FENOTIAZINAS



CLORIPROMAZINA

FIGURA No. 11 (CONTINUACION)

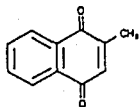
MEDIANTE REDUCCION

GRUPO FUNCIONAL
ACTIVO

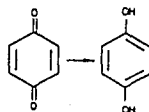
CLASE

REACCION ELECTROQUIMICA
TIPICA

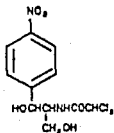
EJEMPLOS



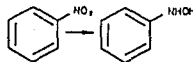
QUINONAS



VITAMINA K3



NITRO AROMATICOS

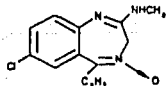


CLORANFENICOL

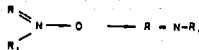


NITRO ALIFATICO

NITROGLICERINA



N-OXIDOS



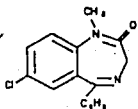
CLORDIAZEPOXIDO

FIGURA No. 11 (CONTINUACION)
GRUPO FUNCIONAL
ACTIVO

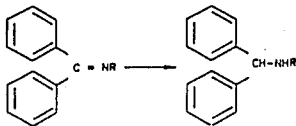
CLASE

REACCION ELECTROQUIMICA
TIPICA

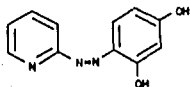
EJEMPLOS



AZOMETINA



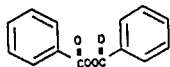
DIAZEPAM
NITRAZEPAN



COMPUESTOS AZO



4-(2-PIRIDILAZO)
RESORCINOL



PEROXIDO



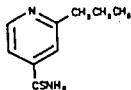
PEROXIDO DE
BENZOILO



NITROSAMINAS



DIMETILNITROSA
MINA



TIAMIDAS



PROTONAMIDA

II.2.D. CROMATOGRAFIA POR PAR IONICO (23)

a. Introducción y Fundamentación.

Al analizar ácidos o bases por cromatografía de líquidos en fase inversa se tiene la opción de hacer más eficiente y selectiva la separación de los compuestos, empleando un contraión en la fase móvil, lo cual se conoce como cromatografía de par iónico.

Este tipo de cromatografía de líquidos se fundamenta en la formación de un complejo entre el ión del analito y el contraión proveniente de un reactivo adecuado. El efecto del soluto es la modificación de su polaridad, en general por una neutralización completa de su carga mediante el contraión de carga opuesta.

b. Mecanismos de la Cromatografía de Par Iónico.

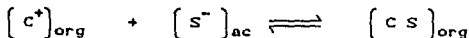
El par iónico es una asociación coulombica formada entre dos iones de cargas eléctricas opuestas. El grado del apareamiento se verá afectado por las cargas eléctricas que se presentan, la constante dieléctrica de los disolventes, la distancia entre los iones y la temperatura. Bajo ciertas condiciones se pueden dar asociaciones múltiples, algunas menos importantes como las interacciones de puentes de hidrógeno.

Para explicar el proceso que ocurre en este tipo de cromatografía se han propuesto varios modelos. El primero se extrapola de la teoría de extracción de par iónico líquido-líquido. Este mecanismo consiste en lo siguiente:



El ión del soluto (S^-) cargado negativamente forma un complejo en la fase acuosa con un contraión cargado positivamente (C^+). El complejo neutro se somete a un equilibrio de reparto entre la fase acuosa y la fase orgánica. Se debe notar que en este modelo el complejo se forma en la fase acuosa, pero de cualquier manera experimentalmente este no es el único mecanismo o el dominante.

El segundo modelo propone que la parte de la molécula del contraión que es solvofílica para la fase estacionaria predomina en la mitad solvofóbica. El mecanismo se puede explicar con el siguiente ejemplo:



El reactivo del contraión se adsorbe en la fase orgánica y el ión con carga positiva está libre para reaccionar con el ión del soluto con carga negativa en la fase acuosa. La adsorción de la parte solvofílica del reactivo del contraión en la fase estacionaria se comporta como un intercambiador iónico dinámico.

Se ha propuesto un tercer modelo en el que no se involucra ni la formación de un par iónico ni un intercambiador iónico, sino una interacción iónica donde ocurren interacciones de tipo coulombicas y de otras fuerzas que conducen al analito a una afinidad o rechazo por la fase móvil o estacionaria. El modelo establece que los iones del contraión se adsorben en la fase estacionaria donde el efecto es crear dos capas, cada una con iones de la misma carga. Los iones del analito se colocan en la segunda capa y son atraídos hacia la primera para neutralizar los campos.

Excepto en muy pocos casos, el fenómeno completo de par iónico en cualquier separación se debe a un grupo complejo de mecanismos separados que incluyen a los tres modelos anteriores.

c. Tipos de Cromatografía con Par Iónico.

Aunque es posible clasificar a esta clase de cromatografía en varias subdivisiones, las más comunes son la fase normal y la fase inversa. En la fase normal el contraión se encuentra en la fase estacionaria acuosa. La desventaja principal es la de no poder controlar el recubrimiento del soporte, se pierde fase estacionaria durante el uso de la columna y posiblemente exista adsorción residual en el material de soporte.

Al emplear fase inversa el contraión se encuentra en la fase móvil. La fase estacionaria está unida químicamente al soporte, se

tiene alta estabilidad y se requiere poco tiempo para que se equilibre la columna.

Debido a que en el método empleado en la presente tesis se trabajó con fase inversa, de aquí en adelante, solamente se considerará este tipo de cromatografía.

d. Consideraciones Generales.

Este tipo de cromatografía se emplea cuando se tiene poca resolución, retención y asimetría de los picos, o se requiere mejorar la resolución de una mezcla donde los compuestos ionizables se deben separar, en cuyo caso, el empleo de par iónico aumenta la selectividad del sistema cromatográfico.

La obtención de un buen resultado en este tipo de cromatografía depende del control del factor de capacidad (k')_m para cada soluto de la muestra. Dado que k' depende de tres factores principalmente: la fase móvil, la fase estacionaria y el contraión, se tiene que para aumentar la k' , se puede hacer cualquiera de lo siguiente:

- a. Aumento de la cantidad de fase estacionaria.
- b. Aumentar la lipofilicidad de la fase estacionaria.
- c. Aumento de la hidrofobicidad y de la concentración del contraión.
- d. Máxima ionización del analito (pH óptimo).
- e. Aumento de la concentración e hidrofobicidad del cosolvente orgánico.
- f. Disminución de la temperatura de la columna.

CONTRAION

La clase del contraión, tamaño y concentración son de suma importancia para la separación. El tipo de contraión que se emplee depende del analito, si es una base fuerte ($pK_a \gg 8$) o débil ($pK_a \ll 8$). También, a mayor hidrofobicidad será mayor el factor de capacidad. Respecto a la concentración del contraión, al aumentar esta, aumenta la retención hasta un cierto punto donde empieza a disminuir, lo cual se puede explicar mediante la formación de núcleos quedando de esta manera muy pocos contraiones libres para complejar el ión del analito.

% DE COSOLVENTE

En general, a mayor concentración del cosolvente, o sea, el modificador orgánico de la polaridad reduce k' del analito.

pH

Para solutos ácidos con $pK_a \ll pH$ de la fase acuosa, el soluto formará un par iónico, mientras que cuando $pK_a \gg pH$, los solutos ácidos se pondrán en equilibrio con la fase móvil como ácidos libres. Si el par iónico no se forma completamente, se puede provocar el ensanchamiento de los picos. Si el pH de la fase varia, debido a una falta de buffer, los tiempos de retención cambiarán de una corrida a otra.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Dado que la temperatura afecta el equilibrio de reparto entre dos fases, un aumento de la temperatura disminuirá el valor de k' de los pares iónicos.

II.3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (24)

II.3.A. INTRODUCCION

En el desarrollo de un método analítico, como punto importante se debe realizar la validación del mismo, o sea, verificar su efectividad, para lo cual se realiza la evaluación de la precisión, la exactitud, la especificidad, la sensibilidad, etc. De esta manera, la validación de un método se puede definir como el conjunto de estudios de laboratorio mediante el cual se establece la capacidad del método para satisfacer los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

II.3.B CONCEPTOS BASICOS.

a. LINEALIDAD

La linealidad de un sistema o de un método analítico se prueba para asegurar la proporcionalidad dentro de un intervalo determinado de la respuesta o los resultados con respecto a la concentración del compuesto.

b. PRECISION

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente. En general, se expresa en términos de la desviación estándar (D.E.) o del coeficiente de variación (C.V.).

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a. La repetibilidad involucra las determinaciones independientes realizadas por el mismo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

b. La reproducibilidad involucra a las determinaciones independientes realizadas por diferentes días en el mismo y/o en diferente laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

c. EXACTITUD

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de la muestra a la cual se le adicionó una cantidad conocida de la sustancia.

d. LIMITE DE CUANTIFICACION

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

e. LIMITE DE DETECCION

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

f. ESPECIFICIDAD

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida solamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

g. TOLERANCIA

Es el grado de reproducibilidad del método analítico obtenido por el análisis de la mínima muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación tales como diferentes temperaturas, columnas, cambios en la fase móvil: pH, porcentaje de disolvente, etc.

h. ESTABILIDAD

La evaluación de la estabilidad determina el periodo de tiempo en el cual una solución puede retenerse antes de su análisis sin comprometer la exactitud. El retraso del análisis va más allá del procedimiento del método per se, incluyendo retrasos inesperados debidos al equipo.

C A P I T U L O I I I

D E S A R R O L L O E X P E R I M E N T A L

- III.1 REACTIVOS
- III.2 EQUIPO Y MATERIALES
- III.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES
- III.4 PARAMETROS DE VALIDACION
- III.5 APLICACION DEL METODO

III DESARROLLO EXPERIMENTAL

III.1 REACTIVOS

Alfa-metildopa	-AMPHAR BV
Dihidroxibencilamina (DHBA)	-SIGMA
Acetato de sodio	-J.T. BAKER
Acido cítrico	-J.T. BAKER
Octanosulfonato de sodio	-SIGMA
EDTA disódico (Titríplex III)	-Merck
EGTA (ácido etilenglicol -bis- (β -aminoetileter)- N,N,N',N'-tetracético)	-SIGMA
Glutación forma reducida (GSA)	-SIGMA
Trizma base	-SIGMA
Alúmina	-SIGMA
Acido acético glacial	-J.T. BAKER
Metanol grado cromatográfico	-Omnisolv
Acetonitrilo grado cromatográfico	-Omnisolv
Plasma	-Proporcionado por el Instituto Nacional de Nutrición.
Agua grado HPLC (14-16 Megohms)	
Cafeína anhidra	
Propranolol	-Proporcionado por Laboratorios Best.
Hidroclorotiazida	-SIGMA
Clorotiazida	-Proporcionada por Laboratorios Aplicaciones Farmacéuticas.
Dopamina	-SIGMA
Normetanefrina	-SIGMA
Deoxiepinefrina	-SIGMA
Arterenol	-SIGMA
Noradrenalina	-SIGMA
Adrenalina	-Merck
L-Dopa	-ICN

II.2. EQUIPO Y MATERIALES

Balanza analítica Mettler modelo AE 260
 Equipo de agua Milli-Q
 Potenciómetro Beckman modelo 445
 Baño de ultrasonido Cole-Parmer modelo 8851
 Equipo de filtración Millipore con membranas para:
 disolventes orgánicos Gelman Sciences de 0.2 μ
 disoluciones acuosas Gelman Sciences de 0.2 μ
 Micropipetas Labsystems Finnpiptette
 Pipeta automática Eppendorf
 Tubos de ensaye de 13 * 100 con tapón de rosca
 Tubos de ensaye de 13 * 100 de fondo cónico con tapón de
 rosca.
 Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix I
 Centrifuga Beckman modelo TJ-6
 Bomba de dos pistones Waters modelo 510
 Inyector automático Waters modelo 712 WISP
 Columna de acero inoxidable Nucleosil C-18, Tamaño de partícula
 de 10 μ , 25 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno,
 Macherey-Nagel
 Detector amperométrico Bioanalytical Systems (BAS) con los
 siguientes módulos:
 Compartimento de la celda CC-4
 Controlador amperométrico LC-4B
 Controlador para el precalentador LC-22A
 Integrador Waters modelo 745

III.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

III.3.A. PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución de Adsorción.

Disolver 24.22 g de TRIS y 0.2 g de EDTA disódico en
 aproximadamente 75 ml de agua grado HPLC. Ajustar el pH a $8.9 \pm$
 0.05 con ácido acético glacial. Llevar a volumen de 100 ml con
 agua HPLC.

Solución de Lavado.

Disolver 1 g de TRIS en aproximadamente 400 ml de agua grado HPLC. Ajustar el pH a 8.9 ± 0.05 con una solución de EDTA al 5%. Llevar a volumen de 500 ml con agua grado HPLC.

Solución de EDTA al 5%.

Disolver 5 g de EDTA en 100 ml de agua grado HPLC.

Solución Reguladora A.

Pesar las siguientes cantidades:

Acetato de sodio	6.6906 g	(50 mM)
Acido citrico	6.3172 g	(30 mM)
Octanosulfonato de sodio	1.02 g	(5 mM)
EDTA	0.0376 g	(0.1 mM)

Disolver en aproximadamente 900 ml de agua grado HPLC. Ajustar el pH a 3.35 ± 0.05 con ácido acético glacial. Llevar a volumen de 1000 ml. Filtrar a través de una membrana de 0.2μ de tamaño de poro.

Fase Móvil.

Mezclar 92 partes de solución reguladora A con 8 partes de metanol. Filtrar a través de membrana de 0.2μ de tamaño de poro. Sonificar durante 3 minutos para degasificar.

Solución de EGTA/GSA.

Disolver 1.08 g de EGTA, 900 mg de GSA en 6 ml de agua grado HPLC. Para su completa disolución, adicionar unas gotas de una solución de hidróxido de sodio 5 N, ajustando el pH a 5.0 ± 0.5 . Llevar a volumen de 10 ml con agua grado HPLC.

Aqua HPLC pH 4.0

Ajustar el pH de agua grado HPLC a 4.0 ± 0.05 con ácido acético diluido (1:200).

Solución Estándar de α -metildopa.

Pesar con exactitud el equivalente a 7.0 mg de α -metildopa. Transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 ml.

Disolverlo con agua grado HPLC pH 4.0 y llevar a volumen. Esta solución tiene una concentración de 700,000 ng/ml.

Transferir una alícuota de 1.0 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml. Llevar a volumen con agua grado HPLC pH 4.0. Esta solución tiene una concentración de 7,000 ng/ml.

Solución de Estándar Interno.

Pesar con exactitud el equivalente a 6.0 mg de DHBA, transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml. Disolver y llevar a volumen con agua grado HPLC pH 4.0. Concentración de $\pm 240,000$ ng/ml.

Transferir una alícuota de 1.0 ml a un matraz volumétrico de 10 ml, llevar a volumen con agua grado HPLC pH 4.0. Concentración de 24,000 ng/ml.

Transferir una alícuota de 0.125 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a volumen con acetonitrilo. Concentración de 120 ng/ml.

III.3.B. PREPARACION DE CURVAS ESTANDAR.

Se preparan dos curvas estándar. La primera es una curva estándar en medio acuoso con la finalidad de poder evaluar la exactitud de método. La segunda es la curva estándar en plasma que se utilizará a lo largo de la validación del método y la aplicación del mismo. En ambos casos, se colocan las cantidades de las soluciones indicadas.

i. CURVA ESTANDAR EN MEDIO ACUOSO.

Tabla No. 1.

ii. CURVA ESTANDAR EN PLASMA.

Tabla No. 2.

METILDOPA (7000 ng/ml) (ml)	D H B A (24000 ng/ml) (ml)	AFORO FINAL CON BUFFER A (ml)	CONC. FINAL DE α -METILDOPA (ng/ml)
0.075	0.05	10.00	52.5
0.145	0.05	10.00	101.5
0.355	0.05	10.00	248.5
0.715	0.05	10.00	500.5
1.430	0.05	10.00	1001.0
2.145	0.05	10.00	1501.5
2.855	0.05	10.00	1998.5
3.575	0.05	10.00	2502.0

TABLA No. 1 CANTIDADES DE α -METILDOPA Y DIHIDROXIBENCILAMINA
NECESARIAS PARA LA PREPARACION DE LAS CURVAS
ESTANDAR EN MEDIO ACUOSO.

α -METILDOPA (7000 ng/ml) (ml)	SOLUCION EGTA/GSA (ml)	PLASMA (ml)	AFORO FINAL CON H ₂ O pH 4 (ml)	CONC. FINAL DE METILDOPA (ng/ml)
0.075	0.05	6.125	10.00	52.5
0.145	0.05	6.125	10.00	101.5
0.355	0.05	6.125	10.00	248.5
0.715	0.05	6.125	10.00	500.5
1.430	0.05	6.125	10.00	1001.0
2.145	0.05	6.125	10.00	1501.5
2.855	0.05	6.125	10.00	1998.5
3.575	0.05	6.125	10.00	2502.0

TABLA No. 2 CANTIDADES DE α -METILDOPA, SOLUCION ESTABILIZADORA DE EGTA/GSA Y PLASMA PARA LA PREPARACION DE LAS CURVAS ESTANDAR.

III.3.C TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procedimiento para el tratamiento de las muestras consta de cuatro etapas:

i. PRECIPITACION DE PROTEINAS.

A una alícuota de 1 ml de plasma colocada en un tubo de ensayo de 13 * 100 mm con tapón de rosca, adicionar 1,0 ml de la solución de DHBA (concentración de 120 ng/ml en acetonitrilo). Agitar en vórtex durante 1 minuto y centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm.

ii. ADSORCION.

Transferir el sobrenadante de cada tubo a otro de 13 * 100 mm de fondo cónico con tapón de rosca que contenga 100 mg de alúmina y 0.5 ml de la solución de adsorción. Tapar herméticamente y agitar en vórtex durante 15 minutos. Verificar que la agitación sea homogénea. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm. Aspirar y desechar el sobrenadante.

iii. LAVADO.

Adicionar a cada tubo 1.0 ml de la solución de lavado. Agitar en vórtex por 1 minuto. Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm. Aspirar y desechar el sobrenadante. Este paso se repite por un total de tres veces.

iv. ELUCION.

Adicionar a cada tubo 0.5 ml de la solución reguladora A. Agitar en vórtex durante 5 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm.

Transferir el sobrenadante a viales de 300 µl de capacidad e inyectarlo al sistema cromatográfico, el cual ha sido acondicionado con la fase móvil a un flujo de 1.6 ml/min, el electrodo de trabajo colocado a un potencial de +750 mV, una escala completa de 10 nAmp y el precalentador de la fase móvil a 50°C.

III.4. PARAMETROS DE VALIDACION.

III.4.A. LINEALIDAD.

a. Linealidad del Sistema.

Se inyectaron por duplicado cada una de las ocho concentraciones de la curva estándar sin tratar durante cuatro días. Así, se evaluó la respuesta del detector en un intervalo de 52.5 a 2500 ng/ml al graficar la altura relativa de α -metildopa en función de su concentración.

Criterio de aceptación.

$$b \cong 0$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

Resultado

En la tabla No. 3 se muestran los resultados de las alturas relativas obtenidas para cada una de las ocho concentraciones.

Mediante un análisis de regresión se observaron los siguientes parámetros (Gráfica No. 1):

$$n = 32$$

$$b = -0.0032 \quad \text{Intervalo de Confianza (A 95\%)} = 0.2761 \text{ a } 0.2698$$

$$m = 0.0092 \quad \text{Intervalo de Confianza (A 95\%)} = 0.0090 \text{ a } 0.0094$$

$$r = 0.9982$$

$$r^2 = 0.9963$$

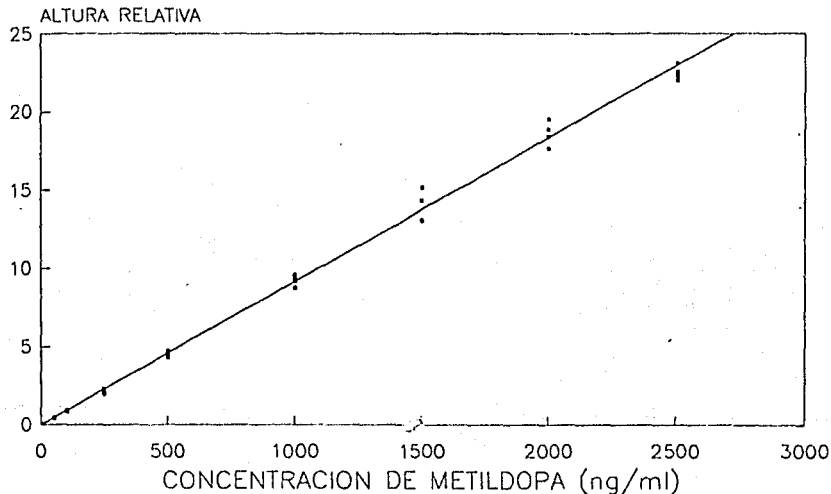
Con estos resultados se puede concluir que existe una relación altamente significativa entre la concentración de metildopa (ng/ml) y la respuesta (altura relativa), y que la ordenada de esta relación lineal pasa por el origen. Por lo tanto, el modelo matemático que describe este comportamiento está dado por la ecuación de la recta:

$$y = 0.0092 x$$

CONCENTRACION DE METILDOPA (ng/ml)	A L T U R A R E L A T I V A			
	D I A			
	1	2	3	4
52.5	0.4321	0.4811	0.4825	0.4245
101.5	0.9002	0.8993	0.9074	0.8608
248.5	1.0917	2.2050	2.2132	2.0257
500.5	4.4601	4.6009	4.7175	4.2947
1001.0	9.5054	9.1010	9.3350	8.7585
1501.5	14.3586	14.3513	15.1583	13.0601
1998.5	10.5369	10.4207	10.9088	17.6866
2502.5	22.5608	22.0161	23.0976	22.2930

TABLA No. 3 ALTURAS RELATIVAS DE METILDOPA OBTENIDAS DE LA CURVA ESTANDAR EN MEDIO ACUOSO SIN TRATAR DURANTE 4 DIAS VERIFICANDO LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

LINEALIDAD DEL SISTEMA CURVA ESTANDAR SIN TRATAR



GRAFICA NO. 1

$n = 32$ $r = 0.9982$ $r^2 = 0.9963$ $y = 0.0092 x$

b. Linealidad del Sistema en Medio Plasmático.

Esta prueba se hizo con la finalidad de verificar si la respuesta obtenida después del tratamiento de las muestras en plasma seguía el comportamiento lineal.

Las muestras se trabajaron por duplicado en cada una de las concentraciones de la curva estándar en plasma de acuerdo al punto III.3.C., durante seis días. La linealidad de la respuesta se evaluó nuevamente al analizar la respuesta (altura relativa) en función de la concentración.

Criterio de Aceptación

$$b \cong 0$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

Resultados

La tabla No. 4 contiene los datos graficados (Gráfica No. 2) de las alturas relativas obtenidas para cada una de las diferentes concentraciones, y que mediante un análisis de regresión se obtiene:

$$n = 48$$

$$b = -0.0963 \quad \text{Intervalo de Confianza (A 95\%)} = -0.3363 \text{ a } 0.1437$$

$$m = 0.0095 \quad \text{Intervalo de Confianza (A 95\%)} = 0.0093 \text{ a } 0.0097$$

$$r = 0.9979$$

$$r^2 = 0.9959$$

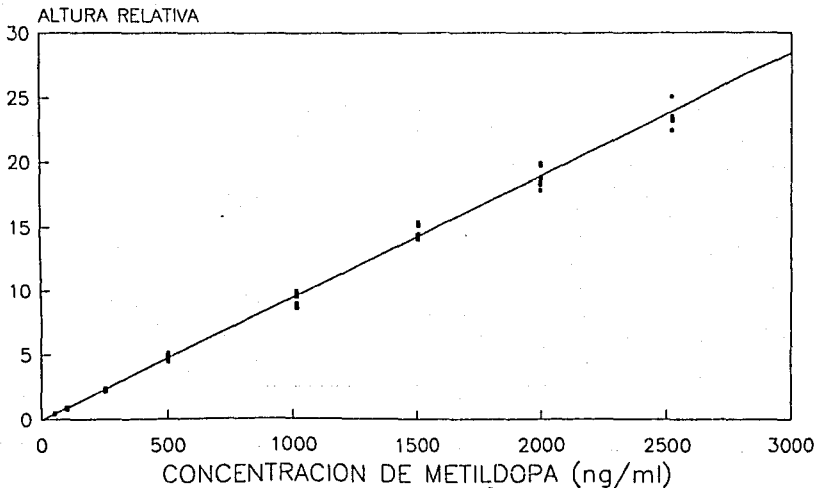
De estos resultados se puede concluir que existe una relación altamente significativa entre la concentración de metildopa y la respuesta del detector, aún después del tratamiento de las muestras, y que la gráfica obtenida pasa por el origen. El modelo matemático que describe este comportamiento está dado por la ecuación de la recta:

$$y = 0.0095 x$$

CONCENTRACION DE METILDOPA (mg/ml)	ALTURA RELATIVA					
	1	2	3	4	5	6
50.5	0.4511	0.4711	0.4817	0.4906	0.4756	0.4531
101.5	0.6115	0.6214	0.6359	0.6450	0.6410	0.6296
248.5	0.9271	2.3193	0.9384	2.1641	2.1757	2.1631
500.5	4.4300	5.0718	4.4276	4.3038	4.3715	4.4647
1015.0	8.9687	8.9416	9.1382	8.6720	8.5384	8.6396
1505.0	14.0812	10.3601	14.1707	14.4484	14.3206	14.2537
1985.0	18.2992	18.7470	18.8118	18.8176	19.8921	17.3293
2520.0	25.5023	25.6002	25.4741	25.3476	25.3168	25.0672

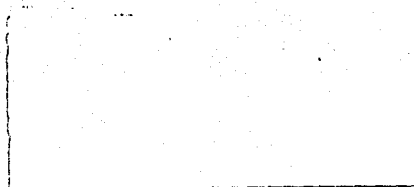
TABLA No. 4 ALTURAS RELATIVAS DE METILDOPA OBTENIDAS DE LAS CURVAS ESTANDAR EN PLASMA PARA CORROBORAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA UNA VEZ APLICADO EL METODO ANALITICO

LINEALIDAD DEL SISTEMA MEDIO PLASMATICO



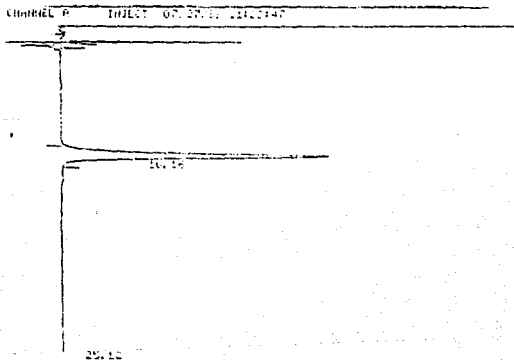
GRAFICA No. 2

$n = 45$ $r = 0.9973$ $r^2 = 0.9959$ $y = 0.0095 x$



NO DATA, CHANNEL B

FIGURA No. 12 BLANCO DE PLASMA



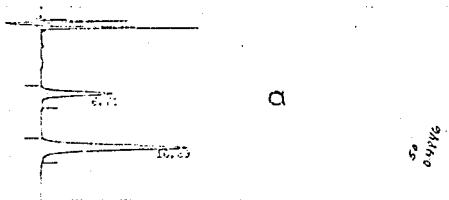
INPUT OVERRANGE AT RT= 1.42

SUST.	RELACIONADO	07.27.80	11122147	CH= "A"	PS= 1.		
FILE	1.	METHOD	0.	CON	2	INDEX	2
PEAK	HT%	RT	PE	HT	PC		
1	100.	10.16	231775	01			
TOTAL	100.		231775				

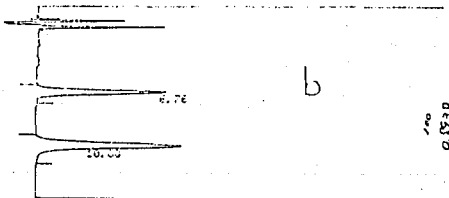
FIGURA No. 13 ESTANDAR INTERNO DE HIDROXIBENCILAMINA A
CONCENTRACION DE 120 ng/ml

FIGURA No. 14 CURVA ESTANDAR EN PLASMA CORRESPONDIENTE A LAS
CONCENTRACIONES DE:

- | | |
|----------------|-----------------|
| a) 52.5 ng/ml | e) 1015.0 ng/ml |
| b) 101.5 ng/ml | f) 1505.0 ng/ml |
| c) 248.5 ng/ml | g) 1995.0 ng/ml |
| d) 500.5 ng/ml | h) 2520.0 ng/ml |



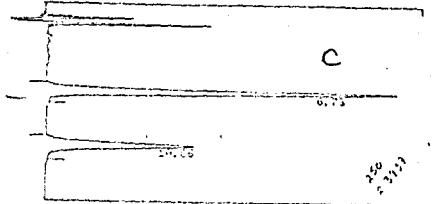
FILE 1.	METHOD	Q.	FOR 110	INDEX 110
NETILDOFA	05/03/99	20128124	CH= "R"	PS= 1.
PEAK#	RT	RT	F.	AT 50
1	6.71	6.71	26105	01
2	10.53	10.53	157441	01
TOTAL	100.		201247	



FILE 1.	METHOD	Q.	FOR 110	INDEX 110
NETILDOFA	05/03/99	20128156	CH= "R"	PS= 1.
PEAK#	RT	RT	F.	AT 50
1	6.76	6.76	126470	01
2	10.50	10.50	154920	01
TOTAL	100.		200299	

CHANNEL A INJECT 05/02/89 20:20:47

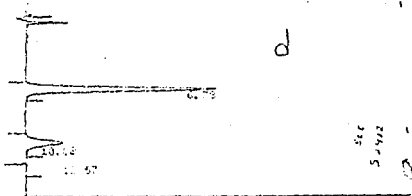
61



METILDOPA 05/02/89 20:20:47 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 114 INDEX 114

PEAK#	RT	FT	PI	HT	GC
1	20.804	6.73	271404	01	
2	29.468	10.08	178352	01	

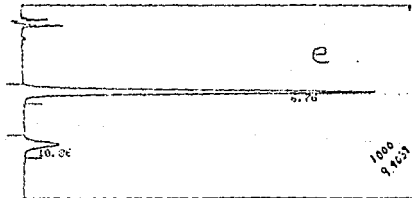


METILDOPA 05/02/89 20:24:11 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 117 INDEX 117

PEAK#	RT	FT	PI	HT	GC
1	30.742	6.73	203570	01	
2	15.787	10.08	10940	01	
3	1.471	10.87	5619	02	

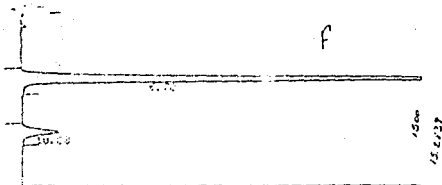
CHANNEL A INJECT 05/02/89 20:41:50



METILDOPA 05/02/89 20:41:50 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 118 INDEX 118

PEAK#	RT	FT	PI	HT	GC
1	34.824	6.73	176370	01	
2	26.121	6.73	1011	01	



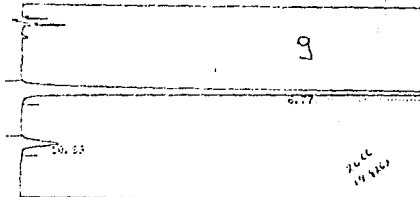
NETILDOPA 05/04/05 00125110 CH# "A" PS# 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 122 INDE: 121

PERK# HTZ RT FT RT EC

1	95.197	6.77	770.50	01
2	4.302	10.89	13370	01

CHANNEL A INJECT 05/04/05 00125110



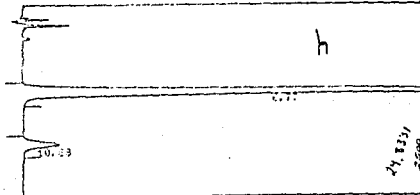
NETILDOPA 05/04/05 00125110 CH# "A" PS# 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 122 INDE: 122

PERK# HTZ RT FT RT EC

1	95.197	6.77	770.50	01
2	4.302	10.89	13370	01

CHANNEL A INJECT 05/04/05 00125110



NETILDOPA 05/04/05 00125110 CH# "A" PS# 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 124 INDE: 124

PERK# HTZ RT FT RT EC

1	96.129	6.77	95270	01
2	2.871	10.88	13560	01

Comparación de la Curva Estándar en Medio Acuoso y en Plasma después del Tratamiento de las Muestras.

Por medio de la prueba t se compararon las pendientes de las curvas estándar tanto en medio acuoso como en plasma, la cual sigue el método analítico desarrollado.

Hipótesis

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_a: m_1 \neq m_2$$

Estadígrafo de Contraste

$$t_{cal} = \frac{m_1 + m_2}{(\hat{S}_{y/x_1} + \hat{S}_{y/x_2}) \sqrt{\frac{1}{\Sigma x_1^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{\Sigma x_2^2 - \frac{(\Sigma x_2)^2}{n_2}}}} \dots (1)$$

$$\text{Con gl} = n_1 + n_2 - 4$$

Donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - b \Sigma y - m \Sigma xy}{n}} \dots (2)$$

$$S_{y/x} = S_{y/x} = \frac{s}{\sqrt{n}} \dots (3)$$

Criterio de Aceptación

$$t_{tab} \geq t_{cal}$$

Resultado

$$\begin{aligned} n_1 &= 32 \\ b_1 &= -0.0032 \\ m_1 &= 0.0092 \\ S_{y/x_1} &= 0.4830 \\ \hat{S}_{y/x_1} &= 0.4989 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n_2 &= 48 \\ b_2 &= -0.0963 \\ m_2 &= 0.0095 \\ S_{y/x_2} &= 0.5333 \\ \hat{S}_{y/x_2} &= 0.5448 \end{aligned}$$

Sustituyendo en (1):

$$t_{cal} = \frac{-3.246 \times 10^{-4}}{(1.0436) \sqrt{6.8963 \times 10^{-8}}}$$

$$t_{cal} = \frac{-3.2746 \times 10^{-4}}{2.7401 \times 10^{-4}}$$

$$t_{cal} = 1.199$$

Con $gl = 32 + 48 - 2 = 76$, se obtiene un t de tablas a $\alpha=0.05$ de:
1.992

Dado que $t_{tab} > t_{cal}$, se acepta la hipótesis nula y se concluye que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas estándar tanto en medio acuoso como en medio plasmático con un 95 % de confianza.

c. Linealidad y Exactitud del Método.

La linealidad del método se evaluó con la cantidad de α -metildopa recuperada en función de la cantidad agregada. Para ello se interpolaron las alturas relativas de las muestras en plasma en una curva estándar sin tratar. Estos análisis se realizaron durante seis días. Los resultados se muestran en la tabla No. 5.

Criterio de Aceptación

$$b \cong 0$$

$$m = 1$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

Resultados

Al graficar los resultados (Gráfica No. 3), se obtuvieron los siguientes parámetros:

$$n = 48$$

$$b = -5.2195 \quad \text{Intervalo de Confianza}_{(95\%)} = -33.2745 \text{ a } 22.8355$$

$$m = 1.0461 \quad \text{Intervalo de Confianza}_{(95\%)} = 1.0249 \text{ a } 1.0679$$

$$r = 0.9979$$

$$r^2 = 0.9945$$

Dado que el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye al cero, se puede concluir que el método carece de error sistemático constante.

Sin embargo, aunque existe una relación altamente significativa de la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, se observa que el intervalo de confianza para la pendiente de la curva es muy cercana a 1, pero estadísticamente mayor, lo cual se debe a que el método presenta un error sistemático proporcional por exceso.

Al analizar los porcentajes de recobro (Tabla No. 6), se observa una ligera tendencia al aumento conforme la muestra lleva mas días guardada antes del análisis (Gráfica No. 4). Este efecto es mucho más significativo en las concentraciones bajas, y esto explica el error sistemático proporcional que existe. Probablemente sea un fenómeno de adsorción irreversible no controlado.

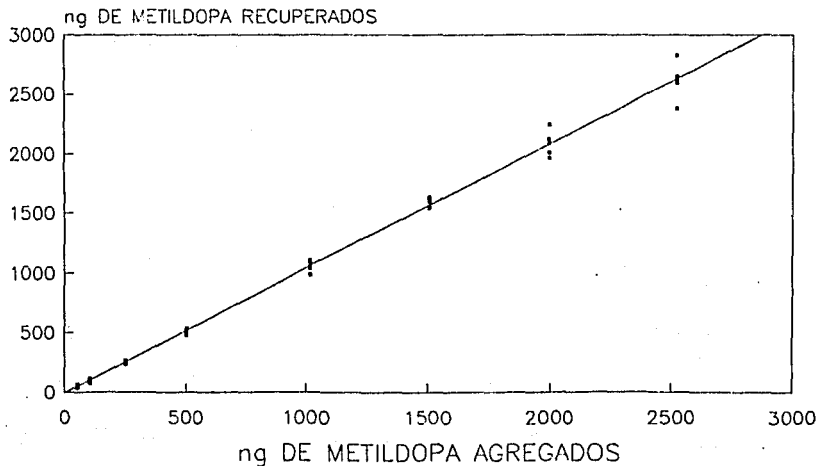
CONCENTRACION
DE METILDOPA

R E C O R D O S (ng/ml)

Conc. (ng/ml)	R E C O R D O S						\bar{X}	S	S. D. V.
	1	2	3	4	5	6			
42.5	38.85	42.70	42.35	39.14	45.60	43.14	42.93	11.61	31.17
161.5	72.70	82.15	80.35	147.15	150.80	112.10	97.24	15.42	13.80
246.5	235.00	247.77	257.94	266.07	250.00	251.11	248.81	12.60	4.34
500.5	479.79	535.28	510.00	540.36	514.70	511.71	516.61	21.60	4.17
1015.0	964.91	1052.11	1033.21	1100.24	1034.15	982.05	1032.75	49.00	4.73
1505.0	1543.75	1625.00	1621.75	1635.00	1621.50	1614.25	1606.91	32.50	2.95
1995.0	2015.98	2090.20	1990.70	2120.10	2040.78	2015.60	2077.75	100.50	4.84
2520.0	2595.67	2653.24	2531.91	2724.73	2632.54	2622.10	2619.23	143.05	5.46

TABLA No. 5 RECOBROS DE METILDOPA OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE LAS CURVAS ESTANDAR EN PLASMA DURANTE SEIS DIAS PARA VERIFICAR LA LINEALIDAD DEL METODO

LINEALIDAD DEL METODO



$n = 48$ $r = 0.9979$ $r^2 = 0.9945$ $m = 1.0461$ $b = -5.2195$

GRAFICA No. 3

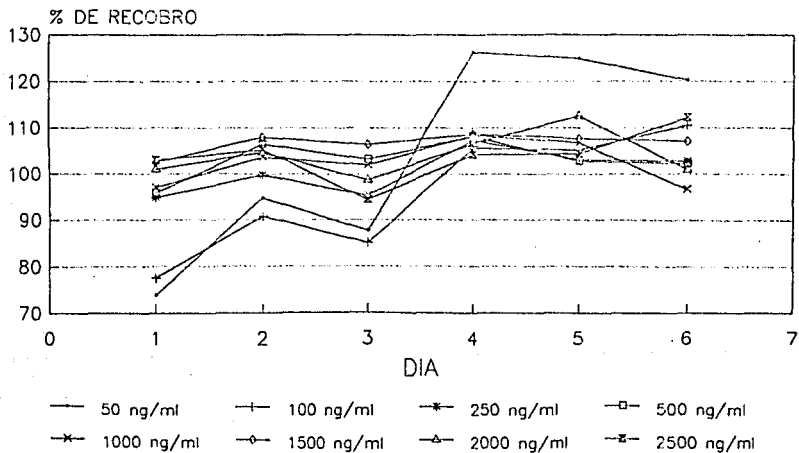
CONCENTRACION
DE METILDOPA

R E C O P R O S (%)

CONCENTRACION	D I A						\bar{X}	S	% C.V.
	1	2	3	4	5	6			
52.5	73.85	94.70	87.71	124.15	124.95	110.20	104.62	22.12	21.14
101.5	77.59	90.77	85.08	105.89	105.26	110.53	95.81	13.35	13.80
248.5	94.81	94.69	95.39	107.31	103.22	102.85	100.15	4.87	4.84
500.5	95.86	106.45	103.14	103.06	102.85	102.24	103.12	4.22	4.08
1015.0	87.04	103.66	101.29	103.33	106.81	99.75	102.44	4.85	4.73
1505.0	102.55	107.37	106.42	103.64	107.75	107.26	106.77	2.18	2.04
1995.0	101.05	104.75	98.73	106.57	111.67	101.05	104.15	5.04	4.84
2520.0	102.70	105.29	94.42	104.16	104.47	112.03	103.94	5.60	5.40

TABLA No. 6 % DE RECOBRO DE METILDOPA OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE LAS CURVAS ESTANDAR EN PLASMA DURANTE SEIS DIAS PARA VERIFICAR LA PRECISION DEL METODO

CAMBIOS DEL % DE RECOBRO DE METILDOPA



GRAFICA N.º. 4

0

III.4.B PRECISION

a. Precisión del Sistema.

Se evaluó diariamente antes de inyectar las muestras de cada experimento, para lo cual se inyectaba una muestra de la curva estándar por sextuplicado y con las alturas relativas se obtenía el coeficiente de variación mediante la ecuación:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

Criterio de Aceptación

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

Resultados

En todos los casos, el coeficiente de variación fué menor a 1.5 %, por lo que el sistema se consideró que era preciso. Los resultados de cinco días se muestran en la tabla No. 7.

DIA	n	\bar{X}	S	% C. V.
1	6	0.8302	0.0083	0.89
2	6	0.9040	0.0088	1.08
3	6	0.8391	0.0031	0.37
4	6	5.3340	0.0400	0.75
5	6	6.3102	0.0451	0.85

TABLA No. 7 COEFICIENTES DE VARIACION PARA UN PUNTO DE LA CURVA ESTANDAR EN MEDIO ACUOSO DETERMINADO DURANTE SEIS DIAS PARA OBTENER LA PRECISION DEL SISTEMA.

b. Precisión del Método.

La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos de las muestras en plasma después del tratamiento en seis días.

Criterio de Aceptación

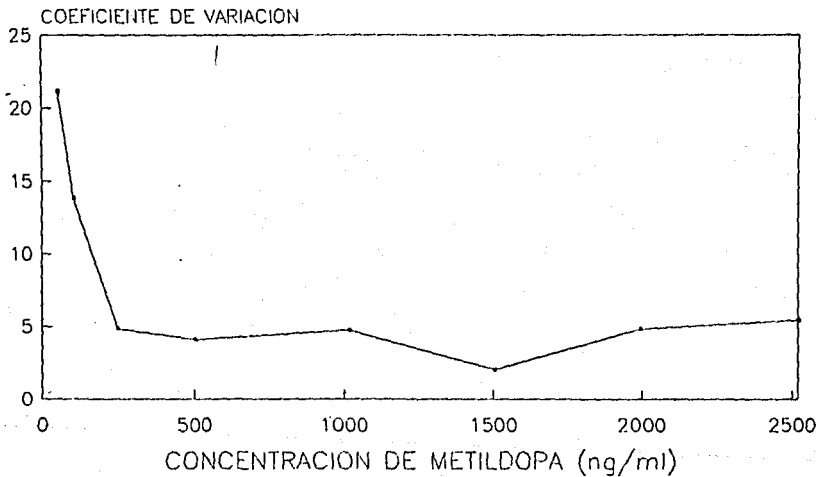
$$\text{C.V.} \leq 15 \%$$

Resultados

Al observar los coeficientes de variación de los recobros (Tabla No. 6), se observa que el método es preciso a partir de la concentración de 100 ng/ml, ya que es donde se obtiene un coeficiente de variación de 13.8 %.

En la gráfica 5 se puede ver claramente como disminuye el coeficiente de variación de las concentraciones de 52.5 a 100 ng/ml, mientras que de 100 a 2500 ng/ml se mantiene en valores bajos. Por lo tanto, el método es preciso a partir de la concentración de 100 ng/ml.

PRECISION DEL METODO



GRAFICA No. 5

III. 4. C CANTIDAD MINIMA CUANTIFICABLE.

La cantidad mínima cuantificable se estimó mediante dos criterios:

a. Aquella cantidad mínima cuyo coeficiente de variación de las determinaciones hechas a partir de plasma durante seis días fuera menor o igual al 15 %.

b. Matemáticamente al graficar la respuesta de las determinaciones hechas en plasma durante seis días en función de la concentración del analito. De aquí se obtuvieron los parámetros de la recta que se emplearon para realizar el cálculo.

Resultados

a. De acuerdo al criterio de coeficiente de variación, la cantidad mínima cuantificable es de 100 ng/ml, ya que el C.V., es de 13.80 %.

b. De acuerdo al cálculo matemático, se observa un resultado similar. Al graficar la respuesta relativa obtenida en función de la concentración (Gráfica No. 2), se obtuvieron los siguientes datos:

n =	48	$\Sigma y^2 =$	7498.64
r =	0.9979	$\Sigma y =$	448.36
$r^2 =$	0.9958	$\Sigma xy =$	791531.28
m =	0.0095		
b =	- 0.0963		

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\Sigma y^2) - b \Sigma y - m \Sigma xy}{n}} \quad \dots (4)$$

$$S_{y/x} = 0.5333$$

$$2 S_{y/x} = 1.06668$$

$$y = \bar{y} \pm 2 S_{y/x} \dots (5)$$

$$y = mx + b \dots (6)$$

Si $x = 0$, entonces $y = b$, y sustituyendo en (5), se tiene que:

$$y = b \pm 2 S_{y/x} \dots (7)$$

$$y = -0.0963 \pm 1.0666$$

$$y = (-1.1629 - 0.9703)$$

Dado que $y = mx + b$, y tomando en cuenta el valor superior del rango anterior, se obtiene que:

$$x = \frac{y - b}{m} \dots (8)$$

$$x = \frac{0.9703 + 0.0963}{0.0095}$$

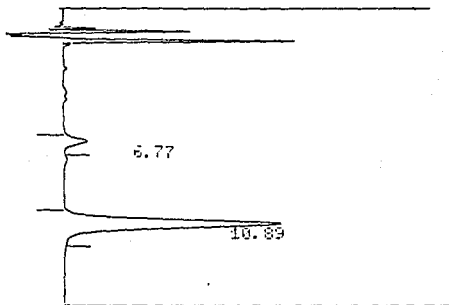
$$x = 112.14 \text{ ng/ml}$$

Se observa que por los dos métodos se obtienen resultados semejantes, por lo que se concluye que la cantidad mínima cuantificable es de 110 ng/ml.

Por otra parte, la cantidad mínima detectable es menor a 10 ng/ml, ya que en las determinaciones hechas de esta concentración no se tuvo interferencia de ruido del equipo (fig. 15).

Dado que la cantidad mínima detectable es menor a una décima parte de la cantidad mínima cuantificable, ya no fué necesario determinar la primera experimentalmente. Por otra parte, es necesario recordar que las concentraciones mínimas de fármaco que se estima cuantificar son alrededor de 100 ng/ml y esto indica que no es necesario buscar un límite de detección menor.

CHANNEL A INJECT 05/03/89 20:43:43



METILDOPA		05/03/89 20:43:43		
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 108	INDEX 108	
PEAK#	HT%	RT	PK HT BC	
1	9.405	6.77	15826	01
2	90.595	10.89	152455	01
TOTAL	100.		168281	

FIGURA No. 15 CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE A LA CONCENTRACION DE 10 ng/ml DE METILDOPA ($t_R = 6.77$ min). SE OBSERVA QUE NO EXISTE INTERFERENCIA DE RUIDO CON ESTA SEÑAL.

III.4.D. REPRODUCIBILIDAD.

Se analizaron por triplicado muestras de 100, 500 y 2000 ng/ml de α -metildopa en plasma por dos analistas en dos diferentes días. Las alturas relativas se interpolaron en una curva estándar preparada en plasma por cada uno de los analistas en cada día.

Con el objeto de ver si el método es reproducible, y de acuerdo a los criterios seguidos en el Centro A. F. de Estudios Tecnológicos, se compararon los coeficientes de variación globales para cada concentración con aquellos obtenidos durante la evaluación de la linealidad.

Criterio de Aceptación

Los coeficientes de variación obtenidos para cada una de las concentraciones de manera global, deben ser menores que aquellos obtenidos durante la estimación de la linealidad del método.

Sin embargo, para saber si la varianza obtenida globalmente se debe al día, al analista, al nivel de concentración o a la interacción entre ellos, se realizará un análisis de varianza considerando un experimento de dos factores, y en este caso, al aplicar la prueba F de Snedecor, los valores de F calculadas deberán ser menores que las F de tablas.

Resultados

Los porcentajes de recobro así como su coeficiente de variación se muestran en la tabla no. 8.

Se observa que en todos los niveles de concentración empleados, los coeficientes de variación son menores que los obtenidos cuando se evaluó linealidad del método. Por esta razón, se considera que el método es reproducible tanto entre analistas como entre días para un mismo analista.

100 ng/ml

	DIA 1	DIA 2			
ANALISTA 1	107.45	109.77			
	105.32	109.24	n = 12		
	104.91	108.53	\bar{x} = 108.64	C. V.	EN
			s = 3.725	LINEALIDAD	
ANALISTA 2	104.83	111.81			13.80 %
	100.58	108.93	C. V. = 3.49 %		
	99.52	108.74			

500 ng/ml

	DIA 1	DIA 2			
ANALISTA 1	101.79	96.35			
	101.77	95.37	n = 12		
	100.55	95.22	\bar{x} = 97.62	C. V.	EN
			s = 2.728	LINEALIDAD	
ANALISTA 2	98.32	98.03			4.84 %
	97.93	96.76	C. V. = 2.79 %		
	96.57	92.76			

2000 ng/ml

	DIA 1	DIA 2			
ANALISTA 1	105.05	99.16			
	104.58	96.88	n = 12		
	102.53	95.84	\bar{x} = 100.79	C. V.	EN
			s = 3.554	LINEALIDAD	
ANALISTA 2	105.98	99.84			4.17 %
	104.18	99.73	C. V. = 3.53 %		
	99.09	96.59			

TABLA No. 8 % DE RECOBRO PARA LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METILDOPA EN PLASMA EMPLEADAS PARA VERIFICAR LA REPRODUCIBILIDAD POR ANALISTA Y POR DIA

ANALISIS DE VARIANZA

Considerando las medias de los resultados de tabla No. 8, se obtienen los siguientes datos:

FACTOR A	FACTOR B ANALISTA	REPETICIONES		TOTAL
		DIA 1	DIA 2	
100	1	105.89	109.18	215.07
	2	101.84	109.83	211.56
500	1	101.37	95.65	197.02
	2	97.61	95.85	193.46
2000	1	104.05	97.29	201.34
	2	103.08	98.72	201.80
TOTAL		613.73	608.52	1220.18

Obteniendo el factor de corrección:

$$C = \frac{(1220.18)^2}{12} = 124,065.87$$

La suma total de cuadrados:

$$SST = 263.02$$

Las sumas de cuadrados de los tratamientos (Tr), de las repeticiones (R) y del error (E):

$$SS(Tr) = 173.81$$

$$SS(R) = 4.22$$

$$SS(E) = 84.99$$

Reacomodando los resultados para los dos factores:

FACTOR A	CONCENTRACION	FACTOR B ANALISTA		TOTAL
		1	2	
		100	215.07	
500	197.02	193.46	390.48	
2000	201.34	201.80	403.14	
		603.43	608.73	1220.18

Obteniendo la suma de cuadrados para los dos factores A, B y para su interacción AB:

$$SSA = 167.35$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

$$SSB = 3.74$$

$$SS(AB) = 2.72$$

Finalmente, dividiendo las sumas de cuadrados por sus grados de libertad y el cuadrado medio del error, se obtienen los valores de la función de F de Snedecor.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{CAL}	F _{TAB}
DIA	1	4.22	4.22	0.25	6.61
CONCENTRACION	2	167.35	83.67	4.92	5.79
ANALISTA	1	3.74	3.74	0.22	6.61
INTERACCION	2	2.72	1.36	0.08	5.79
ERROR	5	84.99	17.00		
TOTAL	11	263.02			

Dado que para todas las posibles fuentes de variación la F calculada es menor que la f de tablas al 95 % de confianza, se concluye que no hay efecto entre días, analistas, concentraciones ni entre sus interacciones, por lo que el método es reproducible.

III. 4. E. ESPECIFICIDAD.

Se probaron dos tipos de sustancias:

- a. Fármacos que se coadministran con α -metildopa.
- b. Sustancias endógenas relacionadas estructuralmente a α -metildopa y a sus metabolitos.

Así, se estudiaron un total de 10 sustancias.

Resultados

Las sustancias probadas así como su concentración, tiempo de retención y su factor de capacidad se resumen en la siguiente tabla (No. 9).

SUSTANCIA	CONCENTRACION	t_R	t'_R	k'
1. Propranolol	50 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-
2. Hidroclorotiazida	217 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-
3. Clorotiazida	50 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-
4. Alfametilidopa	210 ng/ml	5.88	4.48	3.188
5. Noradrenalina	250 ng/ml	5.88	4.48	3.200
6. Adrenalina	250 ng/ml	7.60	8.20	4.420
7. Cafeína	71 $\mu\text{g/ml}$	9.26	7.88	5.614
8. DIHA	120 ng/ml	10.16	8.76	8.257
9. Normetanefrina	250 ng/ml	11.68	10.26	7.320
10. Dopamina	250 ng/ml	17.28	15.88	11.320
11. Deoxilopinefrina	250 ng/ml	19.50	18.10	12.020

TABLA No. 9 SUSTANCIAS EMPLEADAS PARA VERIFICAR LA ESPECIFICIDAD DEL METODO

NOTA: El tiempo muerto es de 1.4 minutos.

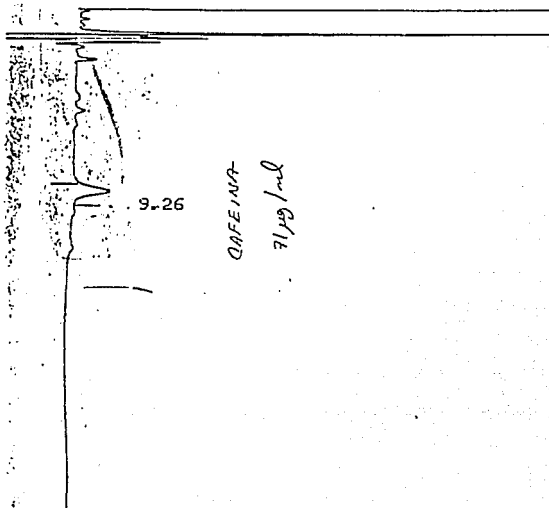
Las sustancias que se coadministran con la α -metildopa, o sea, 1 - 3 no interfieren con el análisis, ya que al potencial empleado (+ 750 mV) no hay reacción óxido-reducción y por tanto no hay señal cromatográfica.

La cafeína podría llegar a interferir con el estándar interno puesto que sus tiempos de retención son muy semejantes (Fig. 16). De cualquier manera, se obtiene una α (selectividad) de 1.115 y una resolución de 1.551, por lo que se puede cuantificar a DHBA sin ningún problema.

Respecto a las catecolaminas endógenas, la noradrenalina llega a interferir con la α -metildopa (Fig. 18 y 19); los picos no se resuelven ($R = 0.727$) y se tiene una selectividad (α) de 1.004. De cualquier manera, esto no es preocupante puesto que las concentraciones plasmáticas de noradrenalina secretada por la médula suprarrenal son de 0.1 a 0.3 ng/ml (6) por lo que se considera que esto no interferirá al emplear este método en estudios de bioequivalencia.

CHANNEL A

INJECT 07/27/89 14:33:27



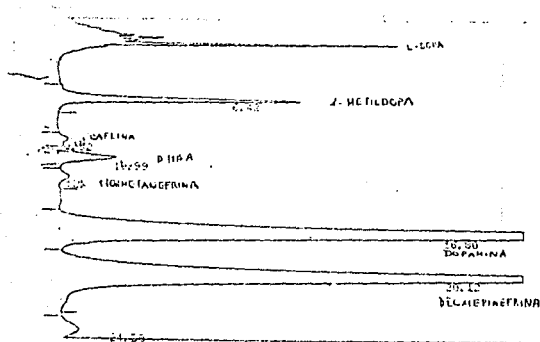
INPUT OVERRANGE AT RT= 1.75

SUST. RELACIONADAS 07/27/89 14:33:27

FILE 1. METHOD 0. RUN 6 INDEX 6

PEAK#	HTZ	RT	PK HT. BC
1	100.	9.26	23496 01
TOTAL	100.		23496

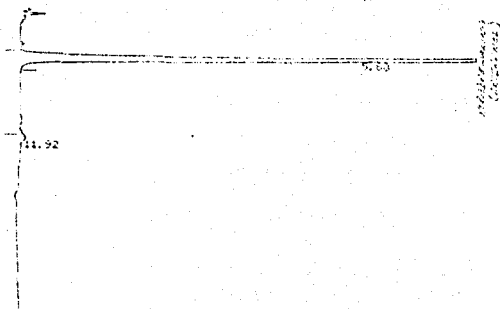
FIGURA No. 16 CROMATOGRAMA DE LA CAFEINA EN CONDICIONES
 NORMALES DE EXPERIMENTACION Y CONCENTRACION
 DE 71 µg/ml



SUST. RELACIONADAS /PLASMA 07/28/73 10:00:14 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METIHO	U.	FUN	3	INDEX	5
PERICA	HTC	FT	FI	HT	EC		
1	13.102	0.42	201037	01			amulidopa
2	0.475	9.52	201037	02			cafeina
3	2.075	10.99	21748	02			DHA A
4	0.5	11.40	1004	05			normetanfina
5	40.955	10.0	21748	02			expantina
6	20.110	10.12	200531	07			Dopamina
7	0.705	24.3	19290	01			
TOTAL	100.		200940				

FIGURA No. 17 MUESTRA DE PLASMA CON LAS SUSTANCIAS
EMPLEADAS EN ESPECIFICIDAD.



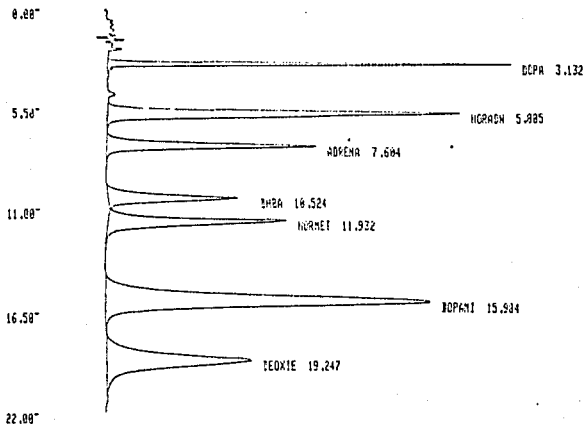
INPUT OVERRANGE AT 11.92 11.92

SUST.	RELATIONSHIP	RT	AREA	PERCENT
1	0.401	11.92	100.00	100.00
TOTAL			100.00	100.00

FIGURA No. 10 CROMATOGRAMA DE LA NORADRENALINA

SAMPLE 5

12:45 SEP. 07 1989



NO.	NAME	RT	CAL. METHOD		CONC
			SF	PB	
			.100000 ₁₀ +03	.100000 ₁₀ +01	.100000 ₁₀ +01
1					
2	DOPA	3.132			23.1752
3	NORADH	5.805			20.1778
4	METDOP				
5	ADPENA	7.604			12.0440
6	DHA	10.524			7.4279
7	NORMET	11.932			10.1748
8	DOPAMI	15.984			18.6613
9	DEOXIE	19.247			8.3387
	TOTAL				100.0000

FIGURA No. 19 CROMATOGRAMA DE LA MEZCLA DE CATECOLAMINAS ENDOGENAS.

III.4.F. TOLERANCIA.

Se probaron cambios en el pH en el buffer de la fase móvil en 0.35 ± 0.01 unidades de pH, esto es, de un pH de 3.35 a 3.00 y 3.70. Así mismo, se cambió el porcentaje de cosolvente en un 50 % de su concentración, de 8 a un 4 y a 12 %. Empleando estas condiciones y una muestra de la curva estándar sin tratar de 100 ng/ml de metildopa, se evaluaron los parámetros de k' , α y R para α -metildopa y DHBA.

Resultados.

a. Cambios de pH

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (No. 10).

pH	$k'_{\alpha\text{-MD}}$	k'_{DHBA}	α	R
3.00	2.5357	4.0262	1.5388	3.550
3.35	3.6107	7.2290	2.002	7.098
3.70	3.0470	10.1768	3.3412	12.269

TABLA No. 10 EFECTO DEL pH SOBRE LA RESOLUCION, FACTORES DE CAPACIDAD Y SELECTIVIDAD

Se observa que al aumentar el pH aumenta la resolución de los compuestos (Gráfica No. 6), y debido a que este cambio es grande para un intervalo pequeño de pH, se debe tener cuidado en calibrar el potenciómetro antes de utilizarlo, para que no se aumente grandemente el tiempo de análisis en el mejor de los casos, o que se pierda resolución de los compuestos (en el peor de los casos).

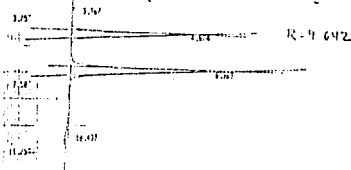
Este cambio en la resolución (Figura No. 20) se debe en gran parte al aumento del factor de capacidad del DHBA más que de la metildopa, el cual se puede decir permanece constante (Gráfica No. 7).

FIGURA No. 20 EFECTO DEL pH SOBRE
LA RESOLUCION DE METILDOPA
Y DIHIDROXIBENCILAMINA.

88

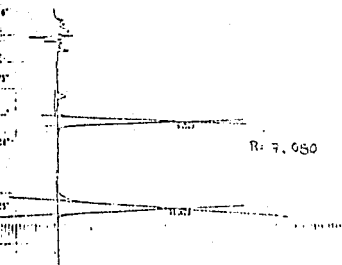
SAMPLE 4

13154 AUG. 23 1959



SAMPLE 5

13147 AUG. 24 1959



METHOD	DF	PH	PK
.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01
NO.	NAME	RT	CONC
1		3.367	0.6757
2		4.374	44.6579
3		6.561	93.8117
4		10.427	0.9916
TOTAL		25.829	100.0000

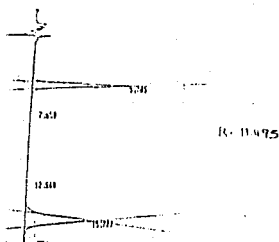
a. pH 3.00

METHOD	DF	PH	PK
.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01
NO.	NAME	RT	CONC
1		6.529	156.236
2		11.621	144.336
TOTAL		3004.25	300.572

b. pH 3.35

SAMPLE 7

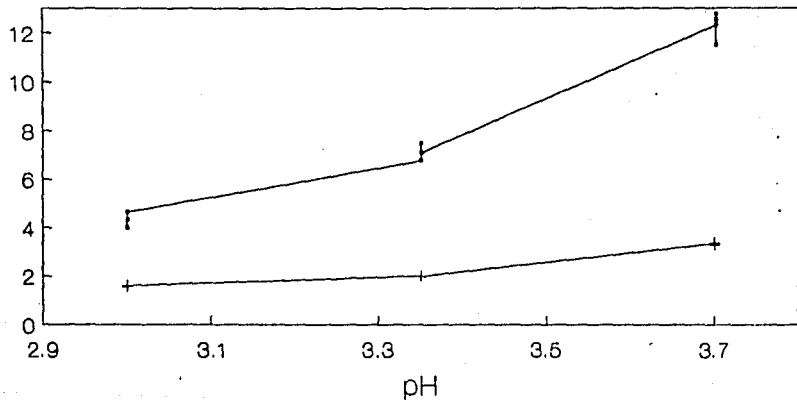
13146 AUG. 23 1959



METHOD	DF	PH	PK
.100000e+02	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01
NO.	NAME	RT	CONC
1		5.205	125.776
2		7.050	1.221
3		12.080	1.544
4		15.277	5.299
TOTAL		213450	100.0000

c. pH 3.70

TOLERANCIA EFECTO DEL pH

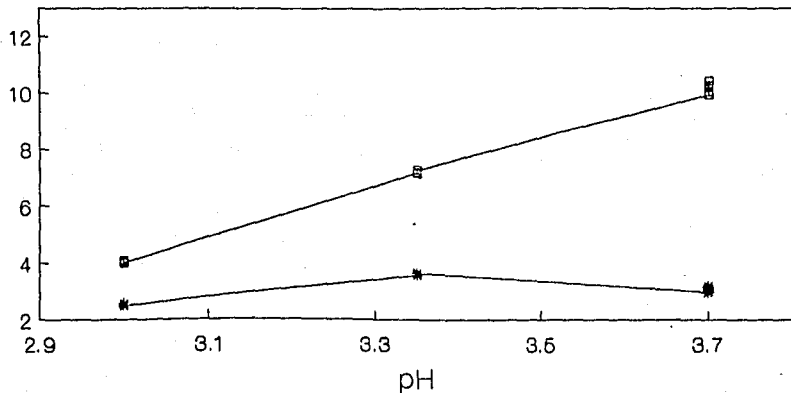


—•— RESOLUCION —+— SELECTIVIDAD

GRAFICA NO. 6

TOLERANCIA

EFFECTO DEL pH



—*— K' METILDOPA —□— K' DHBA

GRAFICA NO. 7

b. Cambios en el porcentaje de cosolvente

Los promedios de los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (No. 11):

% de Metanol	$k'_{\alpha\text{-MD}}$	k'_{DHBA}	α	R
4	5.3912	10.3929	1.9278	7.780
8	3.6134	7.2288	2.0020	7.098
12	2.1169	4.9017	2.3153	7.797

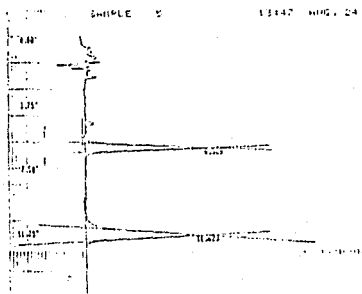
TABLA No. 11 EFECTO DEL % DE COSOLVENTE SOBRE LOS FACTORES DE CAPACIDAD, SELECTIVIDAD Y RESOLUCION DE METILDPA Y DIHIDROXIBENCILAMINA

El cambio en el porcentaje del cosolvente no afecta la resolución entre los compuestos (Gráfica No. 8), sin embargo, sí afecta el tiempo de análisis (Figuras No. 21), ya que al disminuir el porcentaje de metanol, aumenta el factor de capacidad de ambos compuestos (Gráfica No. 9). De esta manera, esto se puede aplicar cuando con las columnas nuevas, en cuyo caso, los compuestos se retengan mayor tiempo al esperado, para lo cual se recomienda aumentar el porcentaje de cosolvente de la fase móvil.

FIGURA No. 21 EFECTO DEL % DE METANOL
SOBRE LA RESOLUCION DE METILDOPA
Y DIHIDROBENCILAMINA.

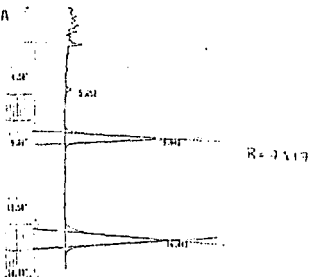
SAMPLE 1

14154 AUG. 30 1968



CHL. METHOD	QU	PI	PH	PL	
	SP	SP	SP	SP	
	.100000e+03	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01	
NO.	NAME	FI	H OR N	DI	CONC
1		9.523	156.290		51.9879
2		11.023	144.236		40.0129
TOTAL			300.526		100.0000

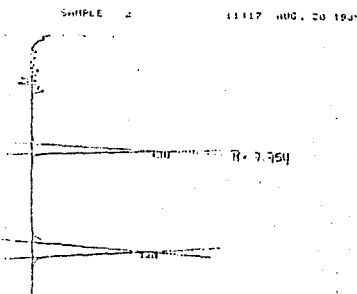
b. 8 % DE METANOL



R = 2.119

CHL. METHOD	QU	PI	PH	PL	
	SP	SP	SP	SP	
	.100000e+03	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01	
NO.	NAME	FI	H OR N	DI	CONC
1		5.152	7001		2.6276
2		8.003	127144		47.0092
3		15.1043	153437		49.4010
TOTAL			25972		100.0000

b. 4% DE METANOL



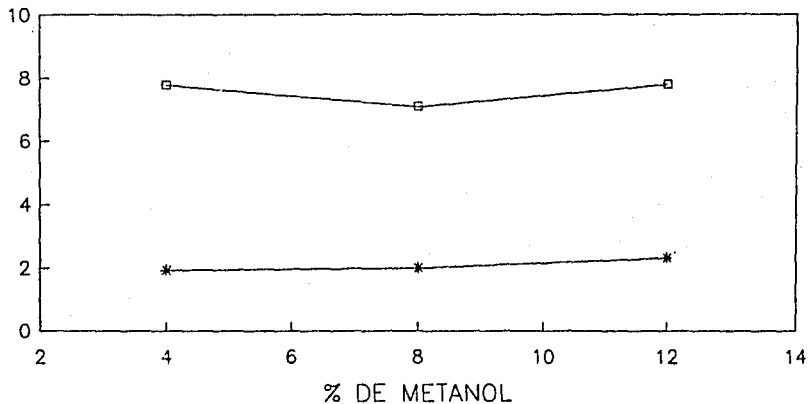
R = 2.954

METHOD	QU	PI	PH	PL
	SP	SP	SP	SP
	.100000e+03	.100000e+01	.100000e+01	.100000e+01
NAME	FI	H OR N	DI	CONC
	4.243	176.234		53.0659
	6.120	147.745		47.1340
TOTAL			303.979	100.0000

c. 12% DE METANOL

TOLERANCIA

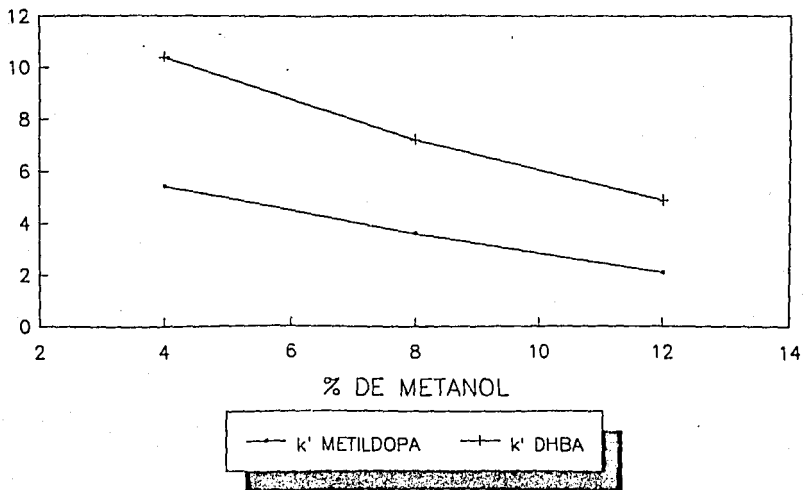
EFFECTO DEL % DE METANOL



—*— SELECTIVIDAD —□— RESOLUCION

TOLERANCIA

EFFECTO DEL % DE METANOL



GRAFICA NO. 9

III.4.G. ESTABILIDAD.

Este experimento consta de dos partes:

a. Estabilidad en Plasma

Para mostrar la estabilidad de la metildopa en plasma, se prepararon las muestras de 500 y 2000 ng/ml de metildopa según la tabla No. 1. Estas muestras se repartieron en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -10°C durante 72 horas y luego a -40°C . Las muestras se analizaron por triplicado al tiempo 0, 1, 3 y 15 días. Para interpolar las alturas relativas y obtener el porcentaje de recobro se emplearon curvas estándar en plasma preparadas cada día del análisis.

Criterio de aceptación.

De acuerdo al criterio de aceptación de CAFET se considera que el método puede variar en un 10 % sobre el 100 % de recobro, por lo que si el valor obtenido de los recobros de las muestras es mayor al $100 \pm 10\%$, se concluye que la desviación existente es debida al método y no a la descomposición de la muestra.

Resultados

Los porcentajes de recobro de las muestras analizadas se observan en la siguiente tabla:

CONCENTRACION	% DE RECOBRO			
	t = 0	t = 1 DIA	t = 3 DIAS	t = 15 DIAS
500 ng/ml	103.98	98.09	97.77	98.16
	106.31	100.24	99.40	98.52
	109.62	101.33	104.08	107.69
2000 ng/ml	106.72	96.74	103.03	99.53
	108.01	97.43	103.06	101.83
	109.15	99.86	106.06	105.59

TABLA No. 12 % DE RECOBRO OBTENIDOS PARA LA CONCENTRACIONES DE 500 Y 2000 ng/ml DE METILDOPA EN PLASMA PARA EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN ESTE FLUIDO

Con la gráfica No. 10, se puede observar que los recobros están dentro de los límites marcados del $\pm 10\%$. Las variaciones observadas se deben al método, y no a una descomposición de las muestras.

Viendo que la muestra es estable a 15 días, se puede confiar en los datos de linealidad, ya que las curvas estándar en plasma empleadas se prepararon al inicio y se emplearon hasta 6 días.

b. Estabilidad en el Disolvente de Elución

De las muestras procesadas por triplicado de las concentraciones de 500 y 2000 ng/ml se inyectaron repetidamente hasta 60 horas. Las alturas relativas se interpolaron en la curva estándar en plasma del primer día.

Resultados

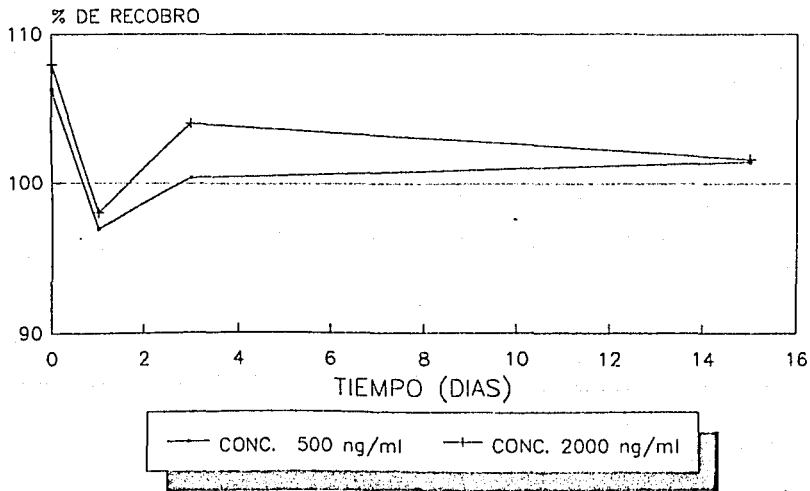
Los porcentajes de recobro de las muestras analizadas se condensan en la siguiente tabla (Tabla No. 13).

CONCENTRACION	% DE REC OBRO			
	t = 0	t = 10 HRS	t = 18 HRS	t = 83 HRS
500 ng/ml	98.17	94.93	93.06	61.80
	98.52	94.05	100.75	76.88
	103.88	100.93	101.23	73.27
2000 ng/ml	101.83	93.37	103.89	79.21
	105.59	101.64	110.78	87.45
	114.76	99.53	110.42	77.31

TABLA No. 13 % DE REC OBRO OBTENIDOS PARA LAS CONCENTRACIONES DE 500 Y 2000 ng/ml DE METILDOPA EN PLASMA EN EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN EL DISOLVENTE DE ELUCION

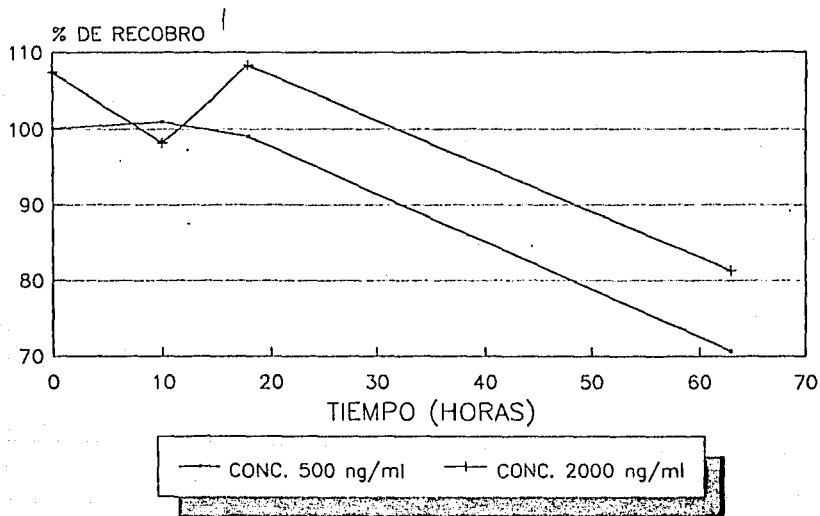
Al graficar estos resultados (Gráfica No.11), se observa que las muestras son estables hasta un plazo de 30 horas aproximadamente, que es cuando los recobros salen del intervalo de $100 \pm 10 \%$.

ESTABILIDAD DE METILDOPA EN PLASMA EN PLASMA



GRAFICA NO. 10

ESTABILIDAD DE METILDOPA EN DISOLVENTE DE ELUCION



GRAFICA NO. 11

III.5. APLICACION DEL METODO

Con el fin de ver la aplicación del método analítico desarrollado, se siguió el siguiente estudio.

III.5.A TOMA DE MUESTRA

A un sujeto sano voluntario en ayunas se le tomó una muestra de sangre de 10 ml y se le administró una tableta de 500 mg de metildopa.

A este voluntario se le tomaron muestras de sangre (6 ml) a diferentes tiempos. Las muestras se colocaron en tubos "vacutainer" heparinizados que contenían 0.125 ml de la solución de EGTA/GSA. Se centrifugaron inmediatamente a 3000 rpm durante 30 minutos. Se separó el plasma a un tubo de ensaye de 13 * 100 mm y se congeló a -10 °C para analizarse al siguiente día.

III.5.B. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

El día del análisis se descogelaron las muestras, se tomó una alícuota de 1 ml de cada tiempo de muestreo y se analizaron de acuerdo a lo establecido en el punto III.3.C.

Las alturas relativas obtenidas de las muestras se interpolaron en una curva estándar en plasma que se le dió el mismo tratamiento.

NOTA: El punto anterior y este se realizaron con dos sujetos empleando formulaciones diferentes, una innovadora (mercado) y una formulación en desarrollo.

III.5.C. RESULTADOS

Los tiempos de muestreo, así como las concentraciones plasmáticas de α -metildopa encontradas se encuentran en la tabla (No. 14).

En los resultados se observan diferencia en las concentraciones plasmáticas para las dos formulaciones. La formulación en desarrollo libera al principio activo más rápidamente dando una concentración plasmática máxima de aproximadamente 2000 ng/ml en un tiempo de 1.5 horas. Sin embargo, la disminución de la concentración de metildopa disminuye más rápido que la formulación innovadora (Gráfica No. 12), cuyo $C_{p_{max}}$ es de aproximadamente 1200 ng/ml que se alcanza en un tiempo de dos horas.

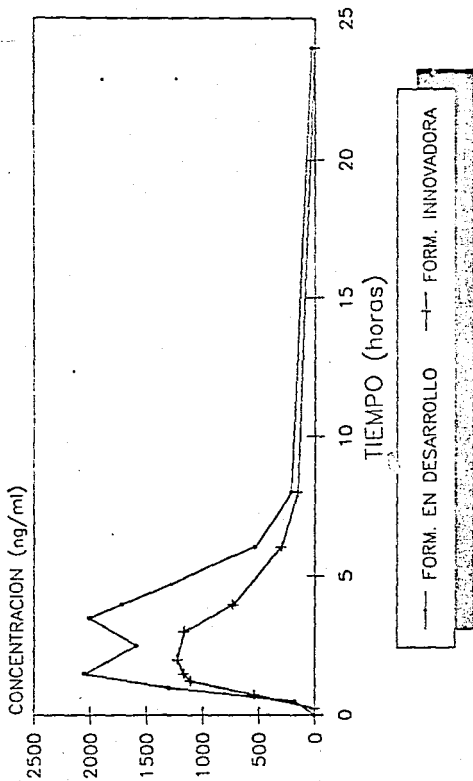
Al comparar los $C_{p_{max}}$ obtenidos con los de la literatura, se observa que las dos formulaciones están dentro de los límites reportados, no siendo así para el tiempo en el que se alcanza dicha concentración.

Respecto al método analítico, no se presentó ningún problema y se pudieron cuantificar los diferentes niveles de concentración plasmática de metildopa. (Fig. No. 22).

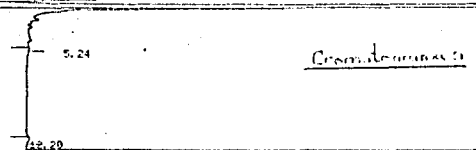
TIEMPO DE MUESTREO (HORAS)	CONCENTRACION PLASMATICA DE METILDOPA (ng/ml)	
	FORM. EN DESARROLLO	FORM. INNOVADORA
0	0	0
0.25		6.1
0.5	182.3	
0.75		538.9
1.0	1301.2	
1.25		1108.9
1.5	2053.9	1168.0
2.0		1222.2
2.5	1500.2	
3.0		1163.2
3.5	2009.5	
4.0	1725.1	732.9
6.0	530.2	295.6
8.0	213.4	154.3
24.0	33.7	6.8

TABLA No. 14 CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE METILDOPA DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE UNA TABLETA CON DOSIS DE 500 mg

PERFIL DE BIODISPONIBILIDAD DE ALFA METILDOPA



GRAFICA NO. 12



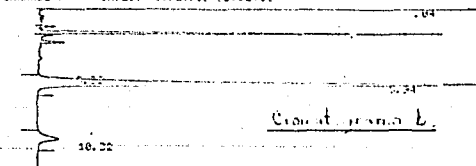
Cromatograma a

INPUT OVERRANGE AT RT= 2.17

NETILDOPA 07/27/89 00115400 CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN 42	INDEX 42
PEAK#	HT%	RT	PK RT EC
1	24.096	0.04	1507 01
2	17.194	5.24	1479 01
3	45.709	10.2	2241 01
TOTAL	100.		5427

CHANNEL A INJECT 07/27/89 01102158



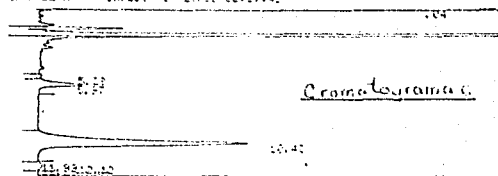
Cromatograma b

NETILDOPA 07/27/89 01102158 CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN 45	INDEX 45
PEAK#	HT%	RT	PK RT EC
1	0.157	0.04	851 01
2	0.285	5.24	1749 02
3	95.291	5.24	14129 03
4	4.265	10.22	22101 01
TOTAL	100.		54192

1.5 horas

CHANNEL A INJECT 07/27/89 01107149



Cromatograma c

INPUT OVERRANGE AT RT= 1.15

NETILDOPA 07/27/89 01107149 CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN 51	INDEX 51
PEAK#	HT%	RT	PK RT EC
1	0.119	0.04	147 01
2	1.25	5.24	1701 02
3	10.008	5.24	49108 03
4	79.191	10.42	22120 01
5	0.493	11.95	1419 04
6	1.107	12.12	17130 02
7	1.565	12.46	19146 04
8	0.277	12.53	706 03
TOTAL	100.		54062

24 horas

FIG. No. 22 CROMATOGRAFÍAS DE NETILDOPA DE LAS MUESTRAS EN PLASMA DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE UNA TABLETA DE 500 mg. SE MUESTRA EL TIEMPO INICIAL (a) EL MAX (b) Y A LAS 24 HORAS (c)

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S F I N A L E S

IV.1 METODO ANALITICO

IV.2 RECOMENDACIONES

IV RESULTADOS FINALES

IV.1. METODO ANALITICO

IV.1.A. REACTIVOS

Alfa-metildopa	Dihidroxibencilamina
Acetato de sodio	Acido cítrico
Octanosulfonato de sodio	EDTA disódico
EGTA	Glutación en forma reducida
Trizma base	Alúmina
Acido acético glacial	Metanol grado HPLC
Acetonitrilo grado HPLC	Plasma
Agua grado HPLC	

IV.1.B. EQUIPO Y MATERIALES

Son los mismos mencionados en el punto II.2.

IV.1.C. PROCEDIMIENTO

Mientras se permite que las muestras estén listas para analizarse (esto es debido a que se mantienen en congelación se deben dejar a que alcancen la temperatura ambiente), se preparará una curva estándar en plasma tal como se describe en el punto III.3.B. ii. Se toma una alícuota de 1 ml de plasma de cada una de las muestras problema así como de la curva estándar.

ü. Precipitación de Proteínas Plasmáticas.

Esta alícuota se coloca en un tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, adicionar 1.0 ml de la solución del estándar interno (dihidroxibencilamina, DHBA) de concentración de 120 ng/ml en acetonitrilo. Agitar en vórtex durante 1 minuto y centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm.

ii. Adsorción.

Transferir el sobrenadante de cada tubo a otro de 13 x 100 mm de fondo cónico con tapón de rosca que contenga 100 mg de alúmina y 0.5 ml de la solución de adsorción. Tapar herméticamente y agitar en vórtex durante 15 minutos. Verificar que la agitación sea homogénea. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm. Aspirar el sobrenadante y desecharlo.

iii. Lavado.

Adicionar a cada tubo 1 ml de la solución de lavado. Agitar en vórtex por 1 minuto. Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm. Aspirar el sobrenadante y desecharlo. Este lavado se debe hacer por un total de tres veces.

iv. Elución.

A cada tubo se le adiciona 0.5 ml de la solución reguladora A. Agitar en vórtex durante 5 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm.

El sobrenadante se inyecta al sistema cromatográfico, el cual ha sido acondicionado con la fase móvil a un flujo de 1.6 ml/min, el electrodo de trabajo (electrodo de carbón vidriado) colocado a un potencial de +750 mV y el precalentador de la fase móvil a 50 °C.

v. Obtención de resultados.

Se obtienen las alturas relativas de las muestras inyectadas al dividir la altura correspondiente a α -metildopa entre la altura del estándar interno.

Las alturas relativas de la curva estándar en plasma se grafican en función de la concentración. En esta gráfica se interpolan las alturas relativas de las muestras y de esta manera se obtienen las concentraciones de las muestras problema.

IV.2. RECOMENDACIONES

Como todo método analítico, se tiene una serie de consideraciones para evitar problemas al hacer el análisis. Además, dado que se ha reportado en la literatura la inestabilidad de α -metildopa, es importante seguir las siguientes recomendaciones.

Toma de las Muestras

- Tomar las muestras de sangre en tubos heparinizados a los que se les añadió 0.125 ml de la solución de EGTA/GSA por cada 10 ml de sangre.
- Centrifugar inmediatamente las muestras.
- Muestrear dentro de un intervalo de tiempo de 16 a 20 horas para obtener un perfil de biodisponibilidad confiable.

Antes de Iniciar el Análisis de las Muestras

- Secar la alúmina a 400 °C durante 4 horas para activarla.
- Acondicionar el sistema cromatográfico por un mínimo de 24 horas previo al análisis.
- En esta preparación del equipo pulir la superficie del electrodo de trabajo y realizarlo después de un máximo de 70 a 100 inyecciones.
- Preparar las curvas estándar en plasma un día antes, repartirlas en alícuotas de 1 ml en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y congelarlas a -10 °C.

Para realizar el Análisis

- Durante las etapas de adsorción y elución de las catecolaminas, verificar que la agitación se realice de manera homogénea.
- Una vez que las muestras se tengan en los viales, no tardar un lapso mayor a 24 horas para inyectarlas al sistema cromatográfico para obtener resultados confiables.

C A P I T U L O V

C O N C L U S I O N E S

V CONCLUSIONES

Por medio de la presente tesis se desarrolló un método para la cuantificación de α -metildopa en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución empleando detección electroquímica a +750 mV con una escala completa de 10 nA.

El método se basa en la adsorción selectiva de las catecolaminas en alúmina a un pH básico y su elución a un pH ácido empleando un buffer de acetatos-citratos. Con el tratamiento que se le da a la muestra, un triple lavado de la alúmina, se logra la limpieza total de la muestra, eliminando así componentes del plasma que pudieran llegar a interferir además de mantener una vida media de la columna mayor en comparación de otros métodos reportados en la literatura, en los cuales solamente realizan una precipitación de proteínas plasmáticas.

Para la cromatografía de las muestras se emplea una columna de fase inversa C-18 y una fase móvil que contiene octanosulfonato de sodio, el cual actúa como contraión formando el par iónico con el ión de la metildopa.

Dado que factores como el pH afectan marcadamente a este tipo de cromatografía, es necesario controlar dicho parámetro en la preparación de la fase móvil, ya que una disminución de éste puede provocar la falta de resolución entre el compuesto y el estándar interno empleado (Dihidroxibencilamina).

El método cumple en el intervalo de concentraciones estudiado con los criterios establecidos de linealidad, precisión y exactitud para la metodología de análisis de fármacos en fluidos biológicos. Además, es reproducible, específico y sobretodo sensible, ventaja que tiene sobre otros métodos cromatográficos en los que se emplea detección ultravioleta.

Estas características permiten que el método pueda emplearse en la cuantificación de metildopa en plasma, lo que servirá para realizar estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad. Esto será de gran importancia para determinar parámetros farmacocinéticos en pacientes a los que se les haya administrado este fármaco; y así, determinar la equivalencia terapéutica entre presentaciones que se encuentren en el mercado llevando de esta manera a la obtención de medicamentos seguros y eficaces.

C A P I T U L O V I

B I B L I O G R A F I A

VI BIBLIOGRAFIA

1. Rudd, P., and Blaschke, T.F., "Agentes Antihipertensivos y Farmacoterapia de la Hipertensión". Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman y Gilman (Editores). 7a. Edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. México, 1986. pp. 751 - 752.
2. Clark's Isolation and Identification of Drugs. 2nd. Edition. The Pharmaceutical Press. London, England, 1983. pp. 5928 - 5929.
3. The Merck Index. Martha Windholz (Editor). 10th Edition. Merck and Co., Inc. N.J., U.S.A., 1983. pp. 5928 - 5929.
4. Mills III, T., et al. Instrumental Data for Drug Analysis. Vol. 2. 2nd. Edition. Elsevier. New York, U.S.A., 1987. pp. 1452 - 1453.
5. Kochack, G.M., and Mason, W.D., "Determination of Free Methyldopa in Plasma by High-Pressure Liquid Chromatography and Electrochemical Detection". Journal of Pharmaceutical Sciences, 69 (1980) 897-900.
6. Bowman, W.C. y Rand, M.J. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. 2a. Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, 1984. pp. 23.39 - 23.40.
7. Myhre, E., Rugstad, H.E., and Hansen, T., "Clinical Pharmacokinetics of Methyldopa". Clinical Pharmacokinetics, 7 (1982) 221 - 233.
8. Kim, B.K., and Koda, R.T., "Fluorimetric Determination of Methyldopa in Biological Fluids". Journal of Pharmaceutical Sciences, 66 (1977) 1632 - 1633.

9. Munion, G.L., Seaton, J.F., Harrison, T.S., "HPLC for Urinary Catecholamines and Metanephrines with Alpha-Methylidopa", Journal of Surgery Response, 35 (1983) 507 - 514.
10. Walson, P.D., et al., "Metabolic Disposition and Cardiovascular Effects of Methylidopate in Unanesthetized Rhesus Monkeys". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 195 (1975) 151 - 158.
11. Ong, H., Sved, S., and Beaudoin, N., "Assay and Stability of α -Methylidopa in Man Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection". Journal of Chromatography, 229 (1982) 433-438.
12. Dilger, C., Salama, Z., and Jaeger H., "Determination of Methylidopa in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection". Drug Response, 37 (1987) 1399-1401.
13. Kochack, G.M., and Mason, W.D., "A Simplified Method of Determination of Free Methylidopa in Urine". Analytical Letters, 14 (1981) 439-449.
14. Hoskins, J.A., and Holliday, S.B. "Determination of α -Methylidopa and Methylidopate in Human Breast Milk and Plasma by Ion-Exchange Chromatography Using Electrochemical Detection", Journal of Chromatography, 230 (1982) 162 - 167.
15. Jenner, D.A., Brown, .M.J., and Lhoste, F.J.M. "Determination of α -Methylidopa, α -Methylnoradrenaline, Noradrenaline and Adrenaline in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection". Journal of Chromatography, 224 (1981) 507-512.
16. Snyder, L.R., and Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd. Edition. John, Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A., 1979.

17. McNair, H.M., y Esquivel, B. Cromatografía Líquida de Alta Presión. 2a. Edición. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. E.U.A., 1973.
18. Wong, S.H.Y. "Liquid Chromatography and Other Methodologies for Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology", in Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology by Liquid Chromatography. Wong, S.H.Y. (Editor). Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., 1985. pp. 39 - 78.
19. Alfredso, T., and Sheehan, T. "Recent Developments in Multichannel, Photodiode-Array, Optical LC Detection". Journal of Chromatography Science, 24 (1986) 473 - 482.
20. Lavrich, C., and Kissinger, P.T., "Liquid Chromatography Electrochemistry: Potential Utility for Therapeutic Drug Monitoring" in Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology by Liquid Chromatography. Wong S.H.Y. (Editor) Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A., 1985. pp. 191 - 202.
21. Kissinger, P.T. "Electrochemical Detector" in Liquid Chromatography Detectors. Vickres, T.H. (Editor). Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A., 1983. pp. 125 - 164.
22. Kissinger, P.T. "Biomedical Applications of Liquid Chromatography-Electrochemistry". Journal of Chromatography, 448 (1989) 31 - 52.
23. Adams, R.F. "Ion-Pair Chromatography of Pharmaceuticals" in Ion-Pair Chromatography. Hearn, M.T.W. (Editor). Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A., 1985. pp. 141 - 179.
24. Inman, E.L., et al., "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples". Journal of Chromatography Sciences, 25 (1987) 252 - 256.