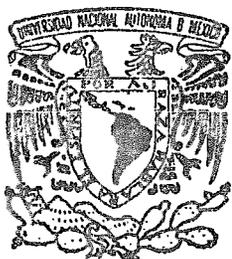


M.C.
D. P. ...
SIC

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“DESARROLLO DE METODOLOGIA
ANALITICA PARA LA DETERMINACION
DE HIPOGLUCEMIANTES DEL TIPO DE
LAS SULFONILUREAS EN
FORMULACIONES ORALES Y EN
PLASMA HUMANO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
GLORIA SAAB RINCON

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

J U R A D O :

PRESIDENTE	Prof. Alfredo Garzón.
V O C A L	Prof. Alejandro Alcántara.
SECRETARIO	Prof. Luz Elena Vera.
1 ^{er} SUPLENTE	Prof. Helgi Jung Cook.
2 ^{do} SUPLENTE	Prof. Francisco Rojo.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Estudios de Biodisponibilidad.
Jefatura de Control de Calidad, I.M.S.S.

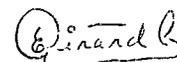
Y

Departamento de Química Analítica.
División de Estudios de Posgrado.
Facultad de Química, U.N.A.M.

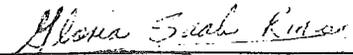
Asesor del tema


M. en C. ~~Santiago~~ Capella V.

Supervisor técnico


Q.F.B. Ma. ~~Elena~~ Girard C.

Sustentante


Q.F.B. Gloria ~~Saab~~ Rincón.

A ti, Carlos.

A mis padres:

Sra. Margarita Rincón de Saab

Sr. Eduardo Saab Saab

Por el apoyo que me han brindado.

Con cariño para mis
hermanos, Alicia y
Antonio.

A mis familiares
y amigos.

AGRADECIMIENTO :

 Mi más sincero reconocimiento al M. en C. Santiago Capella Vizcaíno por su asistencia, cooperación e inapreciable ayuda para la realización de este trabajo.

 Agradezco también a la Q.F.B. Ma. Elena Girard Cuesy, al Depto. de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M. y al Depto. de Estudios de Biodisponibilidad de la Jefatura de Control de Calidad, I.M.S.S.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO BAJO UN CONVENIO
ENTRE LA FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Y

LA JEFATURA DE CONTROL DE CALIDAD DEL I.M.S.S.

RESUMEN

Los métodos usuales para valoración de sulfonilureas en formulaciones orales y en plasma humano, requieren de una laboriosa preparación de la muestra y por lo general, son inespecíficos. Sólo hasta la publicación de la USP XXI y para tolbutamida se propone un método que utiliza la cromatografía líquida moderna (HPLC) para su análisis en formulaciones orales. En cuanto a la preparación de muestras de plasma para análisis, existe un gran número de publicaciones que involucran diversos tipos de extracciones. En el presente trabajo se presenta el desarrollo de metodología para valoración de cloropropamida, tolbutamida y glibenclamida en tabletas y en plasma humano*, basada en extracciones sencillas (con el uso de columnas para cromatografía extractiva) y análisis por HPLC. Se discuten los efectos de diversas variables de operación y se demuestra que los métodos propuestos son exactos (95.4 - 100.4 %), precisos (0.35 - 0.87 % en tabletas y 3 % en concentraciones normales en plasma), específicos y de gran entereza.

* a excepción de glibenclamida.

ABSTRACT

The usual methods for valuation of sulphonylureas in oral formulations and the human plasm, require of laborious preparation of the samples and generally are inespecific. Only until the paper of the USP XXI for determination of tolbutamide it proposed a method that use high-performance liquid chromatography (HPLC) for analysis of oral formulations. About to preparation of plasm samples for analysis there are an extendide number of paper that involve different types of extraction. This present work it shows the development of the methodology for chlorpropamide, tolbutamide and glybenclamide analysis yn tablets and human plasm*, on base in simple extractions (with use of sample clean-up cartridges) and analysis by HPLC. It discuss several operation variables effect and shows that the propound methods are accurate (95.4 - 100.4 %), precise (0.35 - 0.87 % in tablets and 3 % in normal concentration in plasm), specific and of great completeness.

* exception glybenclamide.

INDICE

	Página	
I	Introducción	1
	1.1 Antecedentes	1
	1.2 Objetivos	7
II	Generalidades	8
	Efecto de α sobre la resolución	13
	Efecto de k' sobre la resolución	17
	Efecto de N sobre la resolución	18
	Cromatografía de Fase Químicamente Unida	19
III	Parte Experimental	35
	3.1 Reactivos, Estándares y Material	35
	3.2 Aparatos y Condiciones	36
	3.3 Desarrollo de Metodología	37
	3.3.1 Desarrollo de metodología para formulaciones orales	37
	3.3.2 Desarrollo de metodología analítica para la determinación de los fárma- cos en plasma.	40
IV	Resultados y Discusión	51
	4.1 Resultados de formulaciones orales	51
	4.2 Resultados en plasma	74
	I Preparación de Muestras	74
	II Métodos	76
	A. Cloropropamida	76
	B. Tolbutamida	87
	C. Glibenclamida	96
V	Conclusiones	98
	Apéndice I	101
	Apéndice II	104
	Apéndice III	108
	Apéndice IV	110

	Página
Apéndice V	114
VI Bibliografía	116

I. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

Los fármacos orales hipoglucemiantes del tipo de las sulfonilureas han estado en uso clínico por 20 años aproximadamente en el tratamiento de la diabetes mellitus de carácter maduro¹. La primera generación de sulfonilureas comprende a la tolbutamida, cloropropamida y acetohexamida las que por ser fármacos menos potentes han sido reemplazadas por las sulfonilureas de la segunda generación tales como la glibenclamida, glicazida y glipizida que ofrecen un marcado aumento en su poder hipoglucemiante sin que por esto haya un incremento en la toxicidad².

Debido a que estos compuestos se administran por largos períodos de tiempo a pacientes comprendidos entre la edad media y madura en los que llegan a ocurrir cambios fisiológicos progresivos que puedan provocar alteraciones en la disposición del fármaco o en su respuesta intrínseca (pudiendo así, inducir una hipoglucemia fatal), es necesario medir ocasionalmente el nivel de estos fármacos en plasma³. Con este fin y con el de llevar a cabo estudios de biodisponibilidad, farmacocinética y control de calidad, se han desarrollado un gran número de métodos, entre los que se encuentran los espectrofotométricos y los cromatográficos (CG y CLAR).

Los métodos colorimétricos se basan⁴ en la hidrólisis del fármaco, extracción de la amina liberada y su análisis por el uso de dinitrofluorobenceno y ninhidrina o por la reacción de Bratton y Marshall. También existen métodos ba-

sados en la absorción directa al ultravioleta (UV) y de hecho, son los métodos sugeridos por las normas oficiales y por la USP XX. Pero estos métodos a pesar de ser poco laboriosos tienen la desventaja de ser inespecíficos y poco sensibles³.

Los métodos de cromatografía de gases tienen la ventaja de ser más sensibles, más específicos y de tener límites de detección más bajos⁴, pero a su vez tiene la desventaja de ser muy laboriosos, ya que como estos compuestos son termolábiles, existe la necesidad de metilarlos para formar derivados con buenas propiedades cromatográficas y con mayor estabilidad térmica³. La metilación se hace generalmente con dimetilsulfato^{4,5}, con diazometano^{4,5} o con yoduro de metilo¹. Estas reacciones son difíciles de controlar, obteniéndose en algunos casos más de un derivado, y por lo tanto los métodos son poco reproducibles.

Los métodos de cromatografía de líquidos en general involucran un número mínimo de operaciones sobre un volumen pequeño de muestra, se obtienen resultados muy precisos, tienen bajos límites de detección y son específicos^{3,4}. En la USP XXI ya se propone un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para el análisis de tolbutamida.

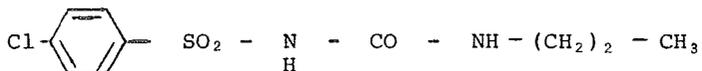
Las características generales de estos compuestos son las siguientes:

Cloropropamida o 1 - (p-clorofeni) sulfonyl -3- propilurea

Fórmula mínima: $C_{16} H_{13} Cl N_2 O_3 S$

P.M. 276.40 g/mol

Fórmula desarrollada:



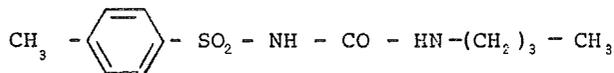
Tolbutamida o 1 - butil - 3 (p - tolil sulfonil) urea.

Fórmula mínima: C₁₂ H₁₈ N₂ O₃ S

P.M.: 270.35 g/mol

pKa: 5.4

Fórmula desarrollada:



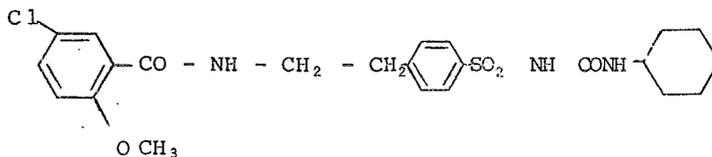
Glibenclamida o 1 - (p-(2-(5-cloro-0-anisamido-etil) fenil) sulfonil)- 3 - ciclohexilurea.

Fórmula mínima: C₂₂ H₂₈ O₅ N₃ S

P.M.: 493.99 g/mol

pKa: 6.15

Fórmula desarrollada



En cuanto a la preparación de las muestras, a continuación se describen algunas de las características más importantes de los métodos citados en la literatura.

A). Determinación de sulfonilureas en formulaciones orales por CLAR.

El método para formulaciones orales¹⁶ consiste en la disolución de tabletas pulverizadas con un disolvente (generalmente metanol o etanol), su centrifugación y la posterior inyección del sobrenadante en el cromatógrafo.

En general, por cromatografía de líquidos se obtienen recobros superiores al 99% del fármaco en placebo.

B). Determinación de sulfonilureas en plasma por CLAR

Los diferentes métodos citados^(2,3,4,7,8,9,10,11) para la determinación de sulfonilureas en plasma, se basan en la extracción del fármaco con diferentes disolventes y a diferentes valores de pH.

Las sulfonilureas son ácidos débiles con pKa alrededor de 6, por lo que para su extracción conviene trabajar a pH menor a 6⁷, aunque Kimura y colaboradores⁸, citan que trabajando hasta un pH de 7.0, se obtienen resultados adecuados en la extracción de la gliclazida y se logran eliminar muchas interferencias presentes en el suero.

Es importante mencionar que, aunque en algunos métodos sólo se lleva a cabo un paso de extracción, en otros es necesario un mayor número de extracciones, lo cual hace al método poco practicable para análisis de rutina.

Con el fin de evadir el paso de extracción, existen comercialmente columnas para cromatografía extractiva empacadas con diferentes soportes como sílice, octadecil-silano, alúmina o florisil, las que permiten una adsorción específica de los fármacos de acuerdo a sus propiedades físico-químicas, logrando así su purificación y rápida separación de los fluidos biológicos. En cuanto a la evaluación de costos, a pesar de que estas columnas pudieran parecer un poco caras, tomando en cuenta que cuando se usa un método de extracción se requieren disolventes de muy alta pureza que por lo mismo son muy caros, aunado al largo tiempo que se requiere para el análisis y al personal especializado para llevar a cabo extracciones sobre volúmenes pequeños de muestra, resulta más conveniente el uso de estas columnas para cromatografía extractiva.

El presente trabajo pretende ser una contribución en el desarrollo de métodos analíticos de rutina para la determinación de sulfonilureas en formulaciones orales y en plasma humano, con miras a su implementación en la Jefatura de Control de Calidad del IMSS para estudios de biodisponibilidad, en los que se pretende establecer una comparación de bioequivalencia de genéricos provenientes de diferentes fabricantes.

Por encontrarse incluidos en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, la cloropropamida, la tolbutamida y la glibenclamida, fueron los fármacos del tipo de las sulfonilureas sujetos a estudio en el presente trabajo, habiéndose seleccionado para su análisis la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) debido a las ventajas que este método presenta sobre otros.

Se trabajó con dos tipos de problemas diferentes e independientes. El primero consistió en el montaje y optimización de las condiciones para la determinación de sulfonilureas en formulaciones orales y el segundo, en el montaje de un método para la determinación de sulfonilureas en plasma, incluyendo la optimización de las condiciones para el uso de columnas de cromatografía extractiva con el fin de contar con un método que requiera poca manipulación, que fuera fácil, rápido y adecuado para estudios de biodisponibilidad.

1.2 OBJETIVOS

- Desarrollar y evaluar un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de sulfonilureas en formulaciones orales.
- Desarrollar y evaluar un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de sulfonilureas en plasma humano.

II. GENERALIDADES

La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la distribución diferencial de una mezcla entre dos fases. Su gran importancia se debe a su velocidad, a su poder de resolución y a su habilidad para trabajar con pequeñas cantidades de muestra.

Todos los sistemas cromatográficos constan de una fase móvil en contacto íntimo con una fase estacionaria. La fase estacionaria comprende parte o el total de la porción que no está en movimiento en el sistema cromatográfico o lecho. Los componentes de la muestra sufren un equilibrio de distribución entre estas dos fases y este equilibrio determina la velocidad con la que los componentes migran a través del sistema. También ocurre un ensanchamiento de las bandas o dispersión de cada componente en la dirección de migración. Estos dos factores determinan el grado de separación de los componentes de una muestra.

Existen diferentes clasificaciones de los métodos cromatográficos. Una de ellas, es la que se basa en el tipo de fase móvil utilizada y de acuerdo a esto, se tienen dos tipos generales de cromatografía: la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos. En la primera se utilizan gases como fase móvil y en la segunda se utilizan líquidos.

Comparada con los métodos cromatográficos previos, la cromatografía de gases (CG) se caracteriza por ser mucho más rápida y eficiente. Además desde hace tiempo se dispone de equipo automatizado que permite una operación más eficiente. Sin embargo, muchas sustancias no se pueden tratar por cromatografía de gases, ya sea porque no son lo suficientemente volátiles y no pueden ser transportadas por el gas acarreador o

porque son térmicamente inestables y se descomponen bajo las condiciones de separación. Se ha estimado que sólo un 20% de los compuestos orgánicos conocidos se pueden analizar satisfactoriamente por CG sin una manipulación química previa de la muestra.

Por otro lado, la cromatografía de líquidos (CL) no está limitada por la volatilidad de la muestra ni por su estabilidad térmica, por lo que resulta idónea para la separación de macromoléculas y especies de interés biomédico, productos de naturaleza lábil y una amplia variedad de otros compuestos de alto peso molecular y/o menos estables entre los que se encuentran: proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, pigmentos de plantas, lípidos polares, algunos fármacos, esteroides, vitaminas, antioxidantes, etc.

La cromatografía de líquidos (CL) tiene además otra ventaja comparada con la de gases. Algunas separaciones que son difíciles de llevar a cabo por CG. Con frecuencia son más fáciles por CL debido a que en ésta existe interacción selectiva de dos fases cromatográficas con las moléculas de la muestra, mientras que en CG, sólo una.

En lo sucesivo sólo se tratará lo concerniente a la cromatografía de líquidos ya que fue el método de elección debido a las propiedades que presentan los compuestos estudiados (poca estabilidad térmica, buena absorción al UV, etc.).

La cromatografía de líquidos puede clasificarse en dos grupos de acuerdo a la fase estacionaria que se utilice. Si se utiliza una fase estacionaria sólida, se habla de cromatografía líquido-sólido o cromatografía de adsorción o de exclusión, dependiendo del mecanismo de retención. Si se utiliza una fase estacionaria líquida se habla de cromatografía líquida-líquida o de partición.

La cromatografía líquida-líquida (CLL) se lleva a cabo esencialmente en la misma forma que la cromatografía gas-líquido (CGL) excepto que la fase móvil o acarreador es un líquido en lugar de un gas. La otra fase líquida (fase estacionaria), está dispersa sobre el soporte inerte finamente dividido. La fase líquida estacionaria es inmisible con la fase móvil o está químicamente enlazada al soporte. El proceso de CLL es similar a la extracción entre dos líquidos inmiscibles en un embudo de separación. Una serie sucesiva de extracciones forma la base de la distribución de Craig, la cual es más eficiente que la extracción simple. Sin embargo, la CLL es muchas veces más rápida y más simple que el proceso de extracción de Craig. Esto se debe a la gran interfase entre las fases móvil y estacionaria, con lo que se logra un equilibrio de distribución muy rápido entre las dos fases. Como en la extracción o distribución de Craig, la separación de una muestra resulta de la diferente distribución de los diversos solutos entre las dos fases líquidas. Debido a las bases comunes entre la extracción con disolventes y la CLL, los datos de extracción se pueden utilizar para predecir parámetros de utilidad en CLL tales como el factor de capacidad, k' .

En seguida se definen algunos parámetros de importancia en cromatografía:

El coeficiente de distribución, K , el cual define la distribución de un compuesto dado entre dos fases:

$$K = \frac{A_e}{A_m} \quad (1)$$

donde A_e es la concentración de A en la fase estacionaria y

A_m es la concentración de A en la fase móvil.

La separación en un sistema de distribución depende finalmente de la cantidad absoluta de soluto en cada fase más que de sus concentraciones relativas, por lo que es importante definir otro parámetro que es el factor de capacidad, k' .

$$k' = \frac{W_e}{W_m} = \frac{|A|_e V_e}{|A|_m V_m} = K \frac{V_e}{V_m} \quad (2)$$

donde:

V_e = volumen de fase estacionaria

V_m = volumen de fase móvil o volumen muerto, V_o .

W_e = cantidad total de soluto en la fase estacionaria

W_m = cantidad total de soluto en la fase móvil.

Una separación que involucra dos o más solutos sólo se puede llevar a cabo cuando sus valores de K son diferentes, es decir, que estos compuestos deben ser termodinámicamente diferentes. Para esto se define otro parámetro de utilidad, que es el factor de separación o de selectividad, α .

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{k'_A}{k'_B} \quad (3)$$

donde:

α se define de manera que siempre sea mayor o igual a 1.

Mientras más diferente sea de 1 el factor α , mayor será la separación que se pueda llevar a cabo de los dos componentes.

Otro término de importancia en cromatografía es el número de platos teóricos de una columna, N , el cual está relacionado con su eficiencia y se determina mediante la siguiente ecuación para un compuesto dado y bajo condiciones cromatográficas dadas:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (4)$$

donde:

t_r = tiempo de retención del compuesto.

w = ancho en la base del pico

La cromatografía líquido-líquido puede ser aplicada a una amplia variedad de muestras tanto polares como no polares. La base de esta gran versatilidad es la gran variedad de fases de partición que se encuentran disponibles. A pesar de que no hay un sistema de partición universal para todos los solutos, se puede tener una capacidad casi infinita de separación si se selecciona un par apropiado de líquidos de partición.

Una vez que se ha seleccionado el método y la columna que se van a emplear, es necesario seleccionar las condiciones experimentales iniciales. El variar sistemáticamente la composición de la fase móvil permite optimizar los valores de k' y la selectividad del sistema. En cromatografía de líquidos convencional (fase estacionaria más polar). La fuerza del acarreador incrementa con el aumento de la polaridad (ρ) del disolvente. Así, al incrementar el valor de ρ del disolvente se incrementa su poder eluyente.

Después de que se ha hecho una separación inicial se debe evaluar el cromatograma obtenido en términos cuantitativos, lo cual significa que se deben estimar los parámetros de k', α y la

resolución (Rs) entre dos o más bandas adyacentes. Esto se puede lograr comparando con series estándares de resolución en función de la relación de concentraciones o bien, midiendo algunas de las propiedades de los picos mediante la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{\frac{w_1}{2} + \frac{w_2}{2}} \quad (5)$$

donde:

tr_2 = tiempo de retención del segundo pico

tr_1 = tiempo de retención del primer pico.

w = ancho del pico en la base de cada pico.

La resolución es una medida de la separación entre dos picos, por lo que se ve afectada tanto por el ensanchamiento de los mismos como por sus tiempos de retención. La siguiente ecuación es la clave para controlar la resolución en CL:

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{N} \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \quad (6)$$

(i) (ii) (iii)

Los términos i, ii e iii de la ecuación 6 pueden variarse para mejorar la resolución.

Efecto de α sobre la resolución.- Al aumentar el factor de separación, uno de los picos se desplaza con respecto al otro y se aumenta así, R_s . Si se hace un cambio moderado en α no se ven afectados ni el tiempo de separación ni la altura de los picos.

El incremento en α es una técnica muy importante para mejorar la resolución ya que R_s puede aumentarse al mismo tiempo que se disminuye el tiempo de separación. Existen varias alternativas para lograr una modificación en α :

- Cambio del disolvente de la fase móvil.
- Cambio de la fase estacionaria.
- Cambio del pH de la fase móvil.
- Efectos químicos especiales
- Cambio de la temperatura

En seguida se discuten los aspectos generales de éstas.

1) Cambio del disolvente de la fase móvil

La selección adecuada de un disolvente puede facilitarse mucho si se toman en cuenta los diferentes tipos de interacción que pueden existir entre el disolvente y los solutos. Entre estas interacciones se encuentran las de dispersión, de dipolo-dipolo, de ácido-base, etc., las cuales quedan definidas en el parámetro de solubilidad de Hildebrand, ϵ . Sin embargo, existe otro parámetro llamado "polaridad" de Rohrschneider basado en solubilidades experimentales que de una manera más simple y basándose sólo en tres tipos de interacciones (donadores de hidrógeno, aceptores de hidrógeno y dipolo-dipolo) clasifica a los disolventes, dándoles un valor para cada uno de estos tipos de interacciones y graficándolo en una escala triangular de manera que se forman zonas en las que se agrupan disolventes de selectividad similar (ver fig. No. 1). Así por ejemplo, el grupo I incluye aceptores puros como éteres y aminas. El grupo II incluye aceptores-donadores, tales como los alcoholes. El grupo VIII incluye dondadores puros, tales como el cloroformo, etc.

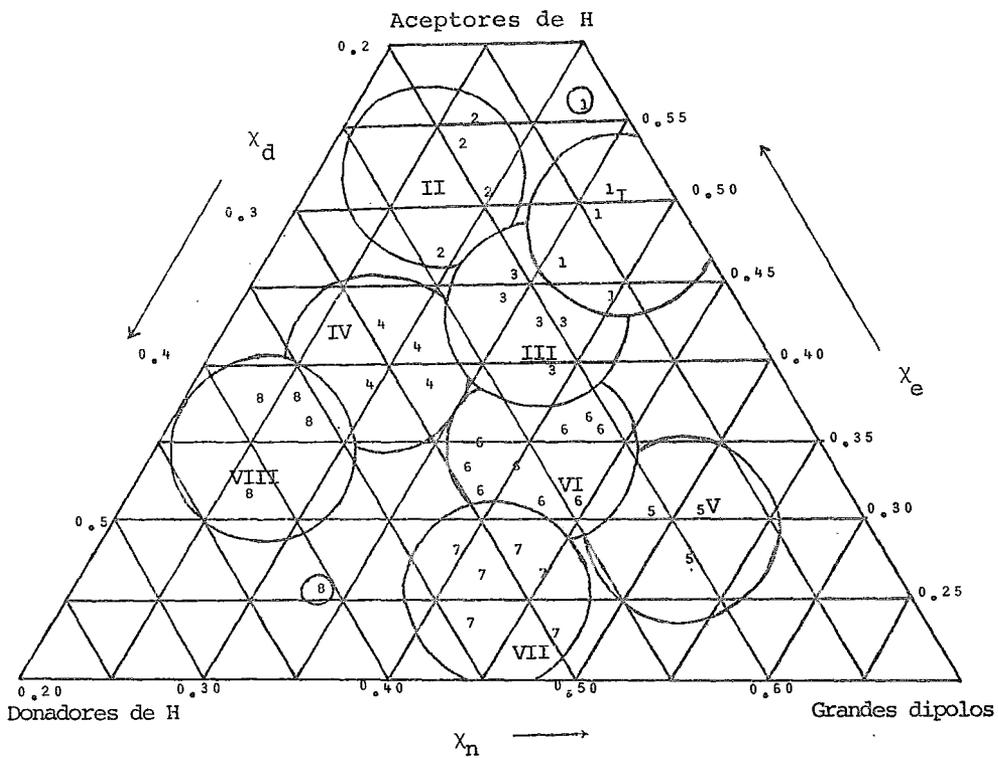


Fig. No. 1 Triángulo de Selectividad para disolventes¹³.

Si se está trabajando con un disolvente del grupo I y se desea obtener un cambio drástico en α , debe cambiarse a un disolvente de otro grupo, por ejemplo del VIII. Si sólo se desea una pequeña modificación en α , se cambia por otro disolvente del mismo grupo¹³.

Otra forma de mejorar la resolución mediante cambios en α , consiste en incrementar la diferencia de polaridades de las fases estacionaria (E) y móvil (M), manteniendo constante la polaridad promedio. Si los valores de K de los solutos son ligeramente diferentes y mayores a 1, este cambio en las fases incrementará α . Sin embargo, esto también da por resultado un gran incremento en los valores de k' de los solutos más fuertemente retenidos, mientras que los valores de k' de los solutos débilmente retenidos se aproximan a cero simultáneamente, es decir que el número de solutos que pueden caer en un intervalo adecuado de k' disminuye al aumentar la diferencia de polaridades entre E y M.

2) Cambio de Fase Estacionaria

Aunque esta medida también permite hacer modificaciones sobre los valores de α , el cambio en la fase estacionaria solamente deberá hacerse cuando las otras medidas no dieron resultados ya que resulta más práctico modificar la fase móvil.

3) Cambios del pH de la fase móvil

Esta técnica se restringe a muestras que contienen ácidos o bases ionizables. En este caso se varía el pH y se observan los cambios resultantes en los valores de k' y de α . Si ya se ha obtenido un valor óptimo de α mediante una modificación en el pH, pero aún los valores de k' no se encuentran

en el intervalo óptimo, puede ajustarse la fuerza de la fase móvil independientemente sin afectar la selectividad del sistema.

4) Efectos Químicos Especiales

Otro medio para modificar α algunas veces drásticamente, es vía efectos de complejación química o los llamados equilibrios secundarios. Un ejemplo bien conocido de este caso en cromatografía de capa delgada es el uso de adsorbente impregnado con ión plata para separar diferentes compuestos olefinicos.

5) Cambio de Temperatura

Un aumento en la temperatura normalmente reduce todos los valores de k' de la muestra, por lo que generalmente es necesario disminuir la fuerza de la fase móvil para compensar este efecto. El cambio en la temperatura tiene poco efecto sobre los valores de α en CLL o en CLS, pero es de gran importancia en cromatografía de intercambio iónico y de pares de iones. Por esta razón en estas técnicas es generalmente más prometedor un cambio en la temperatura que en la fase estacionaria para modificar α .

Efecto de k' sobre la resolución.- Un cambio severo de k' puede tener un efecto drástico sobre la separación. Si k' es inicialmente pequeña (≤ 1), R_s aumenta rápidamente con el incremento de k' . Sin embargo, para valores de k' mayores a 5, R_s aumenta muy poco al aumentar el valor de k' . Por lo tanto, se establece un intervalo óptimo de valores de k' en términos de resolución, tiempo de separación y detección de las bandas, este intervalo es $1 \leq k' \leq 10$.

Los valores de k' en CL se controlan por medio de la fuerza del disolvente. Cuando es necesario incrementar los valores de k' se utilizan disolventes más "débiles" y cuando es necesario reducir los valores de k' se utilizan disolventes más "fuertes". Si se utiliza una mezcla binaria como fase móvil, su fuerza se puede aumentar elevando la proporción del disolvente más fuerte en la mezcla, ya que la polaridad resultante es igual a la suma de las polaridades de cada disolvente multiplicadas por la fracción volumétrica en que se encuentran.

Si se utiliza un disolvente puro, es necesario cambiar por otro que sea más fuerte si se desea modificar su poder eluyente.

Efecto de N sobre la resolución.- Si se incrementa el número de platos teóricos se obtienen bandas más estrechas y más altas.

N (Número de platos teóricos) se puede aumentar mediante una disminución en el flujo de la fase móvil y por incremento en la longitud de la columna, pero estas medidas trascienden sobre el tiempo de retención, de manera que resultan poco prácticas por lo general.

En la actualidad, el gran desarrollo en la tecnología de columnas empacadas con partículas de diámetro pequeño para aplicación rutinaria permite que se obtengan valores relativamente grandes de N sin que se tenga que modificar ninguna otra variable, por lo que las otras medidas para aumentar N no resultan eficientes y si se desea mejorar R_s se prefiere acudir a un cambio sobre k' o sobre α .

Cromatografía de Fase Químicamente Unida

Para reducir o eliminar algunas de las desventajas de los sistemas de CLL con fases estacionarias impregnadas, se han desarrollado empaques con superficie químicamente unida (FQU). En contraste a las fases impregnadas, la principal ventaja de las fases FQU es que son muy estables, debido a que la fase estacionaria está químicamente unida al soporte y no se puede remover fácilmente o perder durante el uso. Por lo tanto, no se requieren precolumnas y/o presaturación de las dos fases. Como consecuencia, la CFQU es especialmente útil para muestras que contienen componentes con valores de k' que varían en un amplio intervalo (los cuales requieren de gradiente de elución). La disponibilidad de una gran variedad de grupos funcionales en empaques FQU permite que tanto la cromatografía de fase normal como de fase inversa se lleven a cabo de una manera simple y directa.

En el comercio se encuentran dos tipos de fases estacionarias químicamente unidas, las denominadas de tipo "cepillo" y las denominadas de tipo "enjambre" que difieren entre sí en su forma de fabricación y consecuentemente en su estructura, dando lugar a algunas diferencias en su comportamiento, siendo preferidas las de tipo "enjambre" por ser más estables térmica e hidrolíticamente y por alcanzar el equilibrio con la fase móvil más rápidamente¹⁵.

La cromatografía de fase químicamente unida es aplicable tanto a cromatografía de fase inversa como a cromatografía de fase normal. Sin embargo, en el presente trabajo sólo se enfocará a la cromatografía de fase inversa por ser ésta la técnica utilizada.

La cromatografía de fase inversa químicamente unida normalmente involucra una fase estacionaria no polar (ejem. hidrocarburos C_8 ó C_{18}) utilizada en combinación con una fase móvil muy polar (ejemplo: agua) que logra la separación en base al tipo y número de grupos funcionales en la molécula de soluto y a la superficie hidrocarbonada del soluto. La CFQU es especialmente útil para separar compuestos que difieren en su peso molecular (homólogos, bencenos, especies oligoméricas, etc.), siempre y cuando su peso molecular no sea mayor a 3,000.

El mecanismo exacto de retención de las moléculas en el empaque de fase químicamente unida está en controversia en la actualidad. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, la CLL y CFQU se pueden considerar similares, ya que se pueden obtener separaciones parecidas con las dos y el efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención de los solutos es el mismo en ambos casos.

Como regla general puede decirse que, mientras mayor es la cadena alquílica enlazada mayor es la retención del soluto bajo condiciones determinadas. Similarmente, las fases estacionarias que tienen mayor contenido de carbono tienen una mayor capacidad de retención intrínseca. Además con estas fases se pueden obtener columnas más estables. La longitud de la cadena y el contenido de carbono pueden afectar la selectividad de la fase estacionaria cuando se miden los valores de retención relativos.

No se ha aclarado aún el papel que juegan los grupos silanoles y siloxanos libres en la superficie de la fase estacionaria sobre la retención de solutos con eluyentes muy polares. Se supone que estos grupos que son fácilmente hidratados, reducen la resistencia a la transferencia de masa en la superficie del eluyente acuoso. En las fases estacionarias que contienen cadenas cortas, por ejemplo cadenas alquílicas C_8 , la concentración de grupos silanoles accesibles es pro-

bablemente mayor que en fases C_{18} con un cubrimiento comparable. Como consecuencia, la eficiencia relativamente alta de la columna con ciertas fases C_8 se puede explicar por el efecto de los grupos silanoles, es decir, que interviene un mecanismo de retención dual (interacciones silanofílicas e hidrofóbicas)^{15, 16}.

En la mayoría de los casos, los eluyentes utilizados con fases no polares enlazadas son disolventes polares o sus mezclas. Mientras más baja es la polaridad de un disolvente más alto es su poder eluyente.

La tensión superficial y la constante dieléctrica del disolvente juega un papel importante sobre la retención del soluto. Por otro lado, la viscosidad del disolvente está relacionada a su difusibilidad del soluto en la fase móvil y por tanto, tiene efecto sobre la eficiencia de la columna. Además la magnitud de la presión del flujo a través de la columna a una velocidad de flujo dada así como la velocidad de flujo obtenido a una presión interna de columna determinada están dadas por la viscosidad del disolvente, la cual, disminuye con el incremento de la temperatura¹⁶.

Generalmente, la polaridad y tensión superficial son más altas para agua que para otros disolventes, por lo que éste resulta el eluyente más débil en cromatografía de fase inversa. El metanol y el acetonitrilo son los disolventes orgánicos más populares debido a que absorben a una baja longitud de onda en el UV (no interfieren con la detección de la mayoría de los compuestos), tienen baja viscosidad y se encuentran disponibles con un alto grado de pureza. En la mayoría de los casos el metanol o el acetonitrilo puros son los eluyentes más fuertes que se pueden utilizar. Si se desea un eluyente de fuerza intermedia, se obtiene generalmente mezcla

do uno de estos disolventes con agua o con soluciones amortiguadoras acuosas.

Las figuras 2 y 3 muestran a la viscosidad, tensión superficial y constante dieléctrica como función de la composición de la fase móvil. En ambos casos la tensión superficial y la constante dieléctrica decrecen asintóticamente al incrementar el contenido del disolvente orgánico. Por otro lado, la viscosidad primero incrementa al aumentar la composición del disolvente orgánico y después de alcanzar un máximo vuelve a decrecer. Este efecto es principalmente pronunciado en mezclas de metanol - agua y provoca ciertos problemas cuando se trabaja con gradiente de elución.

Mecanismo de Retención en CFQU

El mecanismo de retención de estos empaques no se ha establecido definitivamente. Se ha propuesto que las moléculas de la muestra se adsorben dentro de la superficie definida por la cubierta orgánica (la cual cubre el sustrato de sílica)^{15,17} o que la partición de la muestra ocurre dentro de una fase "líquida" definida por la cubierta orgánica mas las moléculas asociadas de la fase móvil. En el caso de un mecanismo de adsorción, las moléculas de muestra y de disolvente presumiblemente compiten por un lugar sobre la superficie orgánica (como en CLS). Alternativamente se ha sugerido que los sustituyentes dimetilalquilo en empaques de fase inversa puedan actuar como cristales líquidos (es decir, formando una fase líquida organizada). Otra sugerencia más es que la cubierta orgánica absorbe ciertos componentes de la fase móvil para formar una fase líquida estacionaria más o menos convencional como en CLL. Aunque la mayoría no están de acuerdo con este mecanismo¹⁶, ya que siendo sólo una monocapa los hidrocarburos enlazados no pueden comportarse como una masa líquida;

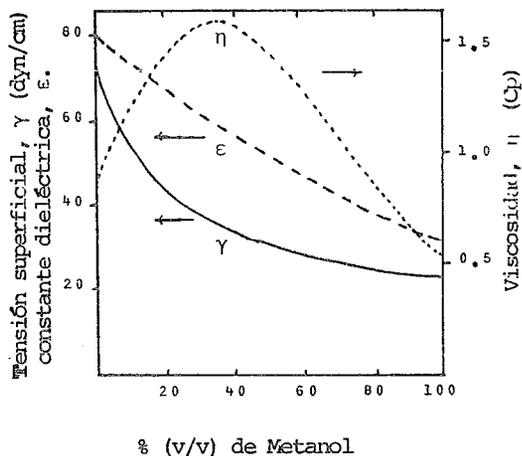


Fig. No. 2 Dependencia de las propiedades de la fase móvil sobre la composición de mezclas de agua- metanol a 25°C¹⁶.

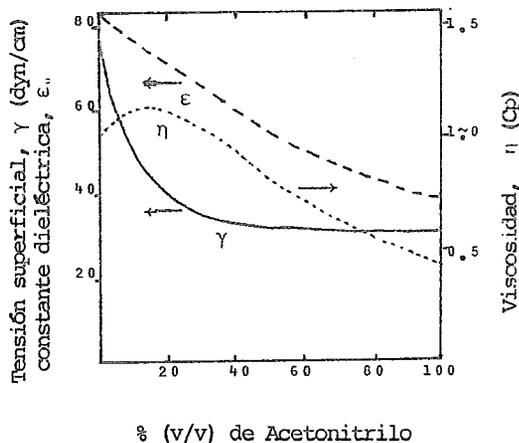


Fig. No. 3 Dependencia de las propiedades de la fase móvil sobre la composición de mezclas de agua- acetonitrilo a 25°C¹⁶.

estas moléculas enlazadas tienen menos grados de libertad rotacional y de traslado que los que tendría una fase líquida no enlazada. La naturaleza física de esta superficie no está claramente definida y probablemente dependa del tipo de fase enlazada y del grado de recubrimiento de la superficie.

Se asume que el enlace entre un soluto y las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria ocurre por interacciones no polares. La retención del soluto se expresa usualmente por el factor de capacidad, k' , el cual se relaciona con la constante de equilibrio termodinámica, K , para el proceso de enlazamiento por la siguiente ecuación:

$$k' = \beta K \quad (7)$$

donde β es la relación volumétrica de las fases móvil y estacionaria.

Una teoría sobre cromatografía de fase inversa tiene que establecer una relación cuantitativa entre k' y las propiedades del soluto y del eluyente para un tipo de fase estacionaria dada. Entre las teorías que describen las interacciones no polares en disolventes polares, sólo se encuentra una que trata dichos procesos en términos de las propiedades del disolvente, tales como la tensión superficial y la constante dieléctrica y aquéllas de los solutos, tales como área superficial y momento dipolar que se pueden estimar con facilidad. Este tratamiento de "efecto solvofóbico" dado por Sinanoglu y sus colaboradores¹⁶, es más general, actualmente, que otros tratamientos del efecto hidrofóbico y es fácilmente extensible a otros disolventes.

Al aplicar esta teoría a la cromatografía de fase inversa, se asume que el soluto se enlaza a los ligandos no polares de la fase estacionaria para formar un complejo. Después de ha

cer un desarrollo teórico para estimar la constante de equilibrio de este complejo, se llega a la siguiente ecuación¹⁶:

$$\ln k' = \beta + \frac{1}{RT} (\Delta A(N\gamma + a) + N A_s \gamma (x^e - 1) + W - \frac{\Delta Z}{\epsilon}) + \ln \frac{RT}{P \text{ o } V} \quad (8)$$

Donde β es la relación volumétrica de la fase móvil y estacionaria. A_s es el área de superficie de una molécula de disolvente; N es el Número de Avogadro; γ es la tensión superficial del disolvente; x^e es un factor que ajusta la tensión superficial macroscópica a las dimensiones moleculares; ΔA es el área de contacto (está determinada por las áreas de superficie de cada especie); W y a , son parámetros que dependen del disolvente; ϵ es la constante dieléctrica del medio; $\Delta Z = Z_{\text{complejo}} - Z_{\text{solute}} - Z_{\text{ligando}}$; donde z es un término que toma en cuenta la distribución de la carga, tamaño molecular y otros factores; R es la constante de los gases; T es la temperatura en grados Kelvin y P o V es la presión o volumen.

En la ecuación 8, que representa una fórmula muy simplificada, todos los términos con excepción de β son función de las propiedades de los solutos y eluyentes que son, al menos en principio, fácilmente medibles. Por lo tanto, se pueden usar para predecir o explicar la dependencia del factor de capacidad sobre las propiedades de los solutos y eluyentes en una columna dada, ya que la retención del soluto sólo involucra asociación solvofóbica entre el soluto y los ligandos no polares de la fase estacionaria¹⁶. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que existen solutos cuyo comportamiento de retención no es regular y esto se ha explicado sobre las bases de un mecanismo de retención dual¹⁷ en el que intervienen tanto las interacciones hidrofóbicas como las interacciones silanofílicas entre las moléculas de soluto y los grupos silanoles accesibles en la superficie de algunas fases de sílica enlazada.

Asumiendo que las respectivas constantes de equilibrio son K_1 y K_2 , el factor de retención k' , puede expresarse como la suma algebraica de ambas contribuciones:

$$k' = \beta_1 K_1 + \beta_2 K_2 \quad (9)$$

donde β_1 y β_2 son las relaciones de fases de la columna apropiada para los ligandos hidrocarbonados y silanoles respectivamente.

Efecto de la Composición de la fase móvil

Al observar la ecuación 8, se supondría que el efecto de la variación del disolvente fuera extremadamente complejo; sin embargo, el efecto de cambiar la composición del disolvente sobre el término de Van der Waals es pequeño en el caso de mezclas de metanol - agua y de acetonitrilo - agua. Además, la variación calculada es casi compensada por el cambio correspondiente en el último término de la ecuación 8. Como consecuencia, los únicos parámetros del eluyente que son de interés son la tensión superficial, x^e y la constante dieléctrica. Si el soluto es un dipolo simple, el efecto de los cambios en la constante dieléctrica es pequeño y puede ser despreciado. En cambio, su efecto sobre las especies ionizadas es mayor, ya que hay una supresión de la ionización en medios de constante dieléctrica baja.

El mayor efecto sobre el factor de capacidad lo ejercen las variaciones en la tensión superficial y su función conjugada, A_s y $(x^e - 1)$. De acuerdo a la ecuación 8, el factor de capacidad disminuye al disminuir la tensión superficial y esto concuerda con las observaciones experimentales.

Los dos términos de la ecuación 8 que contienen a la tensión superficial se encuentran graficados en las figuras 4 y 5 como función de la composición de la fase móvil. Se calcularon las curvas teóricas para un soluto hipotético con ΔA igual a 100 \AA^{16} . Se observó que los valores de x^e primero aumentan y después disminuyen al incrementar la concentración del disolvente orgánico, mientras que la tensión superficial cae precipitadamente. No obstante, la suma de las dos funciones es una función aproximadamente lineal de la composición del disolvente orgánico (expresado en % v/v).

Este comportamiento que ha sido corroborado con resultados experimentales, simplifica las predicciones sobre el efecto que tendrá la composición de la fase móvil sobre la retención de los solutos no ionizados. La siguiente ecuación relaciona estos parámetros:

$$k = k_0 e^{m\psi} \quad (10)$$

donde k_0 es el factor de capacidad en una fase netamente acuosa, m es una constante para un soluto dado en una columna y disolventes determinados y ψ es la fracción volumétrica de agua en la fase móvil.

En aquellos casos en que el comportamiento es irregular, se debe considerar el efecto de las interacciones silanofílicas¹⁷. En cromatografía con adsorbentes polares como la sílica, el factor de retención está dado por la siguiente ecuación:

$$k = (k_0'' + C\psi)^{-1} \quad (11)$$

donde $k_0''^{-1}$ es el factor de retención obtenido con el disolvente menos polar como eluyente, ψ es la fracción volumétrica del disolvente más polar y C es una constante característica del sistema cromatográfico.

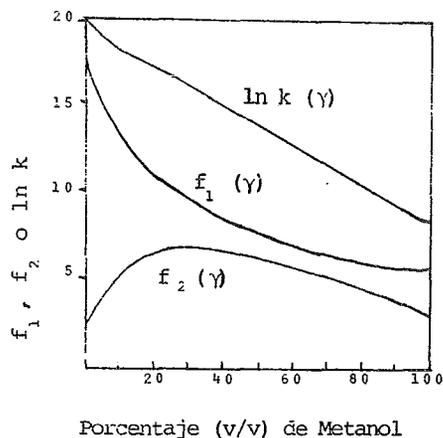


Fig. No. 4 Variación del logaritmo del factor de capacidad y de los dos términos dependientes de la tensión superficial en la ecuación 8 con la composición de mezclas de metanol-agua¹⁶.

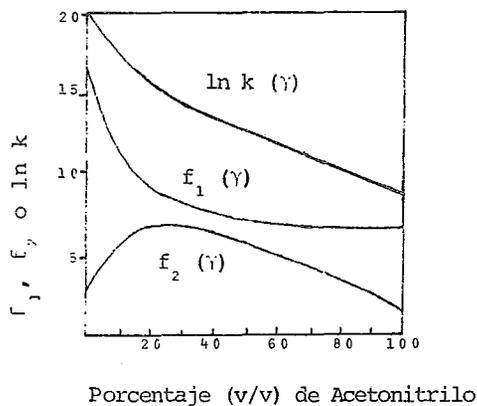


Fig. No. 5 Variación del logaritmo del factor de capacidad y de los dos términos dependientes de la tensión superficial en la ecuación 8 con la composición de mezclas de acetonitrilo-agua¹⁶.

tomando en cuenta los dos tipos de interacciones (silanofílicas y solvofóbicas), el factor de retención resultante es:

$$k = k_0 e^{m\psi} + (k_0'' + C\psi)^{-1} \quad (12)$$

Puesto que el primer término incrementa mientras que el segundo disminuye al aumentar ψ , esta ecuación predice una curva cóncava de $\log k$ vs. ψ con un mínimo, lo cual concuerda con las observaciones experimentales¹⁷.

A bajas concentraciones de agua en la fase móvil, predomina el mecanismo silanofílico, mientras que a concentraciones más elevadas su efecto es despreciable frente al efecto provocado por las interacciones solvofóbicas.

Una medida que se ha tomado para reducir este problema es el uso de aminas alifáticas que interactúan fuertemente con los grupos silanoles libres. Estas aminas se incluyen en la fase móvil en concentración suficientemente alta para que compita con el soluto por los silanoles y de esta manera la retención del soluto sólo ocurra por interacciones solvofóbicas y así se puedan obtener gráficas lineales de $\log k$ vs. ψ . Las moléculas pequeñas como la trietilamina son muy solubles y pueden servir también como buffers, sólo que se requieren altas concentraciones de estas sustancias. Si se utilizan aminas más voluminosas como la N,N- dimetildodecilamina se requieren concentraciones mucho más bajas (del orden de 1 mM), ya que el complejo amino- silanol se estabiliza por interacciones solvofóbicas entre el ligante hidrocarbonado de la fase estacionaria y la cadena alquílica de la amina¹⁸. Se ha observado que conforme mayor es la cadena de la amina, mayor es su poder enmascarante¹⁸; además se ha observado también que con fases de octadecilsílica los agentes enmascarantes se enlazan más fuertemente que con octilsílica.

La retención silanofílica se puede evitar no sólo por agentes bloqueantes del silanol, sino también por enmascaramiento de la función del soluto que interactúa con los silanoles¹⁸.

Sin embargo, las interacciones silanofílicas no siempre son indeseables, en algunas ocasiones son favorables para mejorar la retención de algún compuesto así como para mejorar la selectividad de una separación

Efecto de las sales

La adición de sales reduce en la mayoría de los casos la repulsión electrostática entre las moléculas de soluto. Aparte de su efecto electrostático directo, la mayoría de las sales inorgánicas neutras también aumentan la tensión superficial de soluciones acuosas, linealmente con el incremento de la concentración. Por lo tanto, si un soluto es neutro, el logaritmo de su factor de capacidad aumenta linealmente con la concentración de la sal, debido al incremento en la tensión superficial de acuerdo a la ecuación 8. Como resultado, el logaritmo del factor de capacidad inicialmente disminuye con el aumento en la concentración de la sal debido a un incremento en Z , y finalmente disminuye linealmente conforme la tensión superficial decrece. Este comportamiento se ha verificado experimentalmente¹⁶ con solutos de diferentes áreas de superficie.

Efecto del pH.

Los solutos capaces de ionizarse pueden sufrir grandes cambios en sus factores de capacidad al variar el pH de la fase móvil cuando el valor de pH está cercano al valor de pKa del soluto. Este efecto se ha tratado para ácidos y bases monopróticas, para ácidos dipróticos y para zwitteriones. Por

ejemplo, la dependencia del factor de capacidad de ácidos monopróticos sobre la concentración del ión hidrógeno está dada por la siguiente ecuación:

$$k = \frac{k_{\text{neut}} + k_{\text{ion}} \frac{K_a}{[H^+]}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (13)$$

donde K_a es la constante de disociación del soluto y $[H^+]$ es la concentración del ión hidrógeno; ambos medidos en la fase móvil. Los factores de capacidad límites del soluto neutro y completamente ionizado están dados por k_{neut} y k_{ion} , respectivamente.

Este análisis asume que las moléculas de soluto ionizadas y no ionizadas alcanzan el equilibrio rápidamente comparado con la velocidad de equilibrio con la fase estacionaria y que el enlazamiento de cada forma se caracteriza por las constantes intrínsecas. De manera que el factor de capacidad para la forma neutra está dado por el valor limitante k_{neut} multiplicado por la fracción del soluto presente como especie neutra en la fase móvil, $[H^+]/([H^+] + K_a)$. Para la forma ionizada se puede desarrollar una expresión similar. El factor de capacidad resultante, k , es la suma de los términos individuales. Este modelo se ha extendido para calcular el factor de capacidad de especies que tienen más de una función ionizable ^{16, 19}.

De acuerdo a la ecuación 13, el factor de capacidad cambia con el pH siguiendo una curva sigmoidea cuyo punto de inflexión corresponde a un pH igual al pKa del grupo ionizable, como se ilustra para ácidos y bases monopróticos en la fig. No. 6.

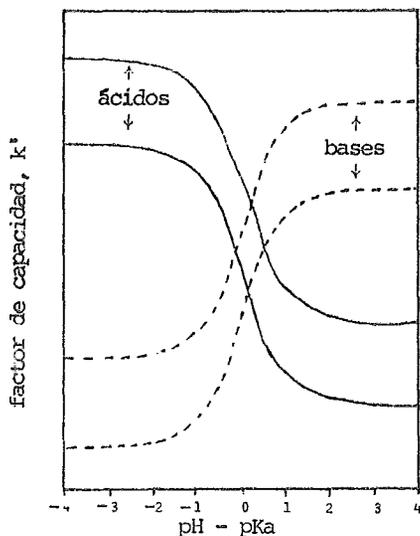


Fig. No. 6 Efecto del pH de la fase móvil sobre la retención de ácidos y bases débiles en fases estacionarias no polares¹⁶.

Este comportamiento está de acuerdo con numerosas observaciones experimentales que manifiestan que en cromatografía de fase inversa, en contraste con cromatografía de intercambio iónico, hay una disminución en el factor de capacidad al aumentar la proporción de la forma ionizada del soluto. Consecuentemente, la retención de aminas incrementa, mientras que la de ácidos carboxílicos disminuye con el incremento en el pH de la fase móvil¹⁶.

Efecto de la Temperatura

Se ha postulado que las interacciones hidrofóbicas se ven reforzadas con el incremento de la temperatura, sin embargo, la experiencia generalmente demuestra lo contrario.

Se han hecho algunos estudios sobre los efectos de la temperatura no controlada en los tiempos de retención cuando se usa gradiente de elución que han demostrado la necesidad de tener un estricto control de la temperatura^{16,20}, ya que se llegan a observar disminuciones en el tiempo de retención del orden de una amplitud de pico.

También cuando el grado de ionización de un soluto cambia significativamente con la temperatura, se puede observar una dependencia anómala del factor de capacidad sobre la temperatura (T). Esto puede suceder por ejemplo, cuando la constante de disociación del buffer y del soluto muestran dependencias sobre T significativamente diferentes. Como consecuencia, los valores de retención relativos de solutos ionizables y no ionizables pueden cambiar drásticamente con la temperatura¹⁶.

Las gráficas de $\log k'$ vs. $1/T$ generalmente son lineales. En ocasiones es recomendable un cambio en la temperatura cuando se trabaja con fase inversa, por ejemplo: cuando se desea disminuir la viscosidad de la fase móvil, con el fin de aumentar la habilidad de ésta para disolver cantidades más grandes de muestra (particularmente para separaciones preparativas de materiales poco solubles), o bien, para alterar la selectividad de una separación, etc.

Los empaques hidrocarbonados de fase inversa se han utilizado con fases móviles acuosas a temperaturas hasta de 81°C por grandes períodos de tiempo sin ningún problema¹⁴. Una temperatura entre 50 - 60°C parece ser adecuada en cromatografía de fase inversa si los componentes de la muestra lo permiten. Comparado con las condiciones ambientales, a estas temperaturas usualmente se dobla el número de platos teóricos de la columna.

Los cambios en la temperatura de la columna pueden afectar la selectividad en las separaciones cuando se están separando solutos con diferentes funcionalidades. Desafortunadamente la dirección y grado en que ocurren estos cambios no son fácilmente predecibles por lo que no es recomendable usar la variación de la temperatura como medida inicial para ajustar la selectividad de una separación¹³.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, Estándares y Material.

Metanol grado cromatográfico.

Acido Fosfórico grado analítico.

Fosfato mono y dibásico grado analítico.

Agua destilada.

Acetato de sodio grado analítico.

Acido tricloroacético grado analítico.

Acido clorhídrico grado analítico.

Estándares secundarios de cloropropamida proporcionados por: ICN Farmacéutica, Productos Mavi y André Bigaux.

Estándares secundarios de tolbutamida y de glibenclamida proporcionados por la JCC del IMSS.

Estándar USP de cloropropamida proporcionado por la JCC del IMSS.

Estándar USP de 1,3- dipropilurea proporcionado por la JCC. del IMSS.

Estándar de p-toluensulfonamida proporcionado por el Laboratorio Central de Hacienda.

Estándar de 4-clorobencensulfonamida proporcionado por el Laboratorio Central de Hacienda.

Estándar de 4-(2-(5- cloro- 2- metoxibenzamido)etil) ben- censulfonamida proporcionado por el Laboratorio Central de Hacienda.

Excipientes de cloropropamida proporcionados por: ICN Farmacéutica.

Excipientes para tolbutamida proporcionados por: Armstrong Laboratorios de México y Química Hoechst de México.

Excipientes para glibenclamida proporcionados por Proquivemex.

División Farmacéutica y por Laboratorios Sinales.

Estándar de carboxitolbutamida proporcionado por Química Hoechst de Alemania.

Estándar de hidroxí- 3- metiltolbutamida proporcionado por Química Hoechst de Alemania.
Estándar de 4- Cis- hidroxiglibenclamida proporcionado por Química Hoechst de Alemania
Estandar de 4- trans hidroxiglibenclamida proporcionado por Química Hoechst de Alemania.
Solución salina isotónica.
Plasma humano proporcionado por el banco de sangre del Centro Hospitalario La Raza del IMSS_
Equipo y material de laboratorio
Cartuchos Sep- pak de fase inversa C₁₈
Cromatógrafo de líquidos marca Waters con detector de longitud de onda fija.
Cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer con detector de longitud de onda variable.

Se prepararon disoluciones amortiguadoras de fosfatos 0.01 M a diferentes pH y se filtraron a través de membranas de 0.45 µm para la posterior preparación de la fase móvil, la cual se desgasificó sometiéndola a ultrasonido y vacío durante 15 min.

Se prepararon también soluciones amortiguadoras de acetatos 0.01 M a diferentes pH variando de 4.0 a 5.5.

3.2 Aparatos y Condiciones

En el desarrollo de metodología para formulaciones orales se utilizó un equipo Waters Assoc. (Milford, Mass, U.S.A.), compuesto por una bomba modelo M-6000 A, un inyector automático modelo WISP 710 una columna de acero inoxidable (30 cm X 3.9 mm de D.I.) empacada con fase inversa: µ- Bondapak C₁₈ con partículas de 10 µm, un detector de UV de longitud de onda fija a 254 nm modelo 440 y un integrador Waters modelo 730.

El equipo se operó con un flujo de la fase móvil de 0.7 ml/min. con una atenuación de 0.05 y se inyectaron 7 μ l de muestra.

En el desarrollo de metodología para plasma se utilizó un equipo Perkin Elmer (Oakbrook, Ill, U.S.A.) compuesto por dos bombas modelo 3 B con una válvula muestreadora Rheodyne modelo 7105 con un loop de 175 μ l , un detector de UV de longitud de onda variable Perkin Elmer modelo LC 55 y un integrador Hewlett Packard modelo 3390A. La columna utilizada fue la misma que para formulaciones orales, en los dos casos se utilizó un guardacolumna de acero inoxidable de 5 cm. de largo y empacado con el mismo soporte que la columna.

El equipo se operó con un flujo de la fase móvil de 1.0 ml/min. El detector se utilizó a 237.5 nm con una atenuación de 8 y se inyectaron 100 μ l. de muestra.

3.3.1 Desarrollo de la Metodología para Formulaciones Orales.

Se prepararon disoluciones de cloropropamida, tolbutamida y glibenclamida solas y mezcladas, con el fin de ver si alguna se podía utilizar como estándar interno de la otra.

Para la cloropropamida se encontró que se obtenía una respuesta adecuada pesando 100 mg, aforando a 50 ml con metanol y haciendo una dilución 1 : 10 con metanol. Para la tolbutamida, pasando 300 mg y siguiendo el mismo procedimiento y finalmente, para glibenclamida, pesando 62.5 mg, aforando a 25 ml y después haciendo la misma di-

lución. De esta manera se obtuvieron respuestas semejantes para los tres compuestos.

Se inició un estudio del efecto de la fase móvil con mezclas de metanol- agua, sobre el factor de capacidad. Como los resultados con éstas fueron satisfactorios, se consideró que ya no era necesario hacer pruebas con mezclas de acetonitrilo-agua, tal como se había previsto por ser éste un disolvente menos económico y más tóxico.

Una vez estudiado el efecto de aumentar la proporción de agua en la fase móvil, se seleccionaron dos de las mezclas que se consideraron más adecuadas y en ellas se estudió el efecto de la variación del pH en la fase móvil. Para ello se prepararon disoluciones acuosas de fosfato de potasio 0.01 M haciendo variar el pH desde 2.0 hasta 7.0 y después haciendo la mezcla con metanol.

De los resultados obtenidos en estas pruebas, se seleccionaron las condiciones con las que se obtenían buenos tiempos de análisis, un estándar interno adecuado y una buena resolución entre todos los picos (el principio activo, su estándar interno y sus sustancias relacionadas). Posteriormente se procedió a la validación de los métodos, la cual consistió en demostrar su especificidad y linealidad así como en determinar su repetibilidad y su exactitud.

Para probar la especificidad se prepararon disoluciones de las sustancias relacionadas de estos compuestos (productos de degradación o precursor-

res) en la misma concentración en que se prepararon los fármacos de interés; analizándolas solas, con el fármaco y con el estándar interno, para ver si la resolución entre éstos picos era adecuada. Además se compararon los espectros de absorción de las sustancias relacionadas y del compuesto de interés para ver si su respuesta resultaba semejante.

Para probar la linealidad del sistema se prepararon dos curvas estándar. En el caso de cloropropamida usando estándares de concentración: 40, 80, 160, 200 y 320 $\mu\text{g/ml}$, conteniendo cada una de ellas una concentración de 600 $\mu\text{g/ml}$ de tolbutamida como estándar interno. En el caso de tolbutamida se usaron estándares de concentración: 120, 240, 360, 600 y 960 $\mu\text{g/ml}$, conteniendo cada una de ellas una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de cloropropamida como estándar interno. En el caso de la glibenclamida se usaron estándares de concentración: 20, 40, 80, 104 y 128 $\mu\text{g/ml}$, habiéndose seleccionado inicialmente condiciones cromatográficas en las que se utilizaba cloropropamida como estándar interno, pero cuando se dispuso del estándar de una de las sustancias relacionadas de la glibenclamida éstas se modificaron y el estándar interno se cambió a tolbutamida en una concentración de 230.4 $\mu\text{g/ml}$.

Para determinar la exactitud en el caso de cloropropamida se pesaron 4 porciones de 100 mg de placebo o mezcla de excipientes utilizada en una de las formulaciones, se transfirieron a tubos de centrífuga de 50 ml y se les adicionó respectiva-

mente 0, 50, 100 y 150 mg de cloropropamida y se siguió el procedimiento mostrado en la Fig. No. 7.

En el caso de tolbutamida se pesaron 4 porciones de 60 mg de la mezcla de excipientes de una de las formulaciones, se transfirieron a tubos de centrífuga de 50 ml y se les adicionó respectivamente 0, 150, 300 y 450 mg de tolbutamida. Se mezcló bien y se siguió el procedimiento de la Fig. No. 8.

En el caso de glibenclamida se pesaron 6 porciones de 380 mg de la mezcla de excipientes de una de las formulaciones, se transfirieron a tubos de centrífuga a 50 ml y se les adicionó respectivamente 0, 6, 12, 20 26 y 32 mg. de glibenclamida. Se mezclaron bien y se siguió el procedimiento de la Fig. No.9.

Para deerminar la precisión del método se utilizaron pastillas de algunos de los proveedores del IMSS, tomando como muestra representativa (de 20 a 50 tabletas), moliéndolas en un mortero hasta reducirlas a polvo fino y pesando seis fracciones de cada una de ellas, en el caso de cloropropamida, equivalentes a 100 mg del principio activo, a 300 mg en el caso de tolbutamida y 20 mg en el caso de glibenclamida, siguiendo el método respectivo según el caso, descrito previamente (Figs. 7, 8 y 9).

3.3.2 Desarrollo de la Metodología Analítica para Determinación de los Fármacos en Plasma.

Debido a que ya existen varios métodos citados en la literatura para la extracción de los fármacos del plasma utilizando disolventes, en este trabajo se desarrolló un método de extracción cromatográfica utilizando pequeñas columnas de fase inversa (cartuchos Sep-Pak) con el fin de obtener una metodología más simple, rápida y de menor manipulación.

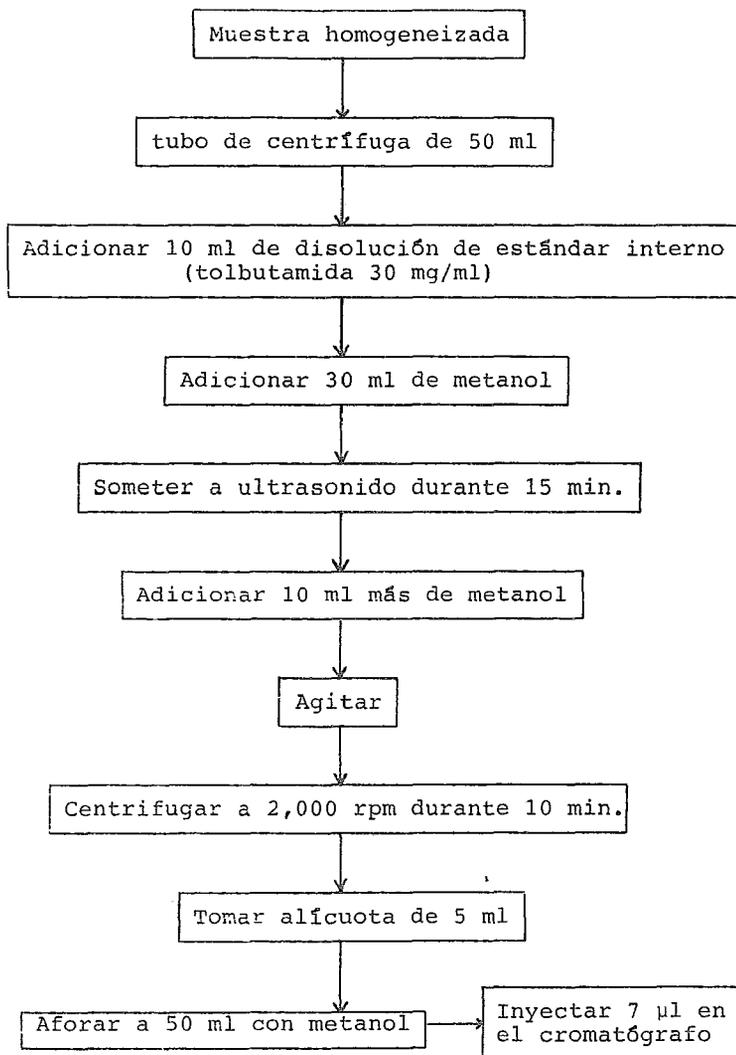


Fig. No 7 Esquema del procedimiento seguido para la preparación de las muestras de cloropropamida para su análisis.

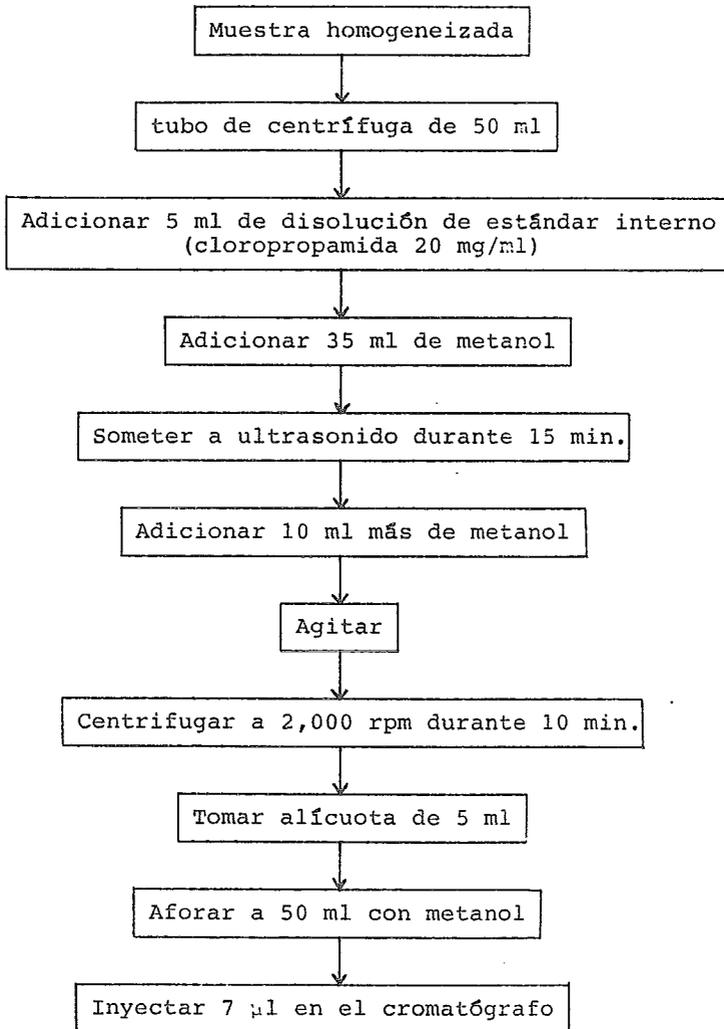


Fig. No. 8 Esquema del procedimiento seguido para la preparación de las muestras de tolbutamida para su análisis.

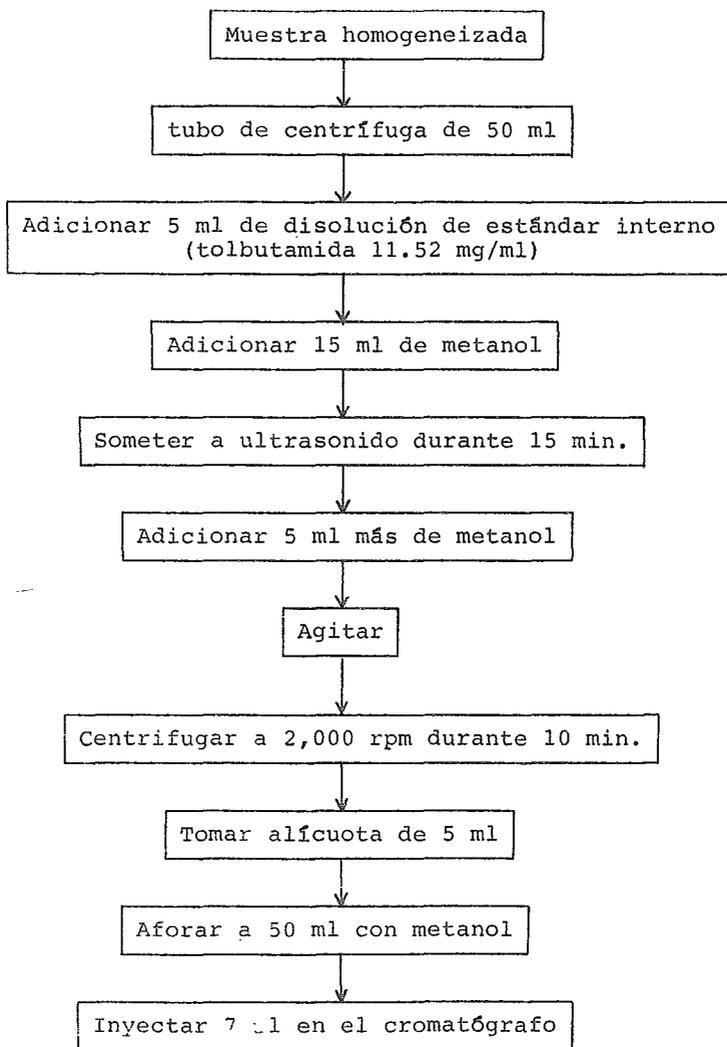


Fig. No. 9 Esquema del procedimiento seguido para la preparación de las muestras para el análisis de glibenclamida.

Se estudió el efecto de diferentes tratamientos para la precipitación de las proteínas del plasma sobre los fármacos bajo estudio. Estos fueron:

KH_2PO_4 0.3 M

Disolución amortiguadora de fosfatos

pH = 7.0 (0.5 M)

Acido clorhídrico 0.05 M

Acido tricloroacético 300 mM

Para ello se prepararon muestras de los fármacos en solución salina y se observó si había precipitación de los mismos al añadir las sustancias mencionadas. Posteriormente se efectuó el mismo estudio con los fármacos disueltos en plasma humano.

Como ninguno de los tratamientos a excepción del ácido tricloroacético (TCA) provocó la precipitación de las proteínas del plasma y debido también a que se presentaron efectos adversos sobre los cartuchos Sep- Pak, se descartó el uso de dichas sustancias precipitantes.

Se llevó a cabo un estudio del efecto del pH sobre el porcentaje de recobro de los fármacos en disolución salina isotónica. El procedimiento seguido para la preparación de las muestras se esquematiza en la Fig. No. 10. Para este caso se recolectaron por separado las diferentes fracciones del eluato (de 0 a 0.5 ml, de 0.5 a 1.5 ml y de 1.5 a 2.5 ml) y se inyectaron directamente en el cromatógrafo para ver en qué fracción se obtenía el mayor rendimiento del fármaco, haciendo la detección del fármaco a 237.5 nm y bajo las mismas

condiciones cromatográficas utilizadas en formulaciones orales.

De las disoluciones amortiguadoras estudiadas, se se leccionaron dos con el fin de analizar el efecto del pH del agua con que se lava la columna de separación después de pasar la muestra (ver fig.10) sobre el porcentaje de recobro del fármaco. Para ello, después de hacer el tratamiento correspondiente, se compararon los resultados de muestras en que se hacía el lavado con agua destilada con los de muestras en que se lavaba con el mismo buffer utilizado para la preparación de la muestra y acondicionamiento de la columna.

Durante la fase de selección de condiciones definitivas para la preparación de la muestra se encontraron como las más adecuadas, por obtener mayor recobro, el uso de la disolución amortiguadora de fosfatos de pH = 2.0 y seguir el procedimiento descrito en la Fig. No. 10. El aforo con agua destilada se hace con el fin de que el disolvente en que se encuentra la muestra sea menos fuerte que la fase móvil y de esta manera evitar el ensanchamiento de los picos¹³.

Para el caso de cloropropamida se adicionaron 20 µl de una disolución de 1000 ppm de tolbutamida como estándar interno y en el caso de tolbutamida se adicionaron 10 µl de una disolución que contenía 1000 ppm de cloropropamida como su estándar interno.

Siguiendo la metodología descrita en la Fig. No. 10, se prepararon muestras de diferentes plasmas

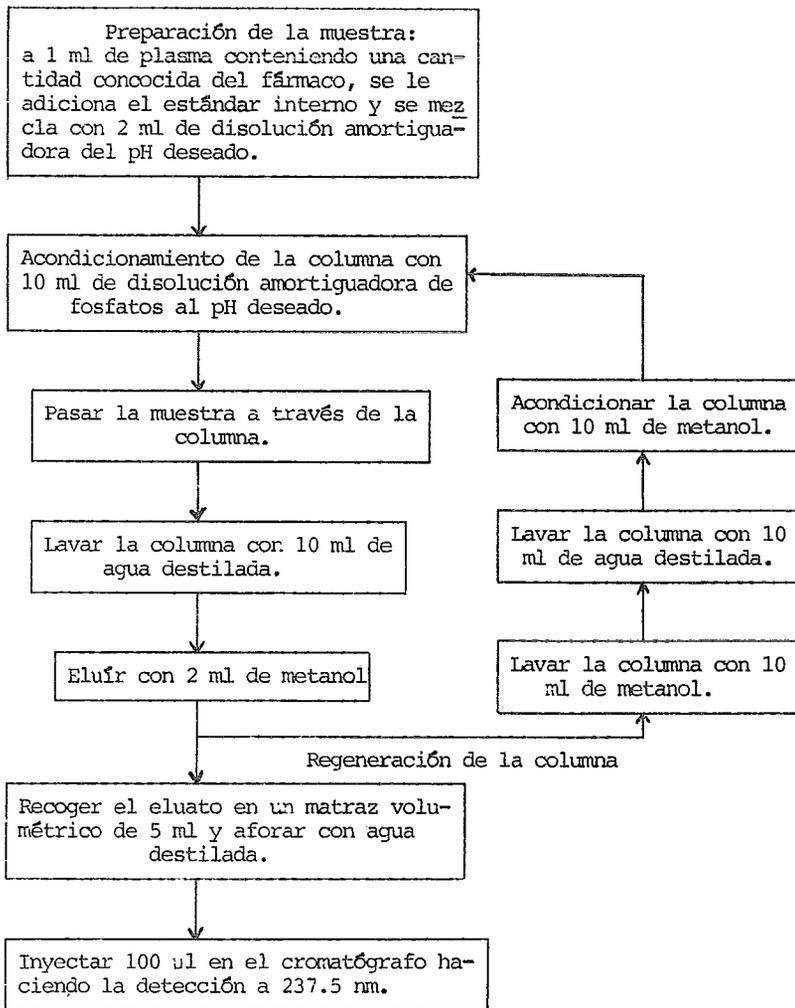


Fig. No. 10 Esquema del procedimiento seguido para la preparación de las muestras para el análisis de clorpropamida y tolbutamida en plasma.

que no contenían estos fármacos para asegurar que no se extrajeran compuestos del plasma que pudieran interferir con el fármaco de interés o con su estándar interno.

Se prepararon disoluciones de los metabolitos de los fármacos y se corrieron los cromatogramas correspondientes.

Se cambiaron las condiciones cromatográficas basándose en el estudio realizado en la primera parte de este trabajo, para asegurar la especificidad del método. En este punto se probó un cambio de disolución amortiguadora en la fase móvil, reemplazando la de fosfatos por una de acetatos (ya que éste último tiene un pKa más cercano al pH elegido) y se compararon las resoluciones entre los picos con ambas fases.

Una muestra de plasma conteniendo los metabolitos de tolbutamida (ya que la cloropropamida prácticamente no se metaboliza) se sometió al mismo tratamiento para estimar de manera aproximada su porcentaje de recobro.

Finalmente se llevó a cabo la validación de los métodos para la cuantificación de cloropropamida y tolbutamida en plasma, la cual consistió en probar especificidad, linealidad, estabilidad de los fármacos en las muestras de plasma y en determinar la exactitud (porcentaje de recobro), repetibilidad, límite de detección y precisión.

Como se mencionó anteriormente, la especificidad

de los métodos se probó al hacer las modificaciones de las condiciones cromatográficas.

Para determinar el límite de detección se prepararon inicialmente muestras de plasma conteniendo 1 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco bajo estudio y se fue disminuyendo cada vez la concentración de éste, a la mitad de la concentración anterior, hasta que la señal obtenida en el cromatógrafo ya era del mismo orden que el ruido.

Posteriormente se procedió a determinar la precisión de los métodos, para lo cual se seleccionaron tres niveles de concentración, bajo (cercano al límite de detección), intermedio y alto. En el caso de cloropropamida se utilizaron las siguientes concentraciones 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, agregando en cada caso una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de tolbutamida como estándar interno. Para la tolbutamida las concentraciones utilizadas fueron 2, 20 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, utilizando en cada caso una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de plasma de cloropropamida como estándar interno. De cada una de las concentraciones mencionadas se prepararon 6 muestras en plasma y se analizaron independientemente.

Para probar la linealidad del método se adicionaron en diferentes tubos de ensaye conteniendo 1 ml de plasma "blanco", cantidades variables de disoluciones metanólicas de los fármacos (siempre en un volumen menor a 100 μl) y el volumen correspondiente del estándar interno. En el caso de cloropropamida se tuvieron las concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma y para la

tolbutamida, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. Estas muestras se sometieron al tratamiento que se esquematiza en la Fig. No. 10. Al mismo tiempo se preparó una curva estándar con las mismas concentraciones para poder determinar el porcentaje de recobro de los métodos por comparación de las pendientes de las dos curvas.

Para el estudio de reproducibilidad de los métodos se procedió de la forma siguiente:

Se prepararon muestras en plasma con una concentración media del fármaco y éstas fueron analizadas por duplicado, por dos analistas durante dos días consecutivos, comparando en cada caso con una muestra de igual concentración preparada en ese momento por el respectivo analista.

Finalmente se hizo un estudio de estabilidad de los fármacos en el plasma. Para ello se preparó suficiente plasma con una concentración media del fármaco bajo estudio. Esta se separó en fracciones de 2.5 ml y se guardaron en tubos de ensaye sellados con parafilm en el congelador para ser analizadas periódicamente a lo largo de 8 semanas. Se analizaron muestras a las 0, 24, 72 horas, 1, 2, 4, 6 y 8 semanas, comparando en cada caso con una muestra recién preparada de igual concentración para determinar el nivel de degradación de los fármacos, ocurrido durante dichos períodos de almacenamiento.

Con el fin de hallar la explicación de algunos resultados anómalos que se presentaron, se procedió

a estudiar el grado de adsorción del fármaco sobre las columnas de separación (Sep- Paks). Para este efecto se hizo pasar una muestra de concentración media de cloropropamida a través de un cartucho nuevo, después de su recuperación y de haber efectuado el tratamiento correspondiente al cartucho (ver fig. No. 10) se pasó una muestra de concentración alta de cloropropamida (100 $\mu\text{g/ml}$), se extrajo y se volvió a hacer el tratamiento de regeneración del cartucho. Por último nuevamente se hizo pasar una muestra de concentración media de cloropropamida. Esta muestra así como la inicial (recuperadas siguiendo el procedimiento de la Fig. No. 10) se inyectaron en el cromatógrafo y los resultados se sometieron a comparación.

En el caso de glibenclamida se empezó directamente probando la misma técnica de separación que se utilizó para los otras dos, pero se detectó la presencia de una interferencia en el plasma. Se probaron 10 plasmas diferentes y todos contenían la misma interferencia. Se hicieron varias modificaciones en las condiciones cromatográficas (composición de la fase móvil, pH, etc.) pero no se logró la separación del fármaco.

Se probaron otros tratamientos del plasma como el de TCA para ver si de esta manera se podía eliminar la interferencia, pero se tuvo poco éxito.

Finalmente, se trató de establecer el nivel de concentraciones que podían ser estudiadas por este método para ver si se lograba determinar con precisión las concentraciones que normalmente se encuentran en plasma.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados de Formulaciones Orales

En la table No. 1 se muestran los valores obtenidos de factores de capacidad mediante la ecuación 14 al variar la composición de la fase móvil. En la Fig. No. 11 puede observarse la representación gráfica de estos resultados:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} \quad (14)$$

donde:

t_r = tiempo de retención del compuesto respectivo

t_o = tiempo muerto de la columna determinado con un compuesto no retenido en la columna, nitrato de sodio en este caso.

COMPOSICION DE LA FASE MOVIL (% DE H ₂ O)	k' CLOROP.	k' TOLBUTAM.	k' GLIBENCLAM.
0%	0.855	1.268	1.017
5%	0.844	1.301	1.006
10%	0.816	1.291	1.028
20%	0.799	1.318	1.168
30%	1.089	2.073	2.877
40%	1.430	3.039	8.559

Tabla No. 1 Factores de capacidad de las sulfonilureas al variar la proporción de agua en un sistema formado por MeOH-H₂O.

Como puede observarse en la gráfica No. 11, los tres compuestos muestran el comportamiento exponencial esperado de acuerdo a la ecuación 9 y puede verse además que hay una inversión en el orden de elución entre la glibenclamida y la tolbutamida.

De los sistemas estudiados se seleccionaron dos para estudiar el efecto del pH sobre el factor de capacidad de los compuestos. Uno en la primera parte de la curva para estar en una zona en la que no se viera muy afectado el factor de capacidad con pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil y otro en una zona en la que ya se obtiene una mayor separación de los compuestos. Estos sistemas fueron los que contenían 15% y 30% de agua. En las tablas 2 y 3 se muestran los valores de factores de capacidad obtenidos en función del pH para los dos sistemas seleccionados y en las figuras 12 y 13 se puede observar la representación gráfica de estos resultados. Es notable que estas gráficas y especialmente la de la Fig. No. 13 sean semejantes a las mostradas en la Fig. No. 6 para ácidos débiles, mostrando un punto de inflexión en las curvas cerca no al valor de pKa de los compuestos (entre 4 y 5.5).

pH EN LA FASE ACUOSA	k' CLOROPROP.	k' TOLBUTAM.	k' GLIBENCLAM.
2.00	2.039	2.072	2.670
3.00	2.072	2.123	2.804
4.00	1.961	2.045	2.603
4.50	1.793	1.983	2.480
5.00	1.665	1.877	2.257
6.00	1.307	1.330	1.368
7.00	0.972	0.978	1.039

Tabla No. 2 Factores de capacidad de las sulfonilureas al variar el pH en un sistema de MeOH- H₂O 85:15

pH EN LA FASE ACUOSA	k' CLOROPROP.	k' TOLBUTAM.	k' GLIBENCLAM.
1.844	2.978	3.218	7.307
3.036	3.101	3.397	7.212
3.910	2.804	3.145	7.034
4.480	2.721	3.196	7.168
5.016	2.056	2.281	4.989
6.020	1.587	1.676	2.693
6.494	1.207	1.363	2.302
7.025	1.067	1.151	1.866

Tabla No. 3 Factores de capacidad de las sulfonilureas al variar el pH en un sistema de MeOH - H₂O 70:30

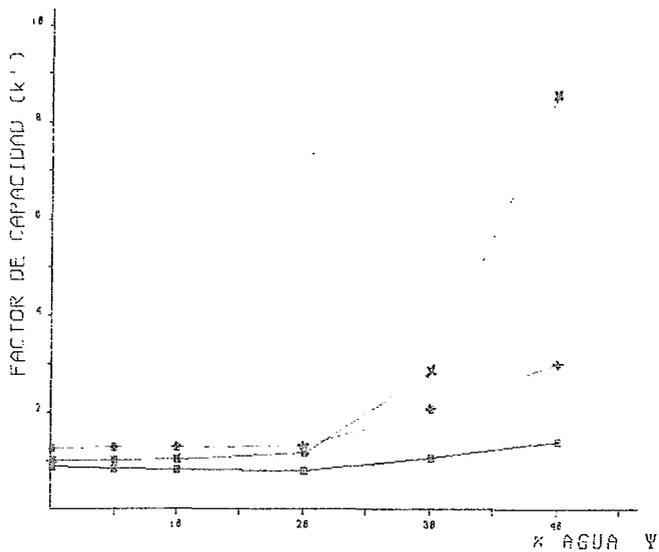


Fig. No. 11 Efecto de la composición de la fase móvil sobre el factor de capacidad de las sulfonilureas. (·) cloropropamida (+) tolbutamida; (x) glibenclamida.

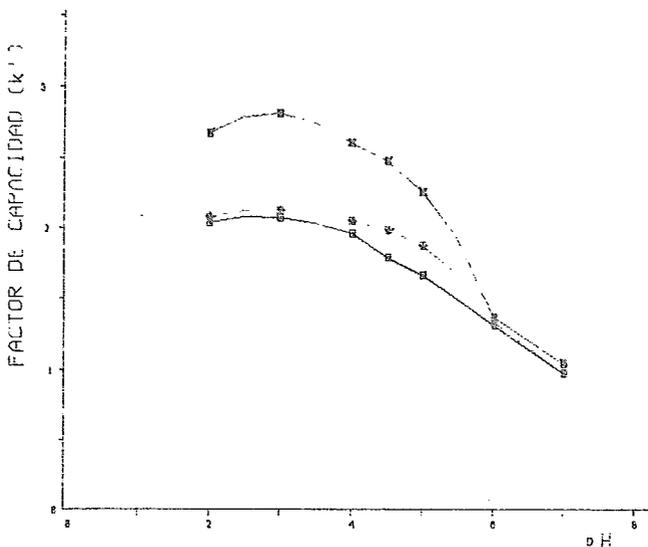


Fig. No. 12 Efecto del pH de la fase móvil sobre el factor de capacidad de las sulfonilureas. (·) cloroproamida; (+) tolbutamida; (x) glibenclamida. Sistema Metanol- agua 85:15.

De acuerdo a estos resultados y ya que se contaba con estas sustancias con un alto grado de pureza, se decidió utilizar como estándar interno unas de otras. Así por ejemplo, para el análisis de cloropropamida se utilizó inicialmente una fase móvil compuesta por 70% de metanol y 30% de solución acuosa de fosfato de potasio 0.01 M con un pH de 4.5, usando como estándar interno a la tolbutamida. Bajo estas condiciones el tiempo de análisis fue de 8 min. Para el análisis de tolbutamida, las condiciones fueron las mismas, utilizando a la cloropropamida como estándar interno.

Para glibenclamida se utilizó una fase móvil compuesta por

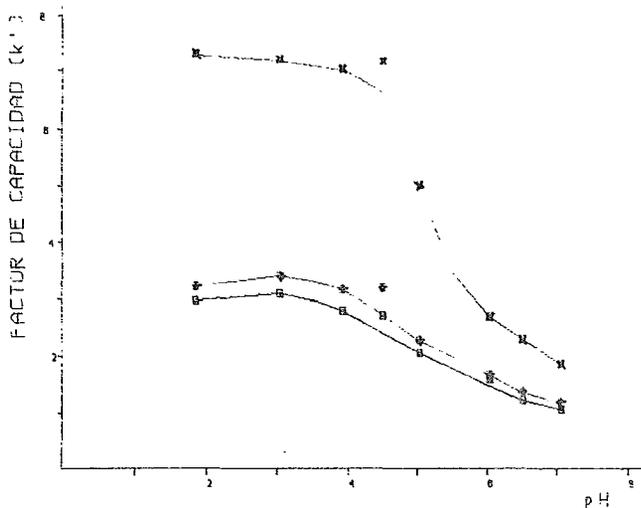


Fig. No. 13 Efecto del pH en un sistema de metanol-agua 70:30, sobre el factor de capacidad de las sulfonilureas. (•) cloropropamida; (+) tolbutamida; (x) glibenclamida.

70% de metanol, 30% de solución buffer de fosfato de potasio 0.01 M de pH 5.5. Bajo estas condiciones se puede utilizar como estándar interno tolbutamida o p-toluensulfonamida (una sustancia relacionada de la tolbutamida), ya que tienen tiempos de retención prácticamente iguales. En éste caso se prefirió utilizar tolbutamida por facilidad en su adquisición.

En cuanto a la especificidad de los métodos, para cloropropamida se probaron sus dos sustancias relacionadas; 1,3-dipropilurea y 4-clorobencensulfonamida. La primera no interfirió bajo las condiciones de análisis

(aparentemente queda retenida en la columna) y la segunda, tiene un tiempo de retención un poco menor que el de la cloropropamida, de manera que de existir degradación de la cloropropamida, se podría observar perfectamente (Ver fig. No. 15). Si se desea una mejor resolución entre los picos, se puede aumentar a 40% el contenido de la fase acuosa en el sistema de elución (ver fig. No. 16); sin embargo, es importante hacer notar que en estos cromatogramas, las sustancias relacionadas se prepararon en la misma concentración que el fármaco de interés, lo cual en la realidad es un caso improbable. Aún así la respuesta de la sustancia relacionada es muy pequeña comparada con la cloropropamida. En la Fig. No. 14 se muestra el espectro de absorción de la cloropropamida y de la 4- clorobencensulfonamida preparadas en la misma concentración y como se puede observar, la 4- clorobencensulfonamida absorbe mucho menos que la cloropropamida en todo el intervalo de longitudes de onda probado.

En el caso de la tolbutamida el único producto de degradación es la p- toluensulfonamida. En la Fig. No. 17 se muestra el espectro de absorción de estos compuestos y puede observarse que en este caso la absorción de los componentes es casi igual a concentraciones iguales. Bajo las condiciones seleccionadas inicialmente, la p- toluensulfonamida tiene un tiempo de retención semejante al de la cloropropamida (ver figs. 18 y 19), pero si se aumenta a 40% la fase acuosa en el sistema de elución, ya se resuelven bien los tres picos (Ver Fig. No. 20).

La glibenclamida tiene dos sustancias relacionadas: la 4-(2-(5- cloro- 2- metoxibenzamido) etil) bencensulfonamida y el etil- N- 4- (2-(5- cloro- 2- metoxibenzamido) etil) bencensulfonil- N- metil carbamato, de las cuales

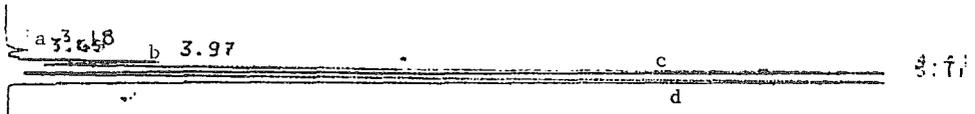


Fig. No. 15 Cromatograma de cloropropamida. a) pico del disolvente, b) pico de 4- clorobencensulfonamida; c) pico de cloropropamida; d) pico de tolbutamida. Sistema MeOH: disolución de fosfato de potasio 0.01 M pH 4.5. 70:30.

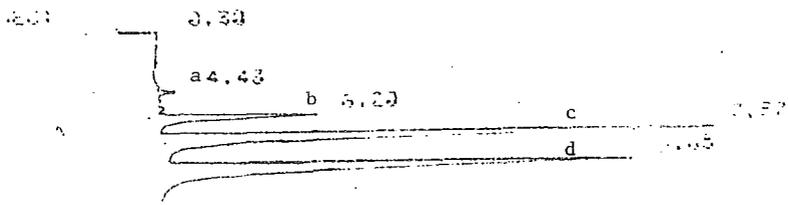


Fig. No. 16 Cromatograma de cloropropamida. a) pico del disolvente, b) pico de 4- clorobencensulfonamida; c) pico de cloropropamida; d) pico de tolbutamida. Sistema MeOH: disolución de fosfato de potasio 0.01 M pH 4.5. 60:40

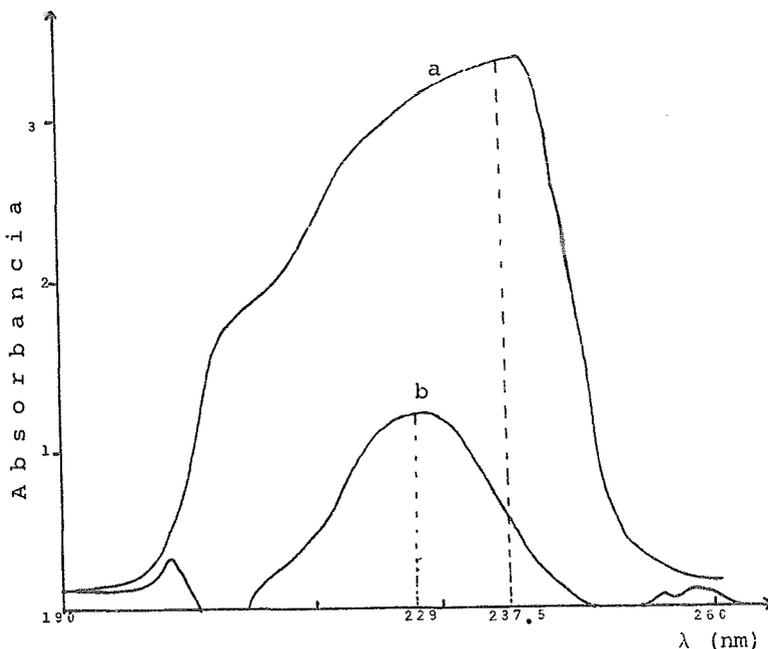


Fig. No. 14 Espectro de absorción de cloropropamida y de 4- clorobencensulfonamida, corridos en un equipo Beckman modelo DU 7. (a) cloropropamida, (b) 4-clorobencensulfonamida.

sólo se consiguió la primera. Se consideró aceptable trabajar sólo con ésta tomando en cuenta que, al ser ambas sustancias productos de degradación, con que aparezca una de ellas en una muestra es indicio suficiente de que el producto se está degradando. En la Fig. No. 21 se muestran los espectros de absorción de la glibenclamida y de su sustancia relacionada, y como puede observarse, a pesar de que ésta absorbe un poco menos que la glibenclamida muestra los mismos máximos, por lo que es necesario conseguir una buena separación, ya que la respuesta del producto de degradación es del mismo orden que la del fármaco. Bajo las condiciones seleccionadas,

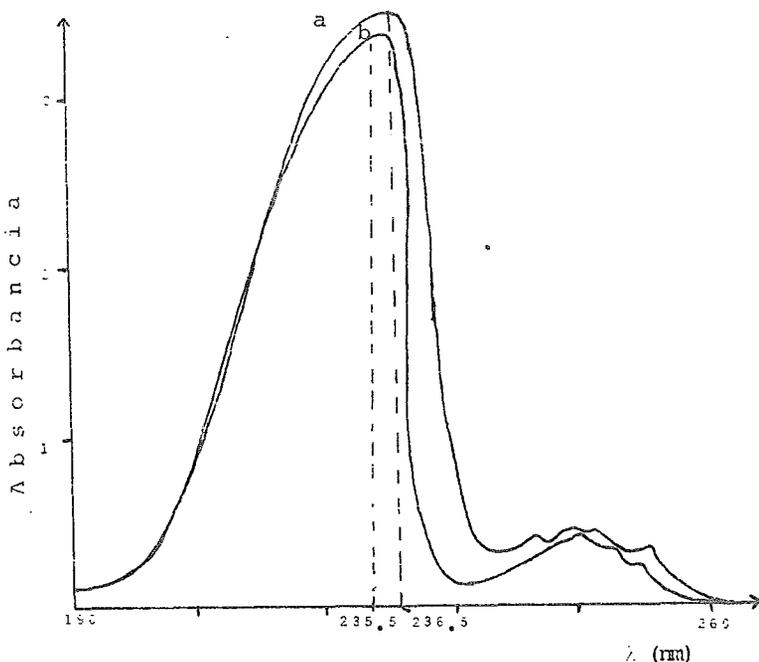


Fig. No. 17 Espectros de absorción de tolbutamida y de p- toluensulfonamida, obtenidos con un equipo marca Beckman modelo DU 7. (a) tolbutamida, (b) p- toluensulfonamida.

la primera sustancia se separa bien de la glibenclamida y del estándar interno (ver fig. No. 22).

A pesar de que la validación de los métodos para cloropropamida y tolbutamida se hizo para el sistema de elución: 30% fase acuosa-70% fase metanólica, los resultados pueden extenderse a las condiciones 40% fase acuosa-60% metanol, ya que la linealidad no se verá afectada porque se alarguen un poco los tiempos de retención. Además, el porcentaje de recobro y precisión del método dependen del proceso de preparación de las muestras y no de las condiciones cromatográficas, cuando hay una



Fig. No. 18 Cromatograma de tolbutamida. a) pico del disolvente; b) pico de cloropropamida; c) pico de tolbutamida. Sistema MeOH: disolución de fosfato de potasio 0.01 M pH 4.5 70 : 30.

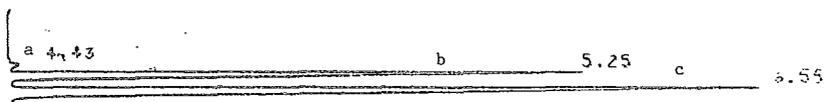


Fig. No. 19 Cromatograma de tolbutamida. a) pico del disolvente; b) pico de p-toluen sulfonamida; c) pico de tolbutamida. Sistema MeOH: disolución de fosfato de potasio 0.01 M pH 4.5 70 : 30.

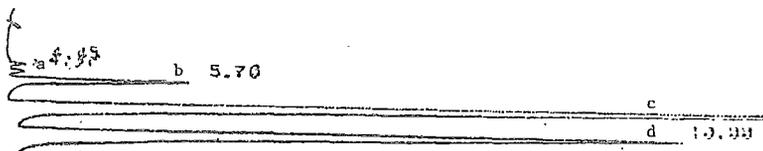


Fig. No. 20 Cromatograma de tolbutamida. a) pico del disolvente; b) pico de p- toluensulfonamida; c) pico de cloropropamida; d) pico de tolbutamida. Sistema MeOH: solución de fosfato de potasio 0.01 M pH 4.5 60: 40.

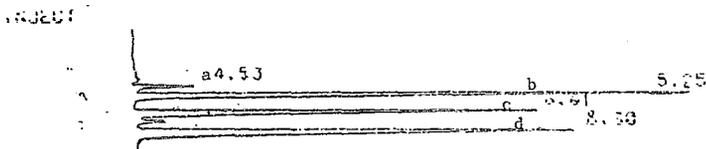


Fig. No. 22 Cromatograma de glibenclamida. a) pico del disolvente; b) pico de cloropropamida; c) pico de 4-(2-(5- cloro- 2- metoxibenzamido) etil) bencensulfonamida; d) pico de glibenclamida. Sistema MeOH: solución acuosa de fosfato de potasio 0.01 M pH 5.5. 70: 30.

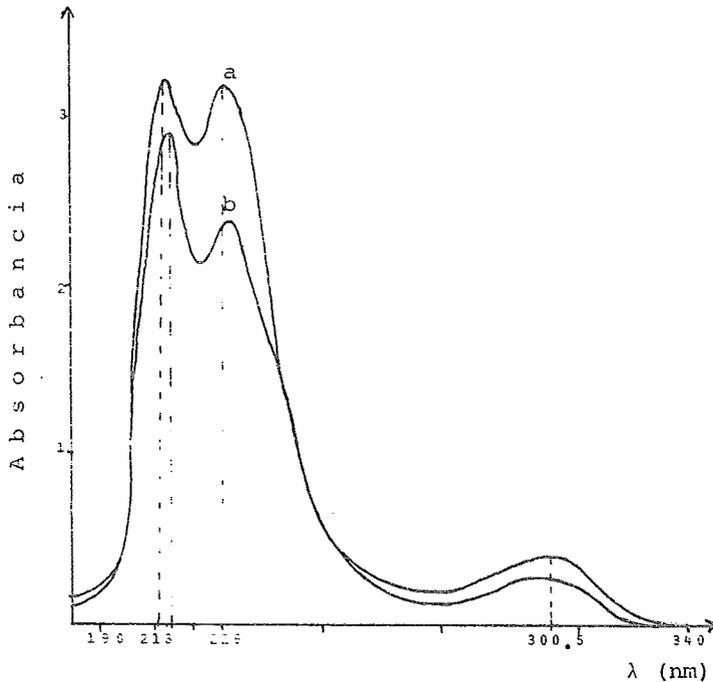


Fig. No. 21 Espectros de absorción de glibenclamida y de 4-(2-(5- cloro- 2- metoxibenzamido) etil) bencensulfonamida, obtenidos con un espectro fotómetro marca Beckman modelo DU 8. (a) glibenclamida, (b) sustancia relacionada.

Adecuada separación, como se mostró en el caso de la glibenclamida.

Debido a que las sustancias relacionada no se había podido conseguir inicialmente, se seleccionaron como condiciones previas, 15% de fase acuosa (pH = 3.0): 85% de fase metanólica, usando como estándar interno a la cloropropamida y se procedió a hacer la validación bajo estas condiciones. Después de que se consiguió el estándar del producto de degradación se probó la especificidad del método y se llegó a la con

clusión de que no era específico, ya que el producto de degradación salía al mismo tiempo que el estándar interno, por lo que se tuvo que cambiar de sistema y de estándar interno, seleccionando finalmente las condiciones: 30% de solución acuosa de pH = 5.5 : 70% de metanol, utilizando tolbutamida como estándar interno. Se volvió a determinar la exactitud y precisión del método así como a verificar su linealidad. Los resultados a pesar de todos los cambios realizados fueron exactamente los mismos, por lo que se concluye que la precisión y exactitud del método no dependen de las condiciones cromatográficas.

En las Figuras 23, 24 y 25 se muestran las curvas de calibración de la relación de áreas vs. concentración para los tres métodos, con lo cual se comprueba la linealidad, del sistema.

Los resultados del recobro y la precisión para el método de cloropropamida se resumen en las tablas No. 4 y 5 y en la gráfica No. 26.

Igualmente, en las tablas No. 6 y 7 y en la gráfica No. 27 se resumen los resultados de precisión y exactitud del método para la determinación de tolbutamida.

Las tablas No. 8 y 9 y la gráfica No. 28 muestran los resultados de la precisión y exactitud del método para glibenclamida.

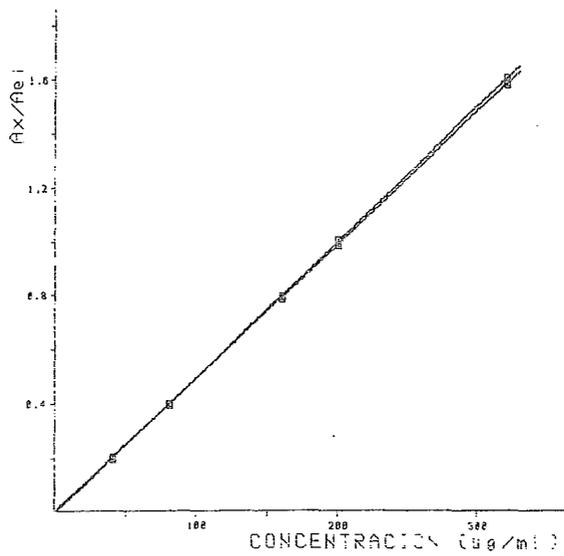


Fig. No. 23 Curvas de calibración de cloropropamida.

(1) $r = 0.99999$ $m = 0.00505$ $b = - 0.0066$

(2) $r = 0.9999$ $m = 0.00496$ $b = 0.00157$

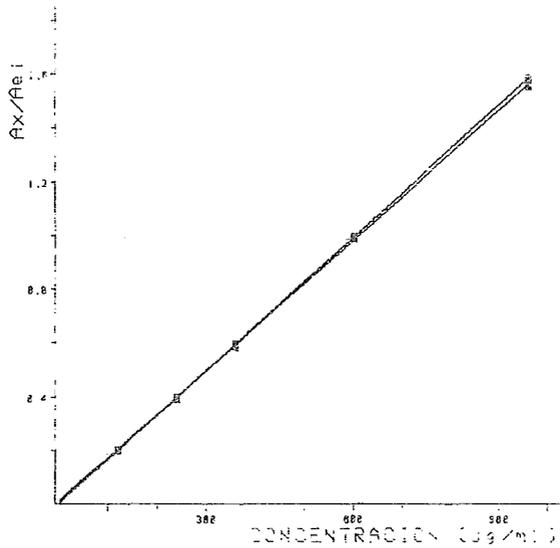


Fig. No. 24 Curvas de calibración de tolbutamida.

(1) $r = 0.9999$ $m = 0.001650$ $b = 0.001623$

(2) $r = 0.9999$ $m = 0.001616$ $b = 0.0109$

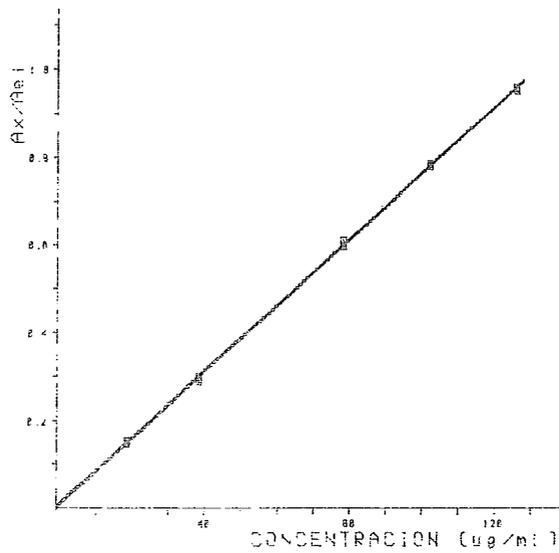


Fig. No. 25 Curvas de calibración de glibenclamida.

(1) $r = 0.999$ $m = 0.007477$ $b = 0.0038$

(2) $r = 0.9999$ $m = 0.007497$ $b = -0.00256$

CONCN. AGREGADA (mg/ml)	CONCN RECUPERADA (mg/ml)	% DE RECUPERACION n = 1
0.10006	0.100000	99.96
0.19994	0.20036	100.21
0.30008	0.29766	98.95

% de recobro promedio = 99.71%

C.V. = 0.67 %

Tabla No. 4 Resultados del % de Recobro de Cloropropamida

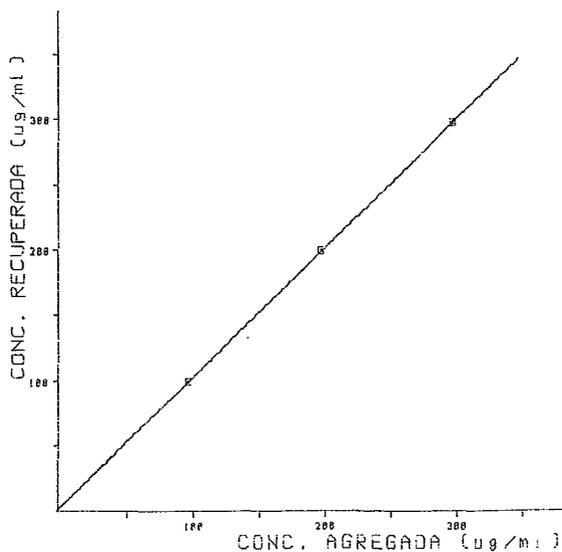


Fig. No. 26 Gráfica de % de recobro de cloropropamida.

$r = 0.999$ $m = 0.9911$ $b = 0.0006$

MUESTRA	CONC. ENTRADA / TABLETA
1	250.86 mg
2	250.24 mg
3	253.06 mg
4	255.96 mg
5	251.22 mg
6	252.85 mg

$$\bar{x} = 252.37 \text{ mg}$$

$$\text{C.V.} = 0.827 \%$$

Precisión con un 95% de confianza = 0.867%

Tabla No. 5 Resultados de la Repetibilidad del método de Cloropropamida.

CONCN. AGREGADA (mg/ml)	CONCN. RECUPERADA (mg/ml)	% DE RECOBRO
0.30000	0.3027	100.89
0.60000	0.6007	100.12
0.90000	0.9024	100.26

$$\% \text{ de recobro promedio} = 100.42\%$$

$$\text{C.V.} = 0.405\%$$

La precisión se calculó mediante la siguiente

$$\text{fórmula: } \% P = \frac{S \times t_{\alpha/2} \text{ g.l.}}{\bar{X} \sqrt{n}} = 100 \quad (15)$$

Tabla No. 6 Resultados del % de recobro de Tolbutamida.

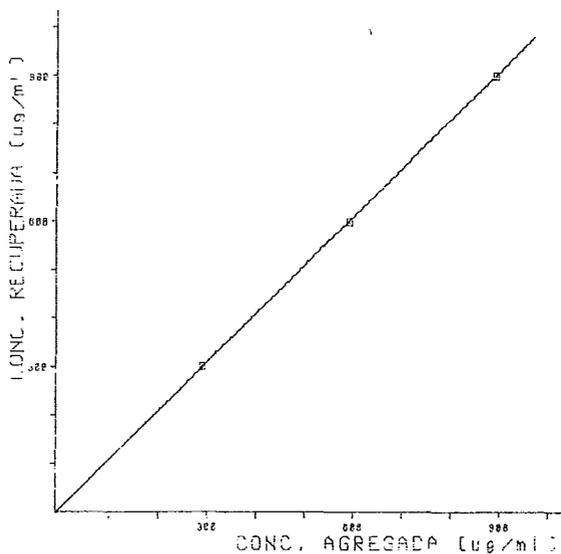


Fig. No. 27 Gráfica de % de Recobro de Tolbutamida.

$$r = 0.99999, \quad m = 1.0017, \quad b = 0.00067$$

MUESTRA	CONCN. /TABLETA
1	507.73 mg
2	506.59 mg
3	506.58 mg
4	509.86 mg
5	506.54 mg

$$\bar{X} = 507.46 \text{ mg}$$

$$C.V. = 0.28\%$$

Precisión con un 95% de confianza = 0.35

Tabla No. 7 Resultados de la Repetibilidad del método para Tolbutamida.

CONC. AGREGADA ($\mu\text{g/ml}$)	CONC. RECUPERADA ($\mu\text{g/ml}$)	% DE RECOBRO
23.92	22.80	95.30
48.28	47.56	98.50
80.04	77.42	96.73
104.00	99.84	96.00
128.00	122.58	95.77

% de recobro promedio = 96.46%

C.V. = 1.30%

Tabla No. 8 Resultados de % de Recobro de Glibenclamida.

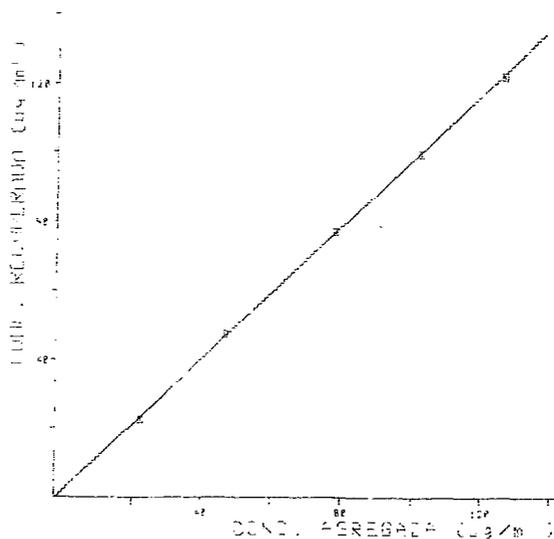


Fig. No. 28 Gráfica de % de Recobro de Glibenclamida.
 $r = 0.9999$, $m = 0.9581$, $b = 0.339$,

Como se puede observar tanto en la tabla No. 8 como en la fig. No. 28, el recobro de la glibenclamida es un poco bajo y significativamente diferente que el de las otras dos (ver apéndice I). Esto indica que el método tiene un error sistemático proporcional, debido posiblemente a la baja solubilidad del fármaco en metanol o a la adsorción del fármaco en los excipientes, etc.

Aunque al parecer, la ordenada al origen de la gráfica No. 28 es un poco alta, estadísticamente no es diferente de cero (ver apéndice I), por lo que el método no presenta errores sistemáticos constantes.

Cuando se trabajó con este fármaco se puede apreciar también lo importante que es la homogeneidad en la agitación por ultrasonido para obtener resultados reproducibles, ya que por su limitada solubilidad, si no se agitan homogéneamente todos los tubos, se obtienen variaciones muy grandes entre los resultados.

MUESTRA	CONCN./TABLETA
1	5.346 mg
2	5.412 mg
3	5.375 mg
4	5.395 mg
5	5.364 mg
6	5.366 mg

$$\bar{X} = 5.376 \text{ mg}$$

$$\text{C.V.} = 0.44\%$$

$$\text{Precisión con un 95\% de confianza} = 0.46\%$$

Tabla No. 9 Resultados de la Repetibilidad del Método de Glibenclamida.

En la siguiente tabla se hace una comparación de los resultados de validación de los métodos desarrollados para glibenclámda. Como se puede observar, a pesar de haberse hecho modificaciones de estándar interno y de condiciones cromatográficas, los resultados no son significativamente diferentes.

	METODO, 1er. SISTEMA	METODO, 2do SISTEMA
PRESICION 95%	0.491%	0.463%
% DE RECOBRO	96.37%	96.46%
C.V. DEL % DE RECOBRO	1.31%	1.30%

Tabla Nc. 10 Comparación de la validación de los métodos para Glibenclámda.

4.4.2 Resultados de Plasma

I. Preparación de Muestras

Se probaron diferentes tratamientos para la precipitación de las proteínas del plasma, estos fueron: KH_2PO_4 0.3 M; de pH = 7.0, ácido clorhídrico 0.05 M y ácido tricloroacético (TCA) 300 mM. De todos éstos tratamientos sólo el tricloroacético (TCA) provocó la precipitación de las proteínas, pero obteniéndose un rendimiento muy pobre de los fármacos (~40%), además de que aparentemente, este tratamiento afecta a los cartuchos Sep-Pak, provocando que éstos pierdan su capacidad de retención.

Con la solución de fosfatos los rendimientos fueron mayores, sin embargo, también se observaron efectos sobre los cartuchos. El flujo se obstruía rápidamente y al eluir las muestras, éstas se obtenían bastante turbias. Con el HCl 0.05 M los resultados fueron adecuados, no se vió afectado el cartucho y se obtuvieron muestras transparentes. Esto sugirió que el efecto preponderante sobre el rendimiento era el pH y no en sí la precipitación de las proteínas y que de utilizarse algún agente modificador del pH, éste debía utilizarse en baja concentración, por lo que se prosigió a estudiar dicho efecto en la preparación de las muestras sobre el porcentaje de recobro de los fármacos condi soluciones buffer de fosfatos 0.01 M desde un pH de 2.0 hasta 7.0.

En la tabla No. 11 se muestran los resultados obtenidos en este estudio, determinando el contenido

El contenido de este fármaco en diferentes fracciones del eluato.

pH	% RECOBRO CLOROPROPAMIDA				% RECOBRO TOLBUTAMIDA			
	0-0.5 ml	0.5-1 ml	1-2 ml	TOTAL	0-0.5 ml	0.5-1 ml	1-2 ml	TOTAL
2.0	9.25	82.22	0.127	91.61	2.41	85.10	0.45	87.97
3.0	6.89	82.13	0.99	90.01	5.38	84.69	~ 0	90.07
4.0	7.49	83.41	0.50	91.39	4.06	80.53	~ 0	84.59
5.0	27.38	61.22	0.84	89.44	13.33	69.80	~ 0	83.13
6.0	33.37	54.24	~ 0	87.61	17.43	68.92	~ 0	86.35
7.0	40.35	38.49	~ 0	73.84	32.67	47.67	~ 0	80.34

NOTA: Estos valores son promedio de dos determinaciones.

Tabla No. 11 Efecto del pH en la preparación de la muestra sobre el % de recobro de tolbutamida y cloropropamida.

Como se puede apreciar en la tabla No. 11 hay una tendencia a disminuir el porcentaje de recobro total de las muestras conforme se aumenta el pH. Aparentemente, al aumentar el pH los compuestos pasan a su forma ionizada y son menos retenidos en la fase inversa de la columna así que empiezan a eluir con el agua de lavado. Por esta razón se eligieron el pH de 2.0 y el 4.0, límites de intervalo con mayor rendimiento, para hacer una comparación de la recuperación de una muestra lavada con agua y con otra lavada con el mismo buffer con que se preparó la muestra.

Debido a que los resultados fueron poco consistentes, no se puede asegurar que haya una diferencia notable entre lavar con el buffer y lavar con agua destilada. Se decidió entonces seguir el tratamiento con buffer de fosfatos de pH 2.0 y hacer el lavado con agua destilada para asegurar así la mejor conservación del Sep-Pak.

Las grandes variaciones en los resultados obtenidos y los porcentajes de recobro acumulativos mayores al 100% sugirieron que no siempre se estaba obteniendo el mismo volumen de eluato del Sep-Pak y/o que como se eluye con metanol, éste se volatiliza rápidamente, aumentando la concentración de las muestras, lo que a su vez, impedía obtener una buena reproducibilidad en las determinaciones. Se decidió llevar a cabo un aforo de la muestra con agua, para que así la fuerza del disolvente en que estaba preparada la muestra fuera menor que la de la fase móvil utilizada y de esta manera se pudieran inyectar volúmenes mayores sin pérdida de sensibilidad y de resolución entre los picos.

II. Métodos

A. Cloropropamida

Durante los primeros análisis efectuados para la cloropropamida, se observó que se obtenía un pequeño pico proveniente del plasma que interfería con la determinación, por lo que fue necesario cambiar las condiciones cromatográficas, quedando finalmente las siguientes condiciones 45% de buffer a pH 4.5 (0.01 M): 55% de metanol a un flujo de 1.0 ml/min y haciendo la detección a 237.5 nm, inyectando 100 μ l de la muestra preparada co

mo ya se describió. Como la cloropropamida prácticamente no se metaboliza¹⁹ no fue necesario probar la especificidad del método con metabolitos; en la Fig. No. 29 y 30 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones.

Como se observó que el buffer de fosfatos empezaba a mostrar variaciones de pH en uno o dos días después de su preparación se pensó en cambiar a otro cuyo pKa fuera más cercano al pH deseado. Se probó el buffer de acetatos y se vió que no había cambios ni en la forma de los picos ni en su eficiencia, por lo que se procedió a utilizar éste.

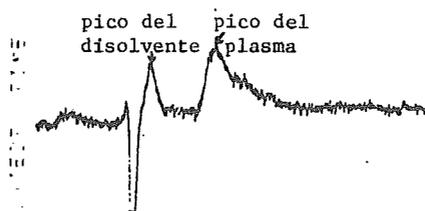


Fig. No. 29 Cromatograma de una muestra de plasma blanco obtenida con el mismo tratamiento que el seguido para la separación de cloropropamida y de tolbutamida.

Bajo estas condiciones se determinó el límite de detección del método.

Si se define el límite de detección como la mínima cantidad que se puede distinguir de la señal de ruido, el límite de detección resulta ser de 200 ng/ml de plasma para cloropropamida. En la Fig. No. 31 se muestra el cromatograma obtenido con una muestra de esta concentración.

Se determinó la desviación estándar cercana al límite de detección (para una muestra de 1 µg/ml), la cual puede considerarse equivalente a la del ruido, por lo tanto:

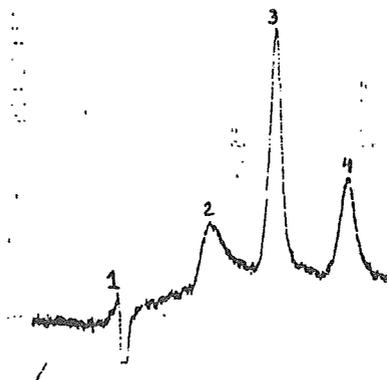


Fig. No. 30 Cromatograma de una muestra de plasma con cloropropamida y tolbutamida después del tratamiento. pico¹ disolvente, pico² interferencia del plasma, pico³ cloropropamida y pico⁴ tolbutamida.

$$\text{Límite de decisión}^{20} = \mu + 3\sigma = 0 + 3(0.0841) = 252.3 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Límite de detección LD}^{20} = \mu + 6\sigma = 0 + 6(84.1) = 504.5 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Límite de determinación Lq}^{26} = \frac{S \times 100}{C.V.}$$

$$Lq = \frac{0.0841 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 100}{5} = 1.68 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

La precisión o repetibilidad del método se estudio a tres niveles de concentración: 1 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. En la tabla No. 12 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla No. 12 Precisión del método de cloropropamida en plasma.

CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	A CLOROPRO n=6	S.CLOROP.	Ax/A.e.i. n=6	Sx/e.i.	PRECISION 95%	PRECISION x/e.i.95%
1	62,135	3,566	.0673	.0065	6.02%	10.18%
10	645,939	27,864	.7398	.0490	4.53%	6.96%
100	37,279,000	2045,546	9.3223	.4887	5.33%	5.09%

A = Area

S = Desviación estándar de los resultados de Area absoluta

Ax/A.e.i. = Relación de áreas

Sx/e.L. = Desviación de la relación de áreas.

En general, se puede observar que hasta una concentración intermedia el estándar interno no ayuda para mejorar la precisión del método. A concentración alta sí se ve un aumento en la precisión, pero de cualquier forma, no es significativamente diferente de la precisión que se obtiene sin usar estándar interno.

En cuanto a la linealidad del método y a su % de recobro o exactitud, en la Tabla No. 13 y en la Fig. No. 32, 33 y 34 se muestran los resultados.

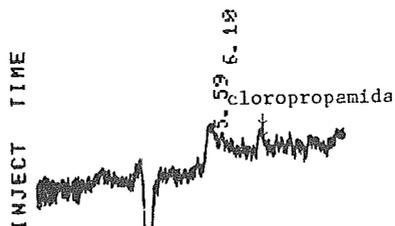


Fig. No. 31 Límite de detección de cloropropamida bajo condiciones de estudio.

CONCN. (µg/ML)	CURVA ACLO.	ESTANDAR Ax/Ae.i.	CURVA ACLO.	EN PLASMA Ax/Ae.i.	% DE RECOB. vs. Area	% DE RECOB. vs.Ax/Ae.i.
0.5	281590	.0695645	303280	.06106042	76.61	228.07
1	626990	.1431190	264070	.07535000	28.79	127.96
2	923430	.2393359	586050	.12074790	53.46	86.10
5	2237900	.5375691	1680300	.45939846	74.92	100.45
10	4047000	.8928847	3242000	.78182650	75.51	81.64
25	1.072E7	2.382751	9874800	2.0293048	94.43	81.29
50	2.077E7	4.735798	2.146E7	5.6620149	103.44	111.45
100	4.130E7	10.40718	4.013E7	10.253456	97.02	100.47

Tabla No. 13 Linealidad del método y exactitud para cloropropamida.

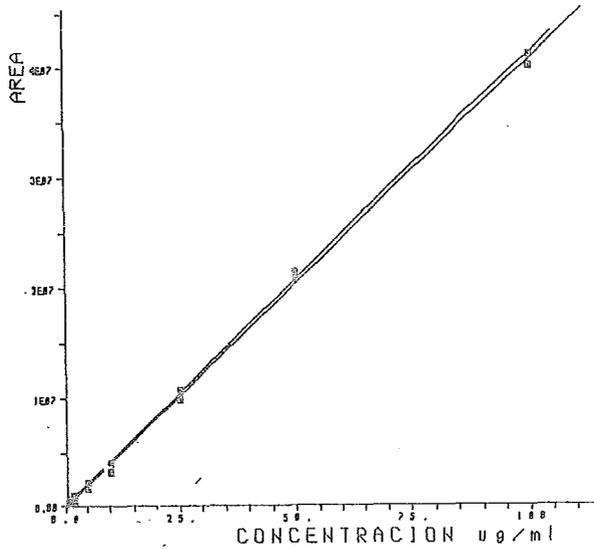


Fig. No. 32 Curvas de calibración de Area vs. Conc. de
 cloropropamida. En disolvente: $r = 0.99995$
 $m = 4.1211092 \times 10^7$, $b = 145430.8$. En plas
 ma; $r = 0.999$, $m = 4.081176 \times 10^7$, $b =$
 - 177657.27

En los puntos más bajos de la curva se tiene una impre-
 sión muy grande, la cual se comprobó, posteriormente que
 era debida a la adsorción del fármaco en el empaque de los
 cartuchos Sep- Pak, por lo que podemos eliminar estos va
 lores para el cálculo de la exactitud del método.

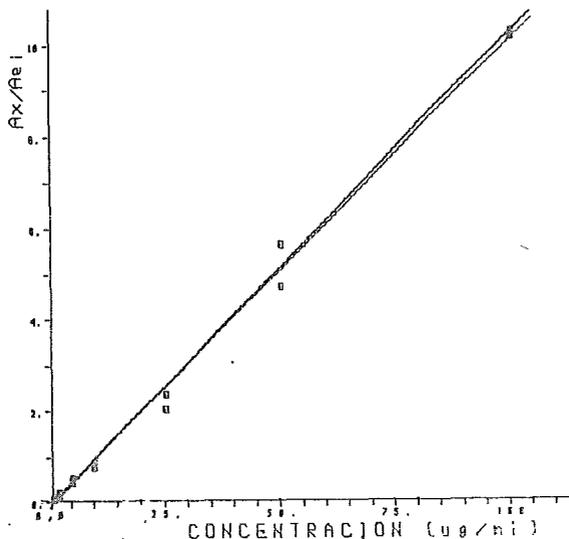


fig. No. 33 Curvas de calibración de $A_x/A_{e.i.}$ vs. Concn. de cloropropamida.

En disolvente: $r = 0.998$, $m = 0.10261425$, $b = -0.055957$

En plasma: $r = 0.997$, $m = 0.104882$, $b = -0.1064$

Tomando a partir de la concentración de $5\mu\text{g/ml}$ y sólo respecto al área de cloropropamida, se obtiene un porcentaje de recobro promedio de 89.07% con un coeficiente de variación (C.V.) de 13.06%. Si se toma el porcentaje de recobro respecto a la relación de áreas ($A_x/A_{e.i.}$), se obtiene un valor promedio de 95.06% con un C.V. de 13.88%. Se puede observar que en este caso hay una mejor exactitud debido a que la adsorción en el cartucho afecta tanto a la cloropropamida como al estándar interno y de esta manera se compensa este efecto.

De las pendientes de las rectas de la Fig. No. 34, se concluye que la exactitud del método es de 99.03% sin el uso de estándar interno y de 102.2% con el uso del mismo. Estas pendientes no son significativamente diferentes de 1, así como tampoco lo son de cero las ordenadas al origen, por lo que puede considerarse que ambos métodos son exactos. (Ver apéndice II).

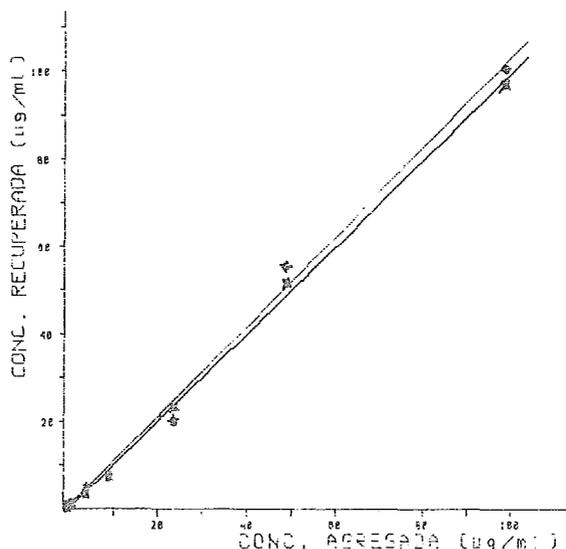


Fig. No. 34 Exactitud del método de cloropropamida en plasma.
 (X) Sin estándar interno: $r = 0.9992$, $m = 0.9903$, $b = -0.7839$. (+) Con estándar interno: $r = 0.997$, $m = 1.0221$, $b = -0.4919$.

Por medio de las curvas y de sus coeficientes de correlación queda demostrada la linealidad del sistema y del método, resultando mejor ésta, sin el uso de estándar interno.

Como se puede observar en la Fig. No. 32, los primeros puntos de la curva tienen rendimiento más bajos que el resto, lo que parece indicar que existe adsorción del compuesto en el Sep Pak cuando éste es nuevo, siendo más notorio el efecto al trabajar con concentraciones bajas del compuesto. Para demostrar lo anterior, se hizo pasar una muestra de plasma conteniendo 5 µg/ml de cloropropamida, la cual se recuperó y se analizó. Después se hizo pasar otra muestra de plasma con una concentración alta de cloropropamida (100 µg/ml), con el fin de saturar todos los posibles sitios de adsorción del Sep-Pak. Nuevamente, después de hacer el tratamiento correspondiente del cartucho, se le hizo pasar otra muestra de plasma conteniendo 5 µg/ml de cloropropamida que también se recuperó y analizó para comparar su resultado con el de la primera muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 14.

MUESTRA	A. CLOROP.	% RECOBRO
Antes saturación	1,249,750	68.38
Después saturac.	1,783,300	97.57

Tabla No. 14 Resultados sobre la posible adsorción de cloropropamida en Cartuchos Sep-Pak nuevos.

Los resultados demuestran que el bajo porcentaje de recobro de las primeras muestras se debe a la adsorción del

compuesto en el Sep-Pak y puede considerarse que la exactitud del método es aproximadamente de 98.88%.

La reproducibilidad del método se estudió en una muestra conteniendo 10 µg/ml de cloropropamida haciendo la determinación por triplicado, durante dos días seguidos y por dos analistas. En la tabla No. 15 se muestran los resultados obtenidos.

ANALISTA/ DIA		RESPECTO A EST. EXT.		RESPECTO A EST. INT.	
		1	2	1	2
1	1	9,678	10,484	12.357	10.692
	2	10,170	10.361	12.089	10.974
	3	9.826	9.524	9.481	9.875
2	1	10.570	10.694	11.770	12.082
	2	10.792	10.885	9.423	10.379
	3	10.665	9.795	10.712	8.721

Tabla No. 15 Resultados de la Reproducibilidad del método de Cloropropamida.

En el apéndice III se encuentran los detalles del cálculo estadístico y en la tabla No. 16 se muestran los resultados.

Tabla No. 16 Resultados del análisis estadístico.

FUENTE DE VARIACION	F CALC (A)	F CALC (Ax/Ae.i)	F TEO 95%	F TEO 99%
Analista	0.0007	0.046	5.32	11.30
DIA	3.171	0.199	4.46	8.65

Puede apreciarse en los resultados anteriores que estadísticamente no existen bases para rechazar H_0 (hipótesis nula), por lo que puede concluirse que el método es reproducible de analista a analista y de día a día.

Finalmente, los resultados de estabilidad de las muestras fueron los que se muestran en la tabla No. 17.

A partir de la cuarta semana, se empezó a observar precipitación de algún componente del plasma a la hora de descongelarlo, por lo que se tuvo que centrifugar para tomar las muestras, sin embargo no se observó efecto significativo en los resultados, ya que la variación entre éstos es del mismo orden de magnitud que la del método a ese nivel de concentración.

TIEMPO	CONCN. ($\mu\text{g/ml}$) REP. E.E	CONCN. ($\mu\text{g/ml}$) RES. E.I.
0 hr	10.94	11.87
24 hr	10.59	10.43
48 hr	10.29	9.28
96 hr	10.14	9.80
1 semana	11.28	11.35
2 semanas	12.16	12.21
3 semanas	10.27	10.46
4 semanas	10.53	10.25
6 semanas	10.70	10.06
8 semanas	11.12	14.05

$\bar{X} = 20.80 \mu\text{g/ml}$
 Precis. 95% = 4.02%

$\bar{X} = 10.98 \mu\text{g/ml}$
 Precis. 95% = 9.23%

Tabla No. 17 Resultados de la estabilidad de una muestra de plasma conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloropropamida almacenada en un congelador, n = 2.

nuevamente se pudo observar que la precisión del método es mejor sin el uso de estándar interno y que preparando el estándar externo en plasma se elimina el problema de exactitud del método.

B. Tolbutamida

Bajo condiciones cromatográficas similares que las utilizadas para el caso de la cloropropamida, se probó la especificidad del método con los metabolitos de tolbutamida, carboxitolbutamida e hidroxí-4- metiltolbutamida. En la Fig. No. 35 se muestra el cromatograma obtenido y como se puede apreciar, estos compuestos no interfieren para la cuantificación de tolbutamida.

De manera muy cualitativa, ya que el pico de la carboxitolbutamida sale en la misma zona en que sale el pico del disolvente, se evaluó el porcentaje de recobro de estos metabolitos bajo el método seguido para la separación de la tolbutamida, resultando ser de 16.6% para carboxitolbutamida y 98.1% para hidroxí-4- metiltolbutamida. Estos resultados indican que gran parte de la carboxitolbutamida se pierde en el agua de lavado por ser un compuesto mucho más polar. De cualquier forma el método se diseñó para cuantificar la tolbutamida y no sus metabolitos.

Posteriormente se procedió a determinar el límite de detección del método. Definido como la mínima cantidad que se puede distinguir de la señal de ruido, el límite de detección resultó ser de 500 ng/ml de tolbutamida. En la Fig. No. 36 se muestra el cromatograma obtenido con una muestra de esa concentración.

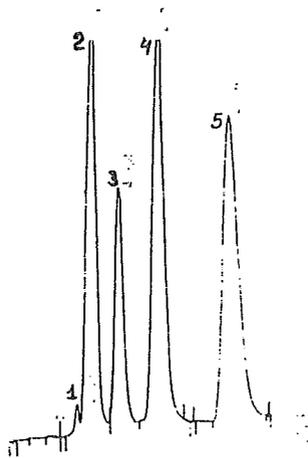


Fig. No. 35 Cromatograma de una mezcla de tolbutamida, clorpropamida y los metabolitos del primero. (1) pico del disolvente, (2) carboxitolbutamida, (3) hidroxí-4-metiltolbutamida, (4) clorpropamida y (5) tolbutamida.

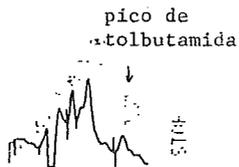


Fig. No. 36 Cromatograma de una muestra de plasma conteniendo 500 ng/ml de tolbutamida.

Se determinó la desviación estándar cercana al límite de detección (para una muestra de 2 µg/ml de tolbutamida), la cual fue de $s = 0.195679$ g/ml y puede considerarse que es igual a la del ruido:

Límite de decisión $LC^{2\sigma} = \mu + 3\sigma = 0 + 3(0.1957) = 587.044$ µg/ml

Límite de detección $LD^{2\sigma} = \mu + 6\sigma = 0 + 6(0.1957) = 1.174$ µg/ml

Límite de determinación $LQ^{2\sigma} = \frac{0.1957 \text{ µg/ml} \times 100}{5} = 3.91$ µg/ml con un C.V. 5%

La precisión del método se evaluó para tres niveles de concentración: alta, media y baja (2, 20 y 100 µg/ml de plasma). En la tabla No. 18 se muestran los resultados obtenidos.

CONCN. (µg/ml)	A TOLBUT. n=6	S TOLBUT.	Ax/Ae.i. n=6	S x/e.i.	PRECIS. 95%	PRECIS. 95%
2	396,615	38,904.7	0.11038	0.0203683	9.78	18.45
20	3599,766	116,158.3	1.16626	0.0811631	3.23	6.96
100	1.838E07	602,810.0	4.23205	0.3918882	3.28	9.26

Tabla No. 18 Precisión del método de tolbutamida en plasma.

Como se puede observar por estos resultados, al igual que en el caso de la cloropropamida, la precisión del método es mejor sin estándar interno.

Los resultados de linealidad del método se muestran en la tabla No. 19 y en las Figs. 37, 38 y 39, así como su porcentaje de recobro.

CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	CURVA A TOL	ESTANDAR Ax/Aei	CURVA EN PLASMA		% RECOB. vs. AREA	% RECOB. vs Ax/Aei
			A TOL.	Ax/Aei		
1	145030	0.032269	164400	0.043179	69.84	38.94
2	579640	0.139852	331480	0.079899	78.76	61.04
5	999800	0.241226	927130	0.243309	94.02	98.42
10	1759400	0.464222	1708300	0.469674	88.00	100.47
25	4746800	1.058443	4773800	1.276008	99.55	113.22
50	9745700	2.383211	9813500	2.429866	102.67	108.86
100	1.902E7	4.386183	1.844E7	4.433282	96.61	99.80

Tabla No. 19 Linealidad y exactitud del método de Tolbutamida,
n = 2.

A concentraciones muy bajas no se obtiene muy buena precisión, por lo que no se toman estos puntos para el cálculo de porcentaje de recobro o exactitud del método.

Tomando a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ y comparando contra el área de tolbutamida, se obtiene un porcentaje de recobro promedio de 96.17% con un C.V. de 5.82% (que es comparable con la precisión del método). Si se toma el recobro relativo a la relación de áreas Ax/Ae.i., se obtiene un valor promedio de 104.15% con un C.V. de 6.26% por lo tanto, nuevamente se obtiene que la precisión es mejor con estándar externo que con estándar interno. Si se utiliza éste último, la exactitud sí se ve mejorada, pero en determinado momento es mejor tener una buena precisión, que tener una buena exactitud.

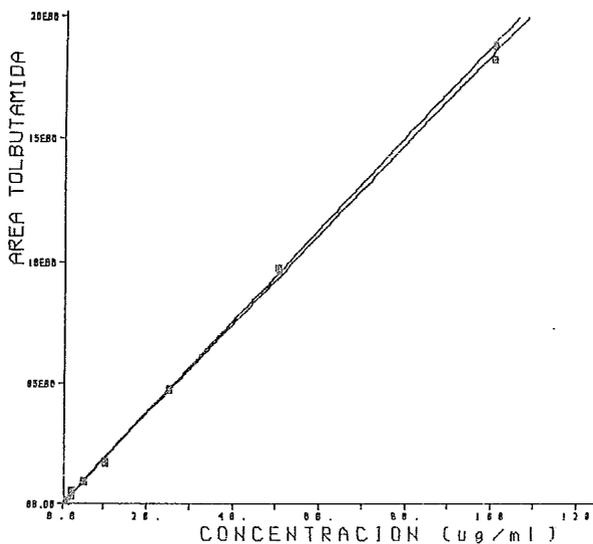


Fig. No. 37 Curvas de calibración de Area vs. Concn. de tolbutamida.

En disolvente: $r = 0.9998$, $m = 1.905551 \times 10^5$, $b = 31,320.0$

En plasma: $r = 0.9994$, $m = 1.86498 \times 10^5$, $b = 23,500.71$

Determinando la exactitud del método con las pendientes de las rectas de la Fig. No. 39, se obtiene un valor de 97.87% sin el uso de estándar interno y de 101.43% haciendo uso de éste mismo. El análisis estadístico de estas pendientes así como de las ordenadas al origen (ver apéndice IV) demuestra que ambos métodos son exactos.

En el caso de tolbutamida, como ya se había saturado previamente los centros de adsorción del cartucho, no se observaron % de recobros bajos a concentraciones bajas como en el caso de clorpropamida, y esto redundó en la obtención de un menor C.V. en el porcentaje de recobro.

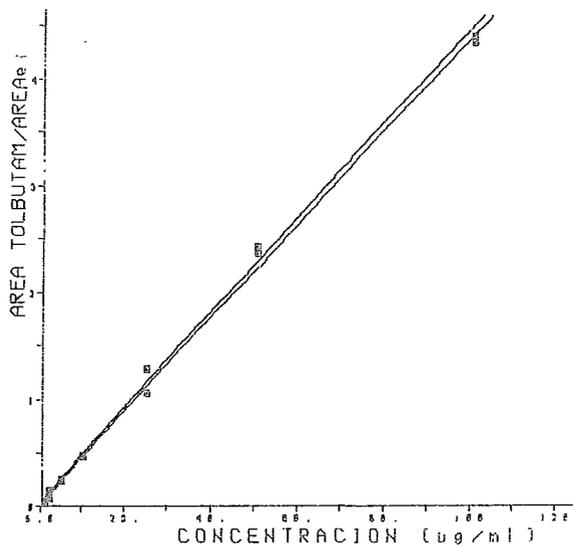


Fig. No. 38 Curvas de calibración de $A_x/A_{e.i.}$ vs. Concn. de Tolbutamida.

En disolvente: $r = 0.9989$, $m = 0.0441634$,
 $b = 0.025982$

En plasma: $r = 0.998$, $m = 0.0479345$,
 $b = 0.0471545$.

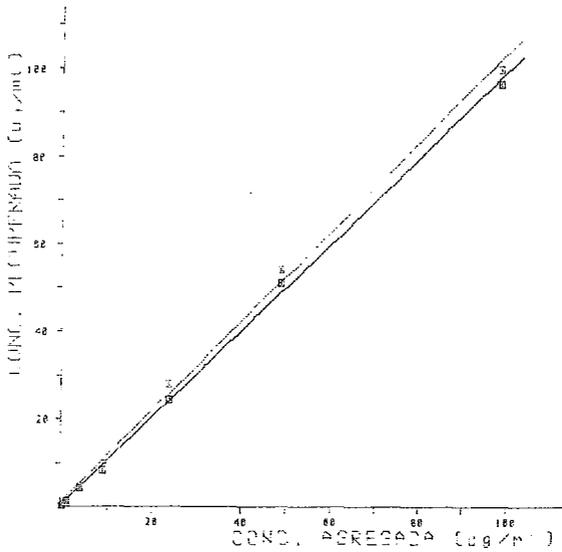


Fig. No. 39 Exactitud del método de tolbutamida en plasma.
 (x) con estándar interno: $r = 0.9994$,
 $m = 0.9787$, $b = -0.04103$
 (φ) sin estándar interno: $r = 0.998$,
 $m = 1.0143$, $b = 0.47943$

La reproducibilidad del método se estudió con una muestra que contenía 10 µg/ml de tolbutamida en plasma, analizándose por triplicado durante dos días seguidos por dos analistas diferentes, comparando en cada caso contra un estándar preparado en plasma. En la Tbala No. 20 se muestran los resultados obtenidos en cada una de las muestras.

ANALISTA	RESPECTO A EST. EXT.		RESPECTO A EST. INT.		
	DIA	1	2	1	2
1	1	9.08	10.11	8.59	10.94
	2	8.97	9.55	8.63	10.14
	3	9.06	10.94	8.83	10.56
2	1	9.91	8.52	11.73	8.92
	2	9.78	8.68	10.31	9.82
	3	9.36	8.53	9.50	9.32

Tabla No. 20 Resultados de la Reproducibilidad del método para la determinación de Tolbutamida.

En el apéndice V, se encuentran los detalles del cálculo estadístico y en la tabla No. 21, se muestran los resultados de éste.

F.V.	F CALC (A)	F CALC (Ax/Ae.i.)	F TEO, 95%	F TEO, ((%
ANALISTA	0.0017	0.529	5.32	11.26
DIA	15.718	8.517	4.46	8.65

Tabla No. 21 Resultados del Análisis Estadístico.

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre analistas, pero en este caso si se obtienen diferencias entre días. Esto posiblemente debido a una inadecuada manipulación en la preparación de los estándares.

Finalmente se hizo un estudio de la estabilidad de la tolbutamida en muestras de plasma bajo congelación, para lo cual se empleó una muestra que contenía 20 µg/ml de plasma. En la tabla No. 22 se muestran los resultados de concentración obtenidos a lo largo de 8 semanas de almacenamiento de las muestras.

TIEMPO	CONCN (µg/ml)/E.E.	CONCN (µg/ml)/E.I.
0 hr	20.02	16.00
24 hr	19.44	15.20
48 hr	21.08	20.91
72 hr	20.97	17.52
1 semana	18.32	17.36
2 semanas	20.01	16.47
3 semanas	20.85	16.28
4 semanas	21.26	18.43
6 semanas	19.66	17.02
8 semanas	20.58	20.03

$$\bar{X} = 20.16 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Precis. } 95\% = 3.36\%$$

$$\bar{X} = 17.52 \text{ µg/ml}$$

$$\text{Precis. } \text{al } 95\% = 10.29\%$$

Tabla No. 22 Resultados de la estabilidad de una muestra de plasma conteniendo 20 µg/ml de tolbutamida almacenada bajo congelación

También en estas muestras se empezó a observar descomposición del plasma a partir de la cuarta semana, sin embargo no se ve efecto significativo en los resultados, ya que su variación es del mismo orden que la variación del método.

C. Glibenclamida

Dado que este compuesto es similar a los otros, se empezó probando las mismas condiciones para su separación, sin embargo, a pesar de que su extracción fue cualitativa, y bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas en la primera parte de este estudio se separó bien de sus metabolitos (ver fig. N.º. 40), se extrajo al mismo tiempo una interferencia del plasma que bajo las condiciones establecidas no se resolvía adecuadamente.

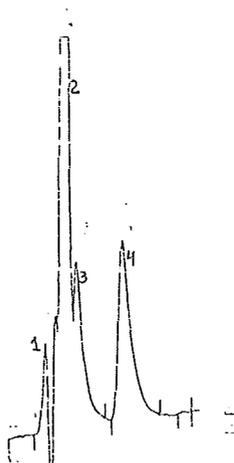


Fig. No. 40 Cromatograma de glibenclamida y sus metabolitos.

(1) pico del disolvente, (2) cis y trans- hidroxiglibenclamida
(3) pico del plasma, (4) glibenclamida.

Se probaron diferentes plasmas y se corrieron sus blancos y todos mostraron esta misma interferencia.

Se efectuaron varios cambios tanto de pH como de composición de la fase móvil para intentar una separación entre la interferencia y la glibenclamida, pero no se obtuvieron resultados favorables ni aún después del tratamiento del plasma con TCA, reduciendo en cambio el porcentaje de recobro de la glibenclamida.

Finalmente se trató de establecer el límite de detección que se podía alcanzar con éste método y se observó que con concentraciones de 100 ng/ml del fármaco en plasma, ya se obtenía una respuesta similar a la que daba la interferencia, y dado que este fármaco se administra en dosis mucho más bajas que las de los otros dos, ésta concentración resulta ser de las más altas que se pueden encontrar en plasma. Por lo tanto, se decidió evaluar la opción de que, una vez preparada la muestra, se llevara a cabo una extracción con éter, se evaporara y se recuperara con un pequeño volumen de la fase móvil para invertarse casi en su totalidad, corriendo al mismo tiempo un plasma blanco. Aunque se logró un gran aumento en la sensibilidad, la interferencia hace que este método tenga poca utilidad para fines prácticos.

V. CONCLUSIONES

Se desarrollaron métodos para la cuantificación de cloro propamida, tolbutamida y glibenclamida en formulaciones orales y en plasma humano. De acuerdo a los resultados obtenidos, a excepción del método de glibenclamida en plasma, los métodos presentan las siguientes ventajas:

- Adecuada especificidad, ya que es posible cuantificar el principio activo separado de sus precursores, productos de degradación o metabolitos.
- Precisión adecuada para los fines de metodología analítica.
- Posibilidad de determinar la existencia de sustancias relacionadas al fármaco de interés y aún cuantificarlas si se dispone de sus estándares.
- Exactitud del 99.71 % en formulaciones orales y del 99.03 % en plasma para el método de cloropropamida, y de 100.42 % en formulaciones orales y 97.88 % en plasma para el método de tolbutamida. La exactitud del método de glibenclamida en formulaciones orales resultó estar limitada debido a su baja solubilidad en metanol, entre otras cosas (95.4 %), por lo que es recomendable utilizar un estándar mezclado con placebo, siguiendo el mismo tratamiento que el utilizado en la preparación de la muestra.
- Confiabilidad en los resultados debido a que los límites de detección alcanzados por los métodos de cloropropamida y de tolbutamida se encuentran muy

por debajo de los niveles normales en plasma.

- Manipulación sencilla que no requiere de personal altamente especializado para la preparación de las muestras, mejorando con esto la reproducibilidad de los resultados.
- Adecuada estabilidad de las muestras en plasma. No se encuentran desviaciones en los resultados aún después de 8 semanas de almacenamiento de las muestras bajo congelación.

Para la determinación de los fármacos en formulaciones orales resultó adecuado el uso de un estándar interno, y no así en las determinaciones en plasma.

Estos métodos permiten el adecuado control de calidad de los medicamentos involucrados así como establecen las bases para llevar a cabo estudios de biodisponibilidad de genéricos de diferentes proveedores, con el fin de establecer correlaciones "in vivo"- "in vitro" para definir las condiciones óptimas para llevar a cabo la prueba de disolución de tabletas, de tal manera que los resultados sean representativos de la biodisponibilidad que tendrán estos fármacos en núcleos de la población mexicana.

Este hecho es de gran importancia ya que hasta la fecha la mayoría de este tipo de estudios sólo ha sido realizado en países desarrollados y con sus individuos representantes.

Para el caso de la glibenclamida las técnicas utilizadas no resultaron adecuadas para su cuantificación en plasma debido a su baja especificidad, ya que se extrae un com-

puesto que interfiere con el fármaco y a que no fue posible detectar los niveles que generalmente se encuentran en plasma.

Para el análisis de este fármaco se propone llevar a cabo una extracción más selectiva, además de una preconcentración de la muestra y/o la utilización de otro método de detección de mayor especificidad y sensibilidad (como por ejem. el de fluorescencia).

Debido a que se observó una adsorción de los fármacos en las columnas para cromatografía extractiva (cartuchos Sep-Pak) se recomienda pasar en primera instancia una disolución de mayor concentración con el fin de saturar los centros de adsorción.

Apéndice I

Análisis estadístico de la exactitud del método de Glibenclamida para formulaciones orales^{2c}.

De la gráfica No. 28, de concentración encontrada vs. concentración agregada, se tiene una función lineal:

$$Y = \beta X + \alpha$$

Donde β es la pendiente de la recta y α es la ordenada al origen.

$$\begin{array}{lll} \Sigma X_i = 384.24 & \Sigma X_i^2 = 36,509.53 & \bar{X} = 76.85 \\ \Sigma Y_i = 370.20 & \Sigma Y_i^2 = 33,769.53 & \bar{Y} = 74.04 \\ \Sigma X_i Y_i = 35,111.87 & & \end{array}$$

$$b = \frac{\Sigma X_i Y_i - \frac{\Sigma Y_i \Sigma X_i}{n}}{\Sigma X_i^2 - \frac{(\Sigma X_i)^2}{n}} = 0.95435$$

$$a = \frac{\Sigma Y_i - b \Sigma X_i}{n} = 0.70020$$

En seguida se hace una prueba de hipótesis para ver si la pendiente es significativamente diferente de 1.0 y si la ordenada al origen es significativamente diferente de cero.

$$\begin{array}{l} S_{xx} = n \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 = 34,907.25 \\ S_{yy} = n \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2 = 31,799.62 \\ S_{xy} = n \Sigma XY - (\Sigma X) (\Sigma Y) = 33,313.70 \end{array}$$

$$Se^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2) S_{xx}} = 0.44846$$

$$Se = 0.66967$$

Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta:

$$H_0: \beta = 1$$

$$H_a: \beta \neq 1$$

Si t calculada es menor a t teórica se puede rechazar H_0 y entonces podemos decir que el método tiene un error sistemático proporcional.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - \hat{\beta}}{Se} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} = -5.70$$

$$t_{te\acute{o}, 0.025, 3} = -3.182$$

Por lo tanto se rechaza H_0 y con un 95 % de confianza podemos asegurar que la pendiente de la recta es diferente a 1 y que el método tiene un error sistemático proporcional por defecto.

Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_a: \alpha \neq 0$$

Si t calculada es mayor a t teórica se puede rechazar H_0 y entonces podemos decir que el método tiene un error sistemático constante.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - a_0}{\text{Se}} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = 1.022$$

$$t_{\text{teó, } \alpha=0.05, 3} = 3.182$$

Por lo tanto no hay bases suficientes para rechazar H_0 y no podemos asegurar que $\alpha \neq 0$, por lo que podemos considerar que el método no tiene errores sistemáticos constantes.

Apéndice II

2.1 Análisis estadístico de la exactitud del método de cloropropamida en plasma humano sin el uso de estándar interno²⁰.

De la gráfica No. 34, de concentración encontrada vs. concentración agregada, se tiene una función lineal.

$$Y = \beta X + a$$

Donde β es la pendiente de la recta y a es la ordenada al origen.

$$\begin{aligned}\Sigma X_i &= 193.50000 & \Sigma X_i^2 &= 13,255.25000 & \bar{X} &= 24.1875 \\ \Sigma Y_i &= 185.35293 & \Sigma Y_i^2 &= 12,717.85629 & \bar{Y} &= 23.1691 \\ \Sigma X_i Y_i &= 12,975.10627\end{aligned}$$

$$b = \frac{\Sigma X_i Y_i - \frac{\Sigma Y_i \Sigma X_i}{n}}{\Sigma X_i^2 - \frac{(\Sigma X_i)^2}{n}} = 0.99031$$

$$a = \frac{\Sigma Y_i - b \Sigma X_i}{n} = -0.78402$$

En seguida se hace una prueba de hipótesis para ver si la pendiente es significativamente diferente de 1.0 y si la ordenada al origen es significativamente diferente de cero.

$$S_{xx} = n\sum X^2 - (\sum X)^2 = 68,599.75000$$

$$S_{yy} = n\sum Y^2 - (\sum Y)^2 = 67,387.14218$$

$$S_{xy} = n\sum XY - (\sum X)(\sum Y) = 67,935.05848$$

$$Se^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2) S_{xx}} = 2.29864$$

$$Se = 1.51613$$

Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta:

$$H_0: \beta = 1.0$$

$$H_a: \beta \neq 1.0$$

Si t calculada es menor a t teórica, se puede rechazar H_0 y entonces podemos decir que el método tiene un error sistemático proporcional.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} = -0.5918$$

$$t_{te6, 0.025, 6} = -2.447$$

Por lo tanto, no podemos rechazar H_0 . El método no tiene error sistemático proporcional.

Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_a: \alpha \neq 0$$

Si t calculada es menor a t teórica se rechaza H_0 y esto indica que el método tiene un error sistemático constante.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - a_0}{\text{Se}} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = 1.1764$$

$$t_{\text{teó, } \alpha=0.05, 6} = 2.447$$

Por lo tanto no podemos rechazar H_0 y esto nos lleva a concluir que el método no tiene errores sistemáticos, es decir, que es un método exacto.

2.2 Análisis estadístico de la exactitud del método de cloropropamida en plasma humano utilizando estándar interno.

De la gráfica No. 34, de concentración encontrada vs. concentración encontrada, se tiene igualmente una función lineal. Con los datos se tiene el siguiente análisis.

$$\begin{aligned} \sum X_i &= 193.50000 & \sum X_i^2 &= 13,255.2500 & \bar{X} &= 24.18750 \\ \sum Y_i &= 193.84066 & \sum Y_i^2 &= 13,709.54016 & \bar{Y} &= 24.23008 \\ \sum X_i Y_i &= 13,452.99696 \end{aligned}$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum Y_i \sum X_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} = 1.0221$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n} = -0.49196$$

$$S_{xx} = n \bar{X}^2 - (\sum X)^2 = 68,599.7500$$

$$S_{yy} = n \bar{Y}^2 - (\sum Y)^2 = 72,102.1190$$

$$S_{xy} = n \bar{XY} - (\sum X)(\sum Y) = 70,115.8076$$

$$\text{Se}^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2) S_{xx}} = 9.0989$$

$$\text{Se} = 3.0164$$

Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_a: \alpha \neq 0$$

Si t calculada es mayor a t teórica, se rechaza H_0 y se puede considerar que el método tiene un error sistemático proporcional por exceso.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} = 0.67846$$

$$t_{\text{teó}, 0.975, 6} = 2.447$$

Por lo tanto no podemos rechazar H_0 , así que no podemos asegurar que el método tenga errores sistemáticos proporcionales.

Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$$H_0: \alpha = 1$$

$$H_a: \alpha \neq 1$$

Si t calculada es menor que t teórica podemos rechazar H_0 y asegurar que el método tiene un error sistemático constante por defecto.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - \alpha}{Se} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = 0.37102$$

$$t_{\text{teó}, 0.975, 6} = 2.447$$

Por lo tanto no podemos rechazar H_0 , así que podemos considerar que el método es exacto.

Apéndice III

3.1 Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de Cloropropamida relativo a estándar externo^{2.0}

Modelo estadístico de factores anidados

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

D = Día

A = Analista

F. V.	P.S.	g.l.	suma de cuadrados	S.C.M.	F. calc.
A_i	$i-1$	1	$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} - \frac{Y_{..}^2}{ijk} = 0.00012$	0.00012	6.982
$D_j(i)$	$(j-1)i$	2	$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 1.08995$	0.54498	3.171
$E_k(ij)$	$(k-1)ij$	8	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} = 1.375$	0.17186	

$$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 1,269.884 \quad i = 2$$

$$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{ik} = 1,270.8225 \quad j = 2$$

$$\frac{Y_{...}^2}{ijk} = 1,269.8839 \quad k = 3$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} = 1,270.9740$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 1,272.3489$$

$$S.C.M. = \frac{S.C.}{g.l.}$$

3.2 Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de Cloropropamida relativo a estándar interno.

Modelo estadístico de factores anidados

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

D = Día

A = Analista

F.V.	P.S.	g.l.	Suma de Cuadrados	S.C.M.	F.calc.
A _i	i-1	1	$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} - \frac{Y_{..}^2}{ijk} = 0.8071$	0.8071	0.046
D _{j(i)}	(j-1)i	2	$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} - \frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 0.7032$	0.3516	0.199
E _{k(ij)}	(k-1)ij	8	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} = 14.109$	1.7637	

$$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 1,377.9853 \quad i = 2$$

$$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{ik} = 1,377.6512 \quad j = 2$$

$$k = 3$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} = 1,378.6885$$

$$\frac{Y_{..}^2}{ijk} = 1,377.1782$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 1,392.7979$$

$$S.C.M. = \frac{S.C.}{g.l.}$$

Apéndice IV

4.1 Análisis estadístico de la exactitud del método de tolbutamida en plasma humano sin el uso de estándar interno²³.

De la gráfica No. 39, se tiene una función lineal:

$$Y = \beta X + \alpha$$

Donde β es la pendiente de la recta y α es la ordenada al origen.

$$\begin{aligned}\sum X_i &= 193.0000 & \sum X_i^2 &= 13,255.0000 & \bar{X} &= 27.57143 \\ \sum Y_i &= 188.6036 & \sum Y_i^2 &= 12,689.8518 & \bar{Y} &= 26.94337 \\ \sum X_i Y_i &= 12,964.8671\end{aligned}$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum Y_i \sum X_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} = 0.97871$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n} = -0.04103$$

$$S_{XX} = n \sum X^2 - (\sum X)^2 = 55,536.0000$$

$$S_{YY} = n \sum Y^2 - (\sum Y)^2 = 53,257.6483$$

$$S_{XY} = n \sum XY - (\sum X)(\sum Y) = 54,353.5784$$

$$S_e^2 = \frac{S_{XX} S_{YY} - (S_{XY})^2}{n(n-2) S_{XX}} = 1.7519$$

$$S_e = 1.3236$$

Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta:

$$H_0: \beta = 1$$

$$H_a: \beta \neq 1$$

Si t calculada es menor a t teórica, se rechaza H_0 y con un 95 % de confianza puede asegurarse que el método tiene un error sistemático proporcional por defecto.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - \beta}{\text{Se}} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} = - 1.3402$$

$$t_{t_{e0}, 0.025, 5} = - 2.571$$

Por lo tanto no podemos rechazar H_0 , ni asegurar que el método tenga un error sistemático proporcional.

Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_a: \alpha \neq 0$$

Si t calculada es menor que t teórica podemos rechazar H_0 y asegurar con un 95 % de confianza que el método tiene un error sistemático constante por defecto.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - \alpha}{\text{Se}} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = - 0.0635$$

$$t_{t_{e0}, 0.025, 5} = - 2.571$$

Por lo tanto no podemos rechazar H_0 , así que podemos considerar que el método es exacto.

4.2 Análisis estadístico de la exactitud del método de tolbutamida en plasma humano utilizando estándar interno.

De la gráfica No. 39, se tiene una función lineal:

$$Y = \beta X + \alpha$$

Donde β es la pendiente de la recta y α es la ordenada al origen.

$$\begin{aligned} \Sigma X_i &= 193.0000 & \Sigma X_i^2 &= 13,255.0000 & \bar{X} &= 27.57143 \\ \Sigma Y_i &= 199.1093 & \Sigma Y_i^2 &= 13,849.8485 & \bar{Y} &= 28.44420 \\ \Sigma X_i Y_i &= 13,536.6295 \end{aligned}$$

$$b = \frac{\Sigma X_i Y_i - \frac{\Sigma Y_i \Sigma X_i}{n}}{\Sigma X_i^2 - \frac{(\Sigma X_i)^2}{n}} = 1.01427$$

$$a = \frac{\Sigma Y_i - b \Sigma X_i}{n} = 0.47943$$

$$S_{xx} = n \bar{X}^2 - (\Sigma X)^2 = 55,536.0000$$

$$S_{yy} = n \bar{Y}^2 - (\Sigma Y)^2 = 57,304.3938$$

$$S_{xy} = n \bar{X} \bar{Y} - (\Sigma X) (\Sigma Y) = 56,328.2957$$

$$S_e^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n (n-2) S_{xx}} = 4.9286$$

$$S_e = 2.2200$$

Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la recta:

$$H_0: \beta = 1$$

$$H_a: \beta \neq 1$$

Si t calculada es mayor que t teórica, se rechaza H_0 y se concluye que el método tiene un error sistemático por exceso.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - \beta}{\text{Se}} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} = 0.57239$$

$$t_{\text{teó}, 0.975, 5} = 2.571$$

Por lo tanto no hay bases para rechazar H_0 , así que puede considerarse que el método no tiene errores sistemáticos proporcionales.

Prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_a: \alpha \neq 0$$

Si t calculada es mayor que t teórica se rechaza H_0 , lo cual indica con un 95 % de confianza que el método tiene un error sistemático constante.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - \alpha}{\text{Se}} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = 0.4420$$

$$t_{\text{teó}, 0.975, 5} = 2.571$$

Por lo tanto no tenemos bases suficientes para rechazar H_0 , así que se concluye que el método no tiene errores sistemáticos constantes, es decir, que es exacto.

Apéndice V

5.1 Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de Tolbutamida relativo a estándar externo²⁰.

Modelo estadístico de factores anidados

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

D = Día

A = Analista

F.V.	P.S.	g.l.	Suma de Cuadrados	S.C.M.	F. calc.
A _i	i-1	1	$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} - \frac{Y_{..}^2}{ijk} = 0.00025$	0.00025	0.0017
D _{j(i)}	(j-1)i	2	$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 4.5649$	2.28244	15.7183
E _{k(ij)}	(i-1)ij	8	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} = 1.1617$	0.14521	

$$\frac{\sum Y_{i.}^2}{jk} = 1,054.2775 \qquad i = 2$$

$$\frac{\sum Y_{.j}^2}{ik} = 1,054.9934 \qquad j = 2$$

$$\frac{Y_{..}^2}{ijk} = 1,054.2750 \qquad k = 3$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{k} = 1,058.8424$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 1,060.0041$$

$$S.C.M. = \frac{S.C.}{g.l.}$$

5.2 Análisis estadístico de la reproducibilidad del método de Tolbutamida relativo a estándar interno.

Modelo estadístico de factores anidados.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

D = Día

A = Analista

F.V.	P.S.	g.l.	Suma de Cuadrados	S.C.M.	F. calc.
A _i	i-1	1	$\frac{\sum Y_{i..}^2}{jk} - \frac{Y_{...}^2}{ijk} = 0.20365$	0.26365	0.5292
D _{j(i)}	(j-1)i	2	$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{jk} = 6.5553$	3.27763	8.5168
E _{k(ik)}	(k-1)ij	8	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} = 3.0787$	0.38484	

$$\frac{\sum Y_{i..}^2}{jk} = 1,136.0840$$

$$i = 2$$

$$\frac{\sum Y_{ij.}^2}{ik} = 1,136.3806$$

$$j = 2$$

$$k = 3$$

$$\frac{Y_{...}^2}{ijk} = 1,135.8803$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} = 1,142.6393$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 1,145.7180$$

$$S.C.M. = \frac{S.C.}{g.l.}$$

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1) Hartving, P., Fagerlund, Ch., Electron-capture gas chromatography of plasm sulphonylureas after extractive methylation, *J. of Chrom.*, 181: 17-24, 1980.
- 2) Hill, R.E. and Crechiolo, J., Determination of serum tolbutamide and chlorpropamide by high-performance liquid chromatography, *J. of Chrom.*, 145: 165-168, 1978.
- 3) Nation, R.L., Geoffrey, W., Simple, rapid and micro high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tolbutamide and carboxitolbutamide in plasm, *J. of Chrom.*, 146: 121-131, 1978.
- 4) Hill, H.M. and Chamberlain, J., Determination of oral antidiabetic agents in human body fluids using high-performance liquid chromatography, *J. of Chrom.*, 149: 349-358, 1978.
- 5) Maeda, T. and Yamaguchi, T., Gas chromatography determination of the hipoglycaemic agents gliclizide in plasm, *J. of Chrom.*, 223: 357-363, 1981.
- 6) Tsuji, GLC and HPLC determination of therapeutic agents. Part. 3, New York, Ed. Marcel Dekker, 1978, Cap. 29.
- 7) Uihlein, M. and Sistovaris, N., High-performance liquid column and thin layer chromatographic determination of human serum glybenclamide at therapeutic levels., *J. of Chrom.*, 227: 93-101, 1982.

- 8) Kimura, M., Kobayashy, K., Determination of gliclazide in human serum by high performance liquid chromatography using an anion-exchange resin., J. of Chrom., 183: 467-473, 1983.
- 9) Adams, W.J., Determination of glyburide in human serum by liquid chromatography with fluorescence detection., Anal. Chem. 54: 1287-1291, 1982.
- 10) Wahlin-Boll, E. and Melander, A., High-performance liquid chromatographic determination of glipizide and some other sulphonylurea drugs in serum., J. of Chrom. 164: 541-546, 1979.
- 11) Welling, P.G., Patel, R.B., Bioavailability of tolazamide from tablets comparison of in vitro and in vivo results., J. of Pharm. S., 71: 1259-1263, 1982.
- 12) Snyder, L.R. and Kirkland, J.J., Introduction to Modern Liquid Chromatography 1^a Ed., New York, John Wiley & sons, INC.,
- 13) Snyder, L.R., and Kirkland, J.J., Introduction to Modern Liquid Chromatography 2^a Ed., New York, John Wiley & sons, INC., 1979, Cap. 6 y 7.
- 14) Karger, B.L., Snyder, L.R., Horvath, C., An Introduction to Separation Science, New York, John Wiley & sons, INC., 1973, Cap. 10.
- 15) Simpson, C.F., Solute-solvent interactions on the surface of reversed phases., J. of Chrom., 197: 11-20, 1980.

- 16) Horvath, C., Melander, W., Liquid Chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography., J. of Chr. S., 15: 393-404, 1977.
- 17) Nahum, A., Horváth, C., Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases., J. of Chrom., 203: 53-63, 1981.
- 18) Bij, K.E., Horvarth, C., Melander, W., Nahum, A., Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases., J. of Chrom., 203: 65-84, 1981.
- 19) Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica 6ª Ed., México, Ed. Médica Panamericana, 1982, 1472-1480.
- 20) Massart, D.L., Dijkstra, A. and Kaufman, L., Techniques and instrumentation in analytical chemistry, I. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures., Elsevier Scientific publishing company, 1978, pp 39-128, 143-156.