

24
Reje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO POR CROMATO-
GRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESO-
LUCION PARA LA DETERMINACION DE
LEVODOPA Y BENSERAZIDA EN
CAPSULAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
LETICIA AVILA GONZALEZ



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS DE CONTROL
ANALITICO Y EVALUACION DE CALIDAD (AREA QUIMICA) DEL CENTRO DE
INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN***

CON TODO RESPETO, CARIÑO Y GRATITUD

A MIS PADRES

MIGUEL Y MA. DE JESUS

POR SU AMOR, CONFIANZA Y COMPRENSION

A MI ESPOSO

EDUARDO

A MIS HERMANOS

JOSE LUIS

PEDRO MIGUEL

ALEJANDRA

MA. ESTHER

MARICELA

+ JULIO CESAR

A MIS ABUELOS

LUIS , SOFIA

POR SU APOYO Y COMPRENSION

A MIS AMIGOS

MARU

ROSY

PATY

MINER

ESTRELLA

ANDREA

ENRIQUE

CIRO

**A VICTORIA LUNA, DR. CARLOS HOYO-VADILLO POR SU COLABORACION EN LA
IMPRESION DE ESTE TRABAJO.**

POR SU COLABORACION, APOYO Y ORIENTACION

A LOS ASESORES DEL TRABAJO

Q.F.B. ARTEMISA POSADA RETANA

Q.F.I. GUADALUPE RITA ARENAS

Q.F.B. MA. DE LOS ANGELES VIDAL

***A LA Q.F.B. EUGENIA LAGARDE Y ABURTO POR TODAS LAS
FACILIDADES PRESTADAS PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO***

A TODO EL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO SECAEC (AREA QUIMICA)

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
2.1. Fundamentos de separación.....	4
2.2. Cromatografía Líquida clásica y Cromatografía Líquida.....	4
de Alta Resolución.	
2.3 Ventajas y limitaciones de la Cromatografía Líquida.....	7
de Alta Resolución.	
2.4 Mecanismos de Separación de diferentes formas de.....	8
Cromatografía Líquida.	
2.4.1 Cromatografía de fase químicamente Unida.....	9
2.5 Factores de Selección de Tipo de Cromatografía.....	10
2.6 Análisis Cualitativo, Cuantitativo.....	11
2.7 Equipo.....	19
2.8 Fase Móvil y Fase Estacionaria.....	26
2.9 Propiedades de Levodopa y Benserazida.....	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32

4. OBJETIVOS.....	34
5. HIPOTESIS.....	35
6. DESARROLLO DEL TRABAJO.....	36
7. MATERIAL Y METODO.....	38
8. RESULTADOS.....	45
9. DISCUSION.....	69
10. CONCLUSION.....	74
11. BIBLIOGRAFIA.....	75

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION, PARA LA DETERMINACION DE LEVODOPA Y BENSERAZIDA EN CAPSULAS

1. INTRODUCCION

La Levodopa y Benserazida son fármacos ampliamente utilizados, en el tratamiento del mal de Parkinson, y se expenden de manera combinada, ambos presentan una estructura química similar, contienen varios grupos funcionales que le confieren ciertas características de polaridad y basicidad que permiten utilizarlas para el diseño de algunos métodos analíticos. (18)(23)(24).

La literatura reporta métodos de cuantificación basados en el análisis Potenciométrico (26), Espectrofotométrico (FEUM)(7)(8)(13)(28) y por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (12)(16)(17) en la última edición de la FEUM la valoración de la combinación de ambos fármacos se realiza por un método Espectrofotométrico (8), por lo que se propone desarrollar un método por CLAR preciso, exacto y específico.

En la actualidad la Validación para métodos Analíticos es un requisito indispensable para el uso de ellos. La Validación de un método analítico se realiza para determinar la exactitud y establecer la variabilidad de el método desarrollado. (3)

Al realizar la validación de un método analítico, se requiere desarrollar procedimientos

experimentales que permitan evaluar: la linealidad y precisión del sistema de medición, linealidad, precisión, exactitud y especificidad del método, además de realizar el análisis estadístico necesario a los resultados de cada procedimiento.(2)(3)

Este trabajo presenta el desarrollo analítico y la validación de un método de cromatografía de líquidos de alta resolución, en fase normal para cuantificar simultáneamente a Levodopa y Benserazida en cápsulas.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La cromatografía es una técnica que permite separar aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos, comprende una familia de métodos de separación muy relacionados entre sí basados en los experimentos descritos por Day Tswett en 1897-1906.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayor parte de otros métodos físicos y químicos de separación consiste en que entran en contacto dos fases mutuamente inmiscibles siendo una de ellas estacionaria y la otra móvil, la mezcla de la muestra que se pone en contacto con la fase móvil, produce una serie de interacciones repetitivas entre la fase estacionaria y la fase móvil a medida que se desplaza por el sistema arrastrado por dicha fase móvil, las interacciones se basan en las diferencias de propiedades físicas y químicas de los componentes individuales, bajo la influencia de una fase móvil que se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Estas diferencias determinan la velocidad de migración de los componentes individuales (14)(16).

En la cromatografía de columna la fase móvil puede ser un líquido o un gas, y según el caso se denomina respectivamente "Cromatografía Líquida" y "Cromatografía de Gases", ver fig. # 1, de acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y de los mecanismos de separación es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía: Líquido-Líquido, Líquido-Sólido, de fase ligada, de intercambio iónico y de exclusión molecular.

CROMATOGRAFIA

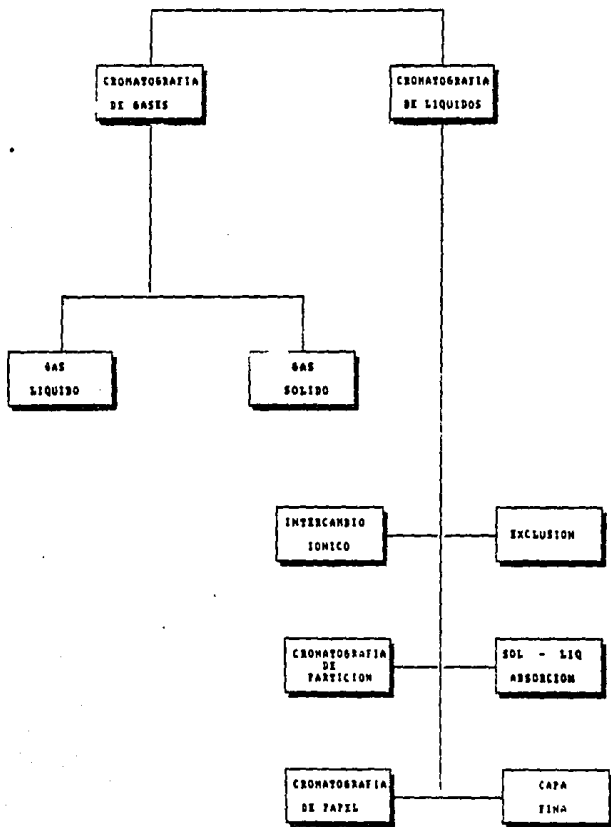


FIGURA # 1 DIVISIONES DE LA CROMATOGRAFIA (28)

2.1 Fundamentos de Separación

El primer principio que se estableció en la cromatografía líquida fueron las fuerzas de adsorción que una fase fija o estacionaria, que ocupa el interior de una columna cromatográfica constituido por lo común a base de partículas de sílica gel, ejerce sobre los distintos componentes o solutos de una fase líquida.

En definitiva, se considera genéricamente al proceso cromatográfico como un conjunto de fuerzas que compiten entre la fase móvil y la fase estacionaria de manera selectiva por un compuesto, ya sea tendiendo a fijarlo al relleno de la columna o fase estacionaria, o a recogerlo en los líquidos que fluyen en fase móvil para que junto a ellos atraviese la columna.

Estas fuerzas competitivas son de todos los tipos que resulten permitidos entre las moléculas de la sustancia que se pretende analizar cromatográficamente y las fases estacionaria y móvil

2.2 Cromatografía Líquida Clásica y Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La Cromatografía líquida en una forma que llamaremos "Clásica", consiste básicamente en lo siguiente: en una columna de vidrio, cuyo diámetro varía entre 2 y 10 cm rellena de algún material como sílice, alúmina, azúcar, etc. cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a los 200 μ . se introduce la muestra disuelta en fase móvil o disolvente por medio de una

pipeta, luego se agrega el disolvente, con el cual eluye la muestra a través de la columna, los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 g o más.

El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de fase móvil que se agrega a la columna.

El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen, uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido que muchas veces puede ser de horas e incluso días, otra desventaja es que el material de relleno a usar por lo general una sola vez se utiliza debido a que parte de la muestra se absorbe en forma irreversible.

El problema principal de este tipo de cromatografía líquida "clásica" es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en fase móvil, en general se usa alguna técnica auxiliar como por ejemplo espectrofotometría, análisis químico o simplemente un registro gravimétrico para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas.

La cromatografía de alta resolución utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas, en este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm rellenas de materiales especiales (polvos) cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μ .

Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión, por esta razón es necesario emplear sistema de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que haga fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, entre 1 y 10 mg.

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (100 atm o menos) la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión a presiones más elevadas se utilizan las válvulas de inyección.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición de líquido que sale lo que permite obtener un cromatograma similar a los obtenidos en cromatografía de gases que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra, otra ventaja de este método es el escaso deterioro de la columna a pesar de su repetido uso, si bien en algunos casos es necesario regenerarla, las múltiples ventajas de la cromatografía líquida de alta presión hacen de esta técnica analítica una de las más populares hoy en día.

Con esta técnica es usual obtener separaciones en el término de minutos e inclusive, en algunos casos en segundos, para ello se requieren columnas de alta eficiencia y sistema de bombeo de alta presión estables y reproducibles, ya que separaciones rápidas requieren flujos rápidos de fase móvil y esto a su vez requiere presiones elevadas.

Los métodos de cromatografía líquida de alta presión proporcionan también muy buena información de tipo cuantitativo siendo posible efectuar con facilidad análisis cuya precisión suele ser mejor del 1%.

Los detectores habitualmente usados proporcionan buena sensibilidad y según el tipo de muestra es posible medir con cierta facilidad hasta 10^9 g (nanogramos) algunos dispositivos muy especializados pueden detectar cantidades tan pequeñas como 10^{13} (picogramos).

Entre las ventajas de esta técnica, quizá la más importante es la diversidad de sus aplicaciones tanto a compuestos orgánicos como los inorgánicos, a muestras de peso molecular tan bajo como 18 o tan alto como varios millones, o sustancias líquidas o sólidas, iónicas o covalentes.

Desde el punto de vista práctico las únicas muestras no susceptibles de poder analizar con facilidad son las gaseosas (12)(16)(27)

2.3 Ventajas y limitaciones de la Cromatografía líquida de Alta Resolución.

Al igual que toda técnica analítica la cromatografía líquida moderna tiene algunas limitaciones, las cuales junto con las ventajas se pueden apreciar en la tabla 1

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<i>Alta velocidad de análisis</i>	<i>Instrumentación costosa</i>
<i>Alta resolución</i>	<i>No existe detector universal</i>
<i>Buena sensibilidad</i>	<i>Elevado costo de operación y mantenimiento</i>
<i>Amplio espectro de aplicaciones</i>	<i>Experiencia indispensable</i>

TABLA 1 Ventajas y desventajas de la cromatografía moderna¹²

2.4 Mecanismos de separación de diferentes formas de realizar la cromatografía líquida

Hay 5 métodos o formas de realizar la cromatografía líquida de alta resolución cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra, mediante un cambio de columna es posible utilizar cada uno de ellos Cromatografía Líquido-Sólido, Cromatografía Líquida por Exclusión, Cromatografía Líquido-Líquido, Cromatografía de fase químicamente unida y Cromatografía de intercambio iónico (12)(16)(27).

2.4.1 Cromatografía de fase químicamente unida

Esta técnica cromatográfica surgió como consecuencia de problemas asociados con la cromatografía líquido-líquido dado que su fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte, difícilmente produce deterioro alguno en la columna.

Si se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria es posible obtener diferentes tipos de selectividad dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el de cromatografía de fase normal o bien no polar como el grupo octilo (C_8H_{17}) octadecilo ($C_{18}H_{37}$) etc. en caso de cromatografía de fase inversa.

Por desgracia la cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie del soporte (generalmente partículas de sílice) es limitada y como consecuencia los tamaños de muestra separados en estas columnas son necesariamente reducidos por lo común menor de 1 mg, recientemente han sido desarrolladas columnas para cromatografía de fase reversa las cuales tienen vertebras de poliestireno-divinilbenceno, esto vence limitaciones de pH de las columnas de fase reversa basadas en sílice.

La cromatografía de fase normal es llamada de fase "NORMAL" porque los empaques polares tales como la sílice, fueron usados exclusivamente hasta la invención de empaques unidos no polares (hidrofóbicos), o fase reversa. Fases unidas normalmente son grupos funcionales polares tales como cloro o amina y algunas veces diol.

2.5 Factores de selección de tipo de cromatografía

La selección del modo y las condiciones de separación pueden ser realizadas usando algunas guías básicas (ver tabla 2).

Clasificar la muestra de acuerdo a sus propiedades físicas las cuales pueden incluir, peso molecular, solubilidad y carácter iónico.

Peso Molecular: si la muestra es mayor de 2000 se eligiría la técnica de exclusión de partícula, si es menor se seleccionara la técnica de reparto.

Solubilidad: dependiendo de la solubilidad de la muestra se seleccionara la fase móvil adecuada y en función de su peso molecular la técnica de separación idonea.

Carácter Iónico: si la muestra es menor de 2000 de PM y soluble en agua, es considerada como un electrólito y la técnica más adecuada para ser separada es cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de par iónico.

2.5.1 Selección del tipo de empaque de la columna

La selección del tipo de empaque de la columna se realiza en función de la resolución eficiencia y capacidad requerida para un tipo de muestras específicas, existen diferentes tipos de empaques usados en cromatografía de líquidos:

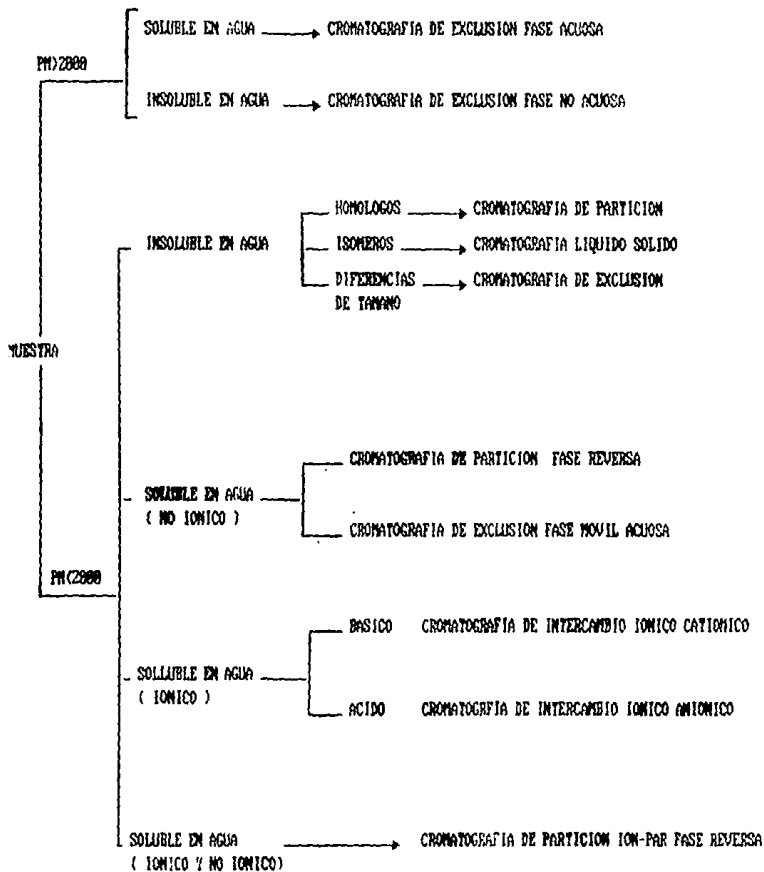


TABLA 2 : GUIA DE SELECCION DE MODO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

- *Macroporos*
- *Empaques pelliculares*
- *Empaques con micropartículas*

Macroporos: generalmente en el orden de 60 micras de diámetro, debido a que tiene capacidad alta, son baratos y fácil de empacar pero tienen muy poca eficiencia.

Empaques Pelliculares: estos consisten en esferas de vidrio cubiertas con una capa fina de fase estacionaria, son muy eficientes y fácilmente empacadas (son usadas en los guarda columnas universales), pero tienen baja capacidad de muestra y son muy caros.

Empaques con Micropartículas: es el tipo de empaques más usado en cromatografía moderna y viene en tamaños de partícula de 3,5 y 10. El diámetro más pequeño ofrece mayor eficiencia, el tamaño de 10 tiene resolución adecuada para muchas separaciones analíticas mientras que el de 5 es recomendado para una mayor demanda de separaciones. El de 5 tiene de 2-3 veces el número de platos teóricos comparado con el de 10 pero la contrapresión alcanzada es de 2 a 3 veces.

2.6 Análisis Cualitativo, Cuantitativo

El lenguaje empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental a continuación se mencionan los más utilizados:

- *Tiempo de retención (tr): Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra introduce dentro de la columna (sistema), hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico, el tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura, por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en segundos.*

- *Tiempo Muerto (to): Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma o bien de una muestra similar.*

- *Tiempo de Retención ajustado (t'r): Es la diferencia entre el tr y to es decir la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de columna.*

$$t'r = tr - to$$

- *Anchura de la base de las señales (Wb): Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces al valor de σ , o sea la dispersión de una distribución gaussiana de valores.*

Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

-Número de platos teóricos (N): Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria (N) se mide de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16 (tr/Wb)^2$$

donde tr y Wb se expresan en las mismas unidades de tiempo volumen, distancia etc. El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados por la columna.

- Altura Equivalente a un Plato Teórico (AEPT): Se representa en la siguiente expresión;

$$AEPT = L/N$$

donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, si el valor de AETP es pequeño esto se traduce en un mayor número de platos por unidad de longitud y por tanto la columna sera más eficiente.

- Velocidad Lineal Promedio de la fase Móvil (M): Se expresa por la siguiente expresión;

$$M = L/t_0$$

este parámetro de operación se utiliza cuando se representa a AEPT en función de M.

- Coeficiente de Distribución de Reparro (K): se representa por;

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra/ml de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra/ml de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia, es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y fase estacionaria en consideración y también es función de la temperatura.

- Relación de Capacidad (K');

$$K' = \frac{t_r}{t_0} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

-Resolución (R): Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos;

$$R = \frac{t_2 - t_1}{1/2(Wa + Wb)} = 2 (t_{r_2} - t_{r_1}) / Wa + Wb$$

t_1 , W_a y W_b deben ser expresados en las mismas unidades, un valor de R de 1.5 significa

t, W_a y W_b deben ser expresados en las mismas unidades, un valor de R de 1.5 significa mejores separaciones.

2.6.1 Análisis Cualitativo

La separación e identificación de fármacos en una mezcla compleja requiere en muchos casos, el uso de diferentes técnicas. La cromatografía líquida es en esencia una técnica de separación y no de identificación, y aún cuando es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, en general se requiere de una técnica no cromatográfica para determinar la identificación certera de un compuesto determinado.

2.6.2 Análisis Cuantitativo

El análisis cuantitativo de mezclas de sustancias de siempre ha sido fácil de efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos. En general, todo análisis cuantitativo puede dividirse en varias etapas:

- 1.- Muestreo
- 2.- Separación
- 3.- Integración de las señales
- 4.- Cálculos de la composición
- 5.- Interpretación estadística

La etapa 1 y 2 dependen en general de la muestra que se este analizando, la segunda etapa puede ser la fuente de multiples errores debido a los multiples factores, por ejemplo puede haber descomposición o adsorción irreversible de los componentes de la muestra en la columna ya sea por efecto de la fase móvil o del material de relleno de la columna, la sensibilidad, linealidad, y especificidad del detector son también muy importantes, el tamaño de la muestra debe estar dentro del intervalo lineal del detector, los cambios de flujo, de temperatura y fallas electronicas puede afectar las características de la respuesta del detector, por otra parte el detector puede ser completamente "ciego", a un determinado tipo de muestras o bién variar su sensibilidad para compuestos de diferente estructura, por esta razón se recomienda tener cuidado en la interpretación de los resultados.

La tercera etapa se lleva acabo por diferentes técnicas que varían en cuanto a complejidad y exactitud, el proposito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de la señal emitida por el detector en medidas que pueden relacionarse con la cantidad de muestra, las señales obtenidas en la mayoría de los detectores, aparecen en el registrador como picos de forma aproximadamente gaussiana, cuya altura o area se utiliza como una medida de tipo cuantitativo.

Existen varias técnicas manuales e intrumentales para integrar áreas de los picos:

- 1.- Altura de Pico*
- 2.- Altura por el ancho a la mitad de la altura*
- 3.- Triangulación*

4.- Planímetro

5.- Integradores de Disco

6.- Integradores electrónicos

Siendo los métodos de integración electrónica los que proporcionan datos de una precisión en muchas ocasiones superior al del mismo cromatógrafo, la señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y la concentración.

También se emplean sistemas de computación muchos de estos instrumentos proporcionan o son capaces de presentar directamente resultados o datos completos de el análisis, tales como tiempo de retención, áreas, factores de correlación, porcentajes de composición etc.

La siguiente etapa en el análisis cuantitativo es el calculo de la composición de la muestra que se efectua por los siguientes métodos:

1.- Normalización de las áreas

2.- Calibración externa

3.- Uso del patrón interno

Normalización: Cuando se sabe que el cromatograma representa la totalidad de la muestra, que todos los componentes han sido separados, y que los picos han sido completamente resueltos, la evaluación puede hacerse por normalización de áreas. Para usar este método, se mide el área de cada pico individual, que se divide entre su factor de respuesta para obtener el

área calculada del pico. La adición de valores produce el área total calculada. El porcentaje en volumen de cada componente individual se obtiene multiplicando el área individual calculada por 100 y dividiendo entre el área total calculada.

Calibración Externa: Se realiza comparando el área correspondiente a cantidades conocidas de sustancia problema con el área obtenida para la misma sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar, se procede inyectando en el cromatógrafo cantidades exactas (C_1 y C_2) del compuesto problema y se obtienen las áreas de los picos

(P_1 y P_2) correspondiente a cada una de las cantidades inyectadas, a partir de estos datos se hace un gráfico de calibración, en el que se representa la concentración en función del área del pico; a continuación se inyecta un cierto volumen de la muestra de composición desconocida, relacionado el área (X) obtenida para el compuesto objeto del análisis con el gráfico de calibración, el método es muy sensible a errores en la inyección de los patrones y de la muestra problema.

Patrón Interno: Este método es el menos susceptible a errores técnicos y compensa en algunos casos, fluctuaciones del instrumento, consiste en comparar la relación entre áreas obtenidas del compuesto problema y del patrón interno con diversas concentraciones del compuesto problema, a la muestra problema se le adiciona una cantidad conocida de una sustancia que sirve de patrón interno y se determina la relación de las áreas (muestra/patrón). Se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en el gráfico de calibración dado que se conoce la cantidad de muestra patrón.

El método de el patrón interno no requiere de inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión, ya que como se menciona evita fluctuaciones instrumentales además de muchos otros errores, como variación de la muestra, se ven compensados porque tanto la muestra como el patrón interno se analizan en las mismas condiciones.

La sustancia a utilizar como patrón interno debe reunir las siguientes características:

- Ser similar al compuesto analizado.
- Tener una respuesta similar y tr cercano al del compuesto problema.
- Tener la altura de pico similar al del compuesto problema.
- Ser inerte y no formar parte de la muestra.
- Ser compatible con la fase móvil. (12)

2.7 Equipo

En los cromatogramas de fase líquida, hay ciertas características de índole general que deben evaluarse al considerar un instrumento dado, ya sea con fines de adquisición o sobre la utilidad que debe prestar dichas características son:

a) Versatilidad; El instrumento debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente

tipo, debe prestarse a las distintas técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones tales como programación de fase móvil, recolección de fracciones de salida de la columna etc. para ello el instrumento debe estar equipado con los siguientes aditamentos:

- *sistema de operación de alta presión*
- *diversos detectores*
- *sistema para recolectar fracciones a la salida de la columna*
- *programadores de fase móvil (generadores de gradiente)*
- *controles para la temperatura de la columna y el detector*
- *controles de flujo*

b) Rápidez: Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistema de bombeo de alta presión para la fase móvil.

c) Reproducibilidad y Estabilidad: Son características esenciales si se requiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo.

El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, etc. y para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc.

d) Sensibilidad: Un buen instrumento a más de trabajar pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables, la sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

2.7.1 Reservorios

Los reservorios son recipientes de almacenamiento de la fase móvil se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte, de una capacidad de 1 y 3 litros que en la mayoría que en la mayoría es suficiente volumen para un día de operación, la toma del disolvente se hace generalmente a través de un filtro, esto tiene por objeto mover las partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna.

2.7.2 Bombas

La función de el sistema de bombeo es proveer una mezcla de solventes en la cabeza de la columna con un flujo regulado, libre de pulsos, los requerimientos del sistema de bombeo son los siguientes;

- Químicamente inerte*
- Desarrolle presiones hasta 6000 psi.*
- Libre de pulsos*

- *Reproducibilidad de la velocidad de flujo*
(aproximadamente el 1%).
- *Intervalo de volúmenes óptimo (entre 0.5 y 10 ml/min).*
- *Resistencia a los líquidos corrosivos.*
- *Facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.*

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar dos tipos de bombas: bombas mecánicas y bombas neumáticas; en lo correspondiente a las bombas mecánicas, hay de dos tipos ; las bombas recíprocas (pistón o diafragma), bombas de desplazamiento continuo.

Bombas recíprocas: Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma continua, sino más bien pulsante, la máxima presión que pueden obtener varía según el diseño pero en general es de aproximadamente 600 atm.

Este tipo de sistema de bombeo es el más comúnmente usado en CLAR una bomba recíprocante consiste de un pistón que mueve, el cual tiene el contacto directo con los solventes y es controlado mediante una especie de motor, las bombas recíprocantes simples tienen velocidades constantes en los pistones; por lo que el tiempo requerido para un golpe en el llenado es igual al tiempo requerido para un golpe de bombeo, por lo que tales bombas requieren amortiguadores extensivos de pulsos, debido a esto una bomba recíprocante simple es frecuentemente diseñada con dos pistones, donde cada uno trabaja en forma opuesta al otro.

Bombas de Diafragma: Esta es similar en operación a la bomba manejada por pistón donde el volumen de una cámara incrementa manejando el fluido por la acción de dos válvulas check, sin embargo la cámara esta sellada, y el volumen cambia lo cual ocurre como un diafragma en un lado de la cámara está presionada y el otro está saliendo, se requieren dos bombas de diafragma para generar gradiente.

Bombas de Desplazamiento Continuo: Llamadas también bombas de émbolo o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen; el líquido fluye a través de una misma abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

Bombas Neumáticas; En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimido que lo contiene.

2.7.3 Inyector

Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño puesto que son válvulas inyectoras que deben resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil, el instrumental moderno utiliza válvulas inyectoras, en las cuales la muestra

es introducida en la válvula por medio de una jeringa, desplaza el líquido y llena una porción del tubo capilar de acero la muestra se inyecta a la columna de forma tal que se invierte la disposición de la entrada y salida, de esta forma se logra inyectar a cualquier presión un intervalo amplio de tamaño de muestra con un alto grado de reproducibilidad.

2.7.4 Columnas

La columna es la parte del cromatógrafo donde se realmente se efectúa la cromatografía puesto que en ella se realiza la separación de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de soportar altas presiones, el tubo debe ser de diámetro muy preciso y de paredes internas finamente pulidas.

Las columnas se dividen en dos tipos analíticas y preparativas las analíticas se caracterizan por tener diámetros muy pequeños de 1 a 6 mm y las preparativa hasta de 1 cm.

Si se desea realizar trabajos de tipo preparativo o sea separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente para poder posteriormente utilizarlos, se debe recurrir a columnas con materiales de mayor capacidad (columnas preparativas), dichas columnas efectuaran la separación en forma más lenta y con una eficiencia menor que una columna de diámetro pequeño (columnas analíticas).

En la actualidad las columnas de cromatografía de líquidos han alcanzado un desarrollo sorprendente, siendo común alcanzar eficiencias del orden de 1000 platos teóricos por metro de columna.

Los avances en la tecnología de las columnas pueden resumirse en:

- Elaboración de partículas de tamaño muy reducido (5 μm)*
- Uniformidad de tamaño de partículas*
- Refinamiento de los procesos de relleno en las columnas*
- Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de la fase estacionaria químicamente unida.*

2.7.5 Detector

Indican la presencia y cantidad de los componentes que emergen de la columna, se dividen en destructivos y no destructivos:

Los no destructivos permiten emplear la muestra en investigaciones posteriores entre ellos están los de luz UV, y los de índice de refracción.

Cuando se trabaja con la fase móvil programada es necesario emplear detectores insensibles al cambio de composición del disolvente (detectores de luz UV y de fluorescencia), los detectores deben reunir las siguientes características:

- *Tener una respuesta selectiva*
- *Poseer una alta sensibilidad*
- *Tener de ruido bajo*
- *Guardar relación lineal con la muestra*
- *Ser insensibles al cambio de temperatura*
- *Ser compatible con programaciones de fase móvil*

2.8 Fase Móvil y Estacionaria

2.8.1 Fase móvil

La fase móvil es una de las variantes que influyen íntimamente en la separación, la naturaleza de la fase móvil empleada puede ser orgánica o acuosa, la cromatografía de intercambio iónico emplea comúnmente soluciones acuosas con un pH determinado y constante. La fase móvil debe reunir las siguientes características;

- *Disolver la muestra*
- *No degradar o disolver la fase estacionaria*
- *Tener baja viscosidad*
- *Ser compatible con el tipo de detector usado*
- *Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente en la columna,*

un valor de K' entre 2 y 10 es deseable en general.

Es esencial que la muestra se disuelva en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna, cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad.

En cromatografía de líquido-líquido, la fase estacionaria puede ser disuelta por la fase móvil, para evitarlo se satura la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su introducción al instrumento o mediante el uso de una precolumna, a través de esta precolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de la fase estacionaria.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado lo cual es particularmente importante en caso de programación de la fase móvil, puesto que el cambio de composición puede afectar el funcionamiento de el detector.

La fase móvil o disolvente debe ser de alta pureza, usualmente grado cromatográfico los

disolventes más comúnmente usados en cromatografía de líquidos de alta resolución son:

- Acetonitrilo
- Hexano
- Cloroformo
- Isopropanol
- Metanol
- Agua desionizada

Programadores de fase móvil; esta técnica que equivale a la programación de temperatura en cromatografía de gases consiste en cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis, por lo general se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía la cantidad de el disolvente más polar en la mezcla binaria.

2.8.2 Fase Estacionaria

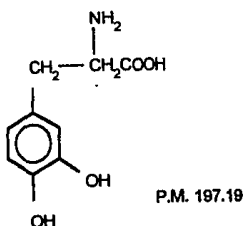
La fase estacionaria ideal es aquella que proporciona la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo.

La cantidad de muestra está directamente relacionada con la capacidad de la fase estacionaria en la cromatografía líquido-sólido, es proporcional a la superficie del adsorbente en cromatografía de líquido-líquido, al volumen que puede retener la fase estacionaria, el tamaño de partícula depende de la longitud de la columna y el diámetro.(12)(27)

2.9 Propiedades de Levodopa y Benserazida

2.9.1 Levodopa

La Levodopa presenta la siguiente estructura química



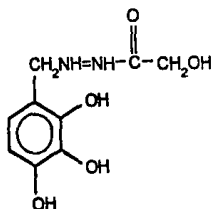
Se presenta como polvo blanco cristalino, funde con descomposición a 270°C, es soluble en agua, ácido clorhídrico diluido y ácido fórmico, insoluble etanol, cloroformo, benceno y acetato de etilo.

FARMACOLOGIA: Los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson se producen a consecuencia del agotamiento de la dopamina en el cerebro. A diferencia de la dopamina, la levodopa atraviesa la barrera hematoencefálica y mediante una conversión enzimática se transforma en dopamina.

ESTUDIOS CLINICOS: Dado que la dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica cuando se administra en forma sistémica, no tiene efectos terapéuticos en el parkinsonismo. Sin embargo, la Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), el precursor inmediato de la dopamina es transportada al encéfalo por el sistema transportador de grandes aminoácidos neutros y pasa al tejido estrial donde es descarboxilada produciendo dopamina.

2.9.2 Benserazida

La Benserazida presenta la siguiente estructura química



P.M. 257.25

Es un sólido cristalino de color blanco, con punto de fusión de 95°C altamente soluble en agua es inestable en medio neutro, alcalino o fuertemente ácido.

FARMACOLOGIA: Su actividad farmacológica es como inhibidor de descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, es incapaz de penetrar en el SNC. disminuye en gran medida la descarboxilación de la Levodopa en los tejidos periféricos, lo cual permite que una mayor proporción de este agente alcance los receptores del neostriatum.

La Benserazida inhibe la descarboxilación periférica de la Levodopa, disminuyendo los efectos secundarios y haciendo que haya más Levodopa disponible para su transporte hacia el cerebro. Las concentraciones plasmáticas de levodopa son más elevadas y su vida media es más prolongada después de la administración concurrente con un inhibidor de la descarboxilasa que cuando se administra sola.

ESTUDIOS CLINICOS: *Varios estudios clínicos han demostrado claramente las ventajas de la terapéutica combinada de un inhibidor de la descarboxilasa y levodopa.*

Estos resultados pueden resumirse como sigue: la dosis óptima efectiva de levodopa puede ser reducida en un 75%, se eliminan en gran medida las náuseas y los vómitos debidos a la estimulación de receptores dopaminérgicos en el centro emético bulbar. También se disminuyen o se previenen los efectos secundarios cardiacos , la dosificación efectiva de levodopa puede alcanzarse más rápidamente durante la terapéutica inicial ya que se reduce la necesidad de desarrollar tolerancia a los efectos periféricos de la dopamina.(10)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Síndrome de Parkinson es una enfermedad que en la actualidad tiene un alto índice de incidencia, uno de los tratamientos consiste en la administración de la combinación de Levodopa y Benserazida, la cual es usada porque la Levodopa como tal es prácticamente inactiva desde el punto de vista farmacológico, aproximadamente el 95% de La Levodopa administrada por vía oral experimenta descarboxilación en la circulación periférica convirtiéndose en Dopamina que no atraviesa la barrera hematoencefálica para evitar esta biotransformación se administra junto con la Benserazida que actúa como inhibidor periférico de la enzima dopa descarboxilasa responsable de la conversión de Levodopa en Dopamina además que incrementa su absorción intestinal, realza la concentración plasmática de Levodopa, facilita el paso de esta al cerebro y como consecuencia altera su distribución intracerebral por lo que se requiere de una menor cantidad de Levodopa para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

La combinación de Levodopa y Benserazida se usa en la proporción de 4 a 1 en la presentación de cápsula, en la que es más baja la concentración de uno de ellos y además como presentan características físico-químicas muy parecidas, se plantea el problema analítico de como cuantificarlos.

La literatura reporta métodos de cuantificación basados en el análisis Potenciométrico (USP), Espectrofotométrico (FEUM), y por cromatografía de líquidos (13)(15) no oficiales.

Las características más importantes que se utilizan para efectuar su separación a partir de la forma farmacéutica son estructura química, grupos funcionales, solubilidad, coeficiente de

partición, pH, fuerza iónica, que son muy parecidas en ambos fármacos, la solución a este problema es introducir otros elementos que permitan identificar y cuantificar estos fármacos, una de las técnicas que cuenta con estos requisitos es la cromatografía de líquidos de alta resolución por lo cual se plantea desarrollar un método cromatográfico utilizando una columna de fase normal de polaridad media como lo es la columna CN-10 que está provista de fase estacionaria de polaridad media.

Y una fase móvil polar que proporcione el medio adecuado para lograr alcanzar una excelente selectividad hacia compuestos que contengan dobles enlaces provenientes de anillos aromáticos (cíclicos o alicíclicos), electrones n del grupo amino por la interacción con el triple enlace del grupo nitrilo de la fase estacionaria. Que nos permita hacer la determinación cuantitativa de los dos principios activos simultáneamente.

4. OBJETIVOS

4.1 Seleccionar las condiciones instrumentales

Como son columna, fase móvil, velocidad de flujo, lambda de detección, volumen de inyección, para la separación e identificación y cuantificación de los dos principios activos Levodopa y Benserazida dentro de una misma formulación (cápsulas).

4.2 Realizar la Validación del método desarrollado

Determinar los parámetros de validación establecidos para métodos analíticos cromatográficos como son linealidad del sistema, precisión del sistema , linealidad, precisión, exactitud y especificidad del método, estabilidad de la muestra.

5. HIPOTESIS DE TRABAJO

Dadas las características estructurales de la Levodopa, que es un compuesto (que posee en su estructura varios grupos funcionales importantes como amino , grupo ácido carboxílico, varios grupos -OH, y un anillo aromático), y las características estructurales de la Benserazida (que posee grupos funcionales como -OH, amida y un anillo aromático), que les confieren un carácter moderadamente polar a ambos.

Se espera que se puedan separar por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando una columna de polaridad media como lo es la columna CN-10 que está provista de de una fase estacionaria de polaridad media.

Se obtendrá una excelente separación de ambos compuestos al utilizar una fase móvil polar, que dará el medio adecuado para lograr alcanzar una excelente selectividad hacia compuestos que contengan dobles enlaces provenientes de anillos aromáticos, grupos amino y amida, dada la interacción con el triple enlace del grupo nitrilo de la fase estacionaria. Siendo identificados por un detector UV.

6. DESARROLLO DEL TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló con la siguiente secuencia:

- a) Búsqueda de la bibliografía relacionada a los fármacos*

- b) Selección de de la técnica de análisis más adecuada para la identificación, separación y cuantificación simultánea de los dos fármacos.*

- c) Verificación del funcionamiento óptimo del equipo por medio de una rutina de diagnóstico.*

- d) Selección de la columna que observe mejor separación de los fármacos.*

- e) Selección de la fase móvil más óptima para la separación de los fármacos.*

- f) Selección de la longitud de onda máxima de detección con la fase móvil a utilizar.*

- g) Determinación de los parámetros de validación de métodos analíticos cromatográficos (linealidad del sistema, precisión del sistema, linealidad, precisión, exactitud del método).*

h) Determinar la estabilidad de la muestra.

6. MATERIAL Y METODO

7.1 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos de Alta resolución Varian 5000 con detector UV-VIS
- Columna con Micropack CN-10 empacada con sílica gel de 10 μ , longitud 30 cm. y 4 mm de diámetro interno.
- Columna con Micropack CH-10 empacada con sílica gel de 10 μ , longitud de 30 cm y 4 mm de diámetro interno.
- Microbalanza electrónica sartorius 4303 MP 6
- Ultrasonido Branson SA_M B-52
- Equipo de filtración millipore

7.2 Material

- Matraces volumetricos de 25 y 50 ml
- Pipetas volumetricas de 5 ml
- Embudos de filtración talle corto
- Buretas de 10 ml
- Vasos de precipitado de 50,100 y 250 ml
- Filtros Millipore FH y HA
- Filtros Millex HV

- *Papel filtro Whatman nº 42*

7.3 Reactivos

- *Acetonitrilo (grado cromatográfico)*
- *Acido Acetico Glacial (grado analítico)*
- *Agua Deionizada*
- *Clorhidrato de Benserazida (estándar secundario)*
- *Levodopa (estándar secundario)*
- *Cápsulas (Madopar)*

7.4 Preparación de Soluciones

7.4.1 Fase Móvil

Preparar una solución de ácido acético glacial 10 :1000 (solución A) de la solución anterior tomar 920 ml y mezclarlos con 80 ml de acetonitrilo (solución B).

Fase móvil (FM.) a utilizar, finalmente mezclar 600 ml de la solución A y 400 ml de la solución B, filtrar la mezcla final y la solución B por filtro HF, la solución A por filtro HA, degasificar las soluciones por 15 min con agitación por barra magnética.

7.4.2 Solución patrón de Levodopa

Pesar 21.87 mg de estándar secundario de Levodopa, pasar a un matraz volumetrico de 50 ml, disolver en fase móvil, agitar por 15 min y llevar al aforo con fase móvil.

7.4.3 Solución patrón de Clorhidrato de Benserazida

Pesar 6.23 mg de estándar de clorhidratode Benserazida en la microbalanza, pasar a un matraz volumetrico de 50 ml, disolver en fase móvil, agitar por 15 min y llevar al aforo con fase móvil.

7.4.4 Solución Estandar

Tomar 5 ml de la solución patrón de Levodopa y 5 ml de la solución patrón de clorhidrato de Benserazida transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml y aforar al volumen con fase móvil.

7.5 Metodología

a) Selección de la longitud de onda máxima

Utilizando la (s) fase móvil seleccionada como disolvente realizar un barrido del espectro de absorción UV-VIS de ambos fármacos, a una concentración de 50 y 100 µg/ml.

b) Selección de la columna que observe mejor separación de los fármacos.

Preparar las siguientes soluciones: levodopa 100 mg/ml, benserazida 100 mg/ml, mezcla de los dos fármacos 1:1, disolver en la fase móvil seleccionada, filtrar por filtros millex HV las soluciones antes mencionadas.

Determinación de el tiempo de retención: Utilizando la columna a evaluar realizar un duplicado de inyecciones de las soluciones antes mencionadas (manteniendo constantes los siguientes parametros velocidad de flujo, fase móvil, volumen de inyección y lambda de detección).

Realizar las diluciones correspondientes a alcanzar una respuesta de pico satisfactoria para los dos fármacos, considerando la proporción en que se encuentran en la formulación.

c) Selección de la fase móvil óptima para la separación de los fármacos.

Manteniendo los siguientes parámetros constantes volumen de inyección, velocidad de flujo, columna, lambda de detección.

Realizar el siguiente procedimiento:

Cambiar la proporción de la fase móvil de acuerdo a la resolución de los picos obtenida.

Cada vez que se realice un cambio de proporción en la fase móvil, se dara u la columna

un tiempo mínimo de 15 min de acondicionamiento.

La proporción adecuada para ir modificando la fase móvil es de 5% en 5% con pruebas previas entre las proporciones de fase para evitar que haya cristalización de algunos de los componentes de la fase móvil dentro de la columna.

Una vez encontradas las condiciones instrumentales óptimas para la evaluación de los fármacos se realizara la validación del método desarrollado realizando el siguiente procedimiento:

a) Especificidad del Método

Identificar las respuestas de los activos, excipientes (en caso de tenerlas) y otras sustancias auxiliares. Analizar placebos del producto con el método propuesto. En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebo "añadido" de estos y la sustancia de interés y se analizan con el método propuesto.

b) Estabilidad de la muestra

Se procedera a analizar una misma muestra de acuerdo al método desarrollado a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 min y a las 2, 4, 6, 24 hrs. después de haber preparado la muestra.

1) Linealidad del sistema de medición

Se determina, construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos tres diluciones y haciendo el análisis por triplicado.

b) Precisión del sistema de medición

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

c) Linealidad del método

Se determina con placebos adicionados del principio activo (placebos adicionados), cada uno de manera independiente cuando menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100% realizando los análisis por triplicado de cada concentración.

c) Exactitud al 100%

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el 100% del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

d) Precisión (REPRODUCIBILIDAD)

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días y por triplicado cada muestra. Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

8. RESULTADOS

8.1 Selección de la longitud de onda máxima.

Al iniciarse el desarrollo del método se procedió a seleccionar la longitud de onda máxima de ambos fármacos encontrándose los siguientes resultados:

FASE MOVIL	LAMDA DE DETECCION PARA LEVODOPA	LAMDA DE DETECCION PARA BENSERAZIDA
<i>Mezcla de ácido acético 1%, con acetonitrilo (92 - 8)</i>	230 nm	228 nm
<i>Mezcla de ácido acético 1%, con acetonitrilo (84 - 16)</i>	230 nm	228 nm

CUADRO 1 Determinación de longitud de onda máxima para Levodopa y Benserazida en diferentes fases móviles

8.2 Selección de la Columna

De acuerdo a la bibliografía consultada las columnas recomendadas para la separación de compuestos moderadamente polares como lo son Levodopa y Benserazida, fueron la MCH-10 y CN-10, ambas columnas fueron evaluadas usando varias fases móviles (incorporando ácido acético al 1% y acetonitrilo) la composición de la fase móvil óptima y la velocidad de flujo fueron establecidas para cada columna, siendo la columna CN-10 la que mejor separación de los fármacos logra.

Las condiciones cromatograficas definidas en este método fueron las siguientes :

COLUMNA	<i>CN-10 Micropacak, longitud</i>	<i>30 cm</i>	<i>4 mm</i>
	<i>empacada con sílica gel 10 μ</i>		
FASE MOVIL	<i>Mezcla de ácido acético al 1% en la proporción de 60:40 con acetonitrilo.</i>		
VELOCIDAD DE FLUJO	<i>1.8 ml/min</i>		
ATENUACION	<i>256</i>		
LAMBDA DE DETECCION	<i>230 nm</i>		
VELOCIDAD DE LA CARTA	<i>0.5 mm/min</i>		
VOLUMEN DE INYECCION	<i>Levodopa 35, Benserazida 10 μg/50 μl</i>		

CUADRO 2 *Condiciones instrumentales encontradas para la columna CN-10*

8.3 Evaluación del tratamiento de la muestra

Al establecer el tratamiento de la muestra los parámetros más importantes fueron, tiempo de agitación de la muestra y tipo de papel filtro. Los resultados son los siguientes: Se evaluaron diferentes tipos de papel filtro whatman, encontrándose que el papel whatman del # 42 y los filtros millex HV ofrecen mayor rapidez y eficiencia en el filtrado, en lo correspondiente al tiempo de agitación el cuadro n° 3 muestra los resultados obtenidos.

TIEMPO DE AGITACION (min)	% DISUELTO	
	LEVODOPA	BENSERAZIDA
5	85	80
10	90	90
15	100	100

CUADRO n° 3 Evaluación del tiempo de agitación de la muestra.

El procedimiento establecido para la muestra fue el siguiente

Determinar el peso promedio de no menos de 20 cápsulas, pesar la cantidad de polvo equivalente a 21.87 mg de Levodopa y 6.23 mg de clorhidrato de benserazida, transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver con 20 ml de fase móvil agitando por 15 min llevar al aforo con fase móvil, filtrar a través de papel whatman # 42, tomar una alícuota de 5 ml del filtrado, transferir a un matraz volumétrico de 25 ml diluir con fase móvil filtrar a través de filtro millex H.V. inyectar por duplicado.

8.4 Validación del Método

Utilizando las condiciones instrumentales antes mencionadas se realizó la validación del método desarrollado. los resultados son los siguientes:

8.4.1 Precisión del sistema

El cuadro 4 presenta los datos obtenidos al evaluar la precisión del sistema, la variabilidad establecida en las áreas de una muestra estándar de Levodopa-Clorhidrato de Benserazida.

CRITERIO

$$CV \leq 1.5\%$$

Como el coeficiente de variación es menor de 1.5 % en ambos casos, para Levodopa 0.02793 % y para Benserazida 0.06260 % se considera que el sistema de medición es preciso.

DETERMINACION	AREA PARA LEVODOPA	AREA PARA BENSERAZIDA
1	0.9720	0.3848
2	0.9717	0.3849
3	0.9719	0.3839
4	0.9713	0.3845
5	0.9715	0.3843
6	0.9719	0.3847
	$X = 0.97170$	$X = 0.38460$
	$D.E. = 0.00027$	$D.E. = 0.00024$
	$C.V. = 0.02793$	$C.V. = 0.06260$

CUADRO n° 4 Valores encontrados en la precisión del sistema

8.4.2 Linealidad del sistema

Los resultados que se obtuvieron al evaluar la linealidad del sistema se presentan en los cuadros n° 5 y 6 , las figuras 1 y 2 sus gráficas correspondientes y la tabla I y II el análisis de varianza.

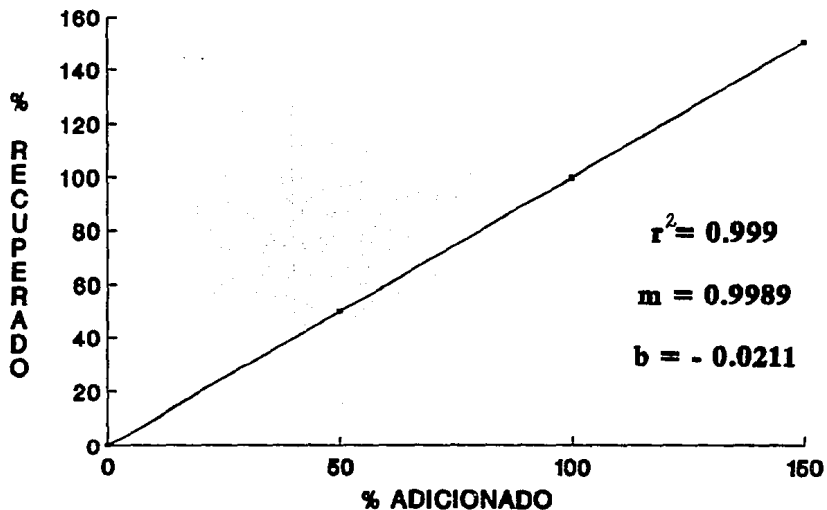
CRITERIO

- A) *La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa. ($F_{cal} \geq F_{crit}$ existe una relación altamente significativa, $F_{cal} \leq F_{crit}$ no existe falta de ajuste).*
- B) *La ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración - propiedad medida, debe ser estadísticamente igual a cero.*
- C) *El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.*

<i>Cantidad adicionada</i> <i>X (µg/200 µl)</i>	<i>Propiedad medida</i> <i>Y (area)</i>
17.5	0.4858
17.5	0.4952
17.5	0.4830
35.0	0.9716
35.0	0.9686
35.0	0.9257
52.5	1.4574
52.5	1.4342
52.5	1.4532

CUADRO n° 5 Valores encontrados en la linealidad del sistema para levodopa

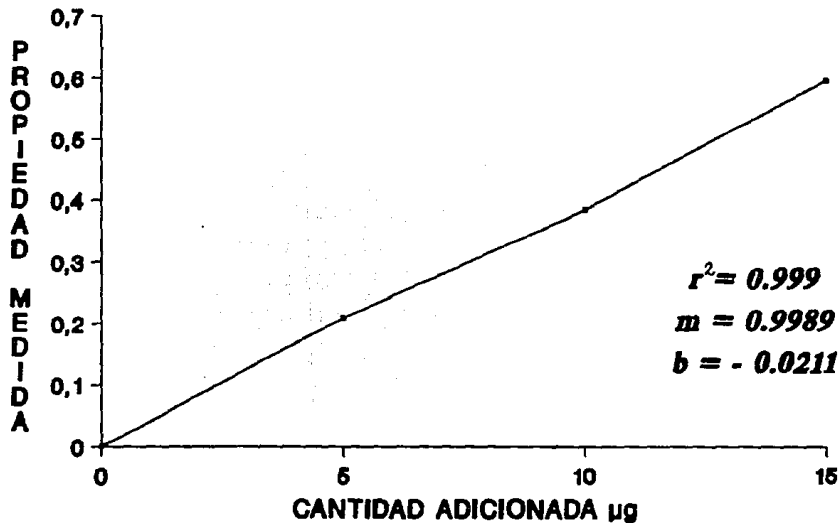
LINEALIDAD DEL METODO LEVODOPA



<i>Cantidad adicionada</i> <i>X ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)</i>	<i>Propiedad medida</i> <i>Y (area)</i>
5	0.2050
5	0.2000
5	0.2070
10	0.3848
10	0.3749
10	0.3838
15	0.5767
15	0.5947
15	0.5932

CUADRO n° 6 valores encontrados en la linealidad del sistema para Benserazida

LINEALIDAD DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE BENSERAZIDA



FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{ca}	F_{ca}
REGRESION	1	1.4194	1.4194	231091	12.54
ERROR DE REGRESION	7	4.29×10^3	6.1410×10^4	-----	----
FALTA DE AJUSTE	1	2.59×10^3	2.59×10^4	4.11	5.99
ERROR PURO	6	1.70×10^3	2.84×10^4	-----	----

TABLA I Tabla de Análisis de la Varianza para evaluar la linealidad del sistema de medición en Levodopa.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}	F_{crit}
REGRESION	1	0.2265	0.2265	16443.4	12.54
ERROR DE REGRESION	7	9.64×10^4	1.37×10^4	-----	-----
FALTA DE AJUSTE	1	8.71×10^4	8.71×10^4	5.85	5.99
ERROR PURO	6	9.35×10^3	1.55×10^3	---	---

TABLA II Tabla de Análisis de la Varianza para evaluar la linealidad del sistema de medición en Benserazida.

En ambos fármacos se tiene que el valor de la F_{cal} es mayor que F_{crit} , para levodopa $2310.91 \geq 12.54$ y para benserazida $16443.46 \geq 12.54$, lo que establece que existe linealidad del sistema de medición, que se observa en la relación altamente significativa entre la concentración y el área obtenida, que muestra una línea recta en la figura 1 para levodopa y en la figura 2 para benserazida.

Como el valor de $F_{\text{rec}} \leq F_{\text{adm}}$ para levodopa es

$4.11 \leq 5.99$ y para benserazida $5.85 \leq 5.99$ no existe falta de ajuste en la relación lineal simple concentración- propiedad medida lo cual se comprueba con el valor de R^2 que es de 0.9992 para Levodopa y de 0.9995 para Benserazida.

Para comprobar que la ordenada al origen (B) es estadísticamente igual a cero se calculo el intervalo de confianza :

$$IC (B) = - 0.0144 \text{ a } 0.0077 \text{ para levodopa}$$

$$IC (B) = - 0.0224 \text{ a } 0.0011 \text{ para benserazida}$$

ambos intervalos incluyen al cero.

8.4.3 Linealidad del Método

Los cuadros 7 y 8 presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del método, la figura 3 y 4 sus gráficos correspondientes y las tablas III y IV las tablas de análisis de varianza.

CRITERIO

A) La relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser altamente significativa ($F_{\text{rec}} \geq F_{\text{adm}}$,

$$F_{\text{rec}} \leq F_{\text{adm}}).$$

B) La ordenada al origen de la relación lineal simple de la cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.

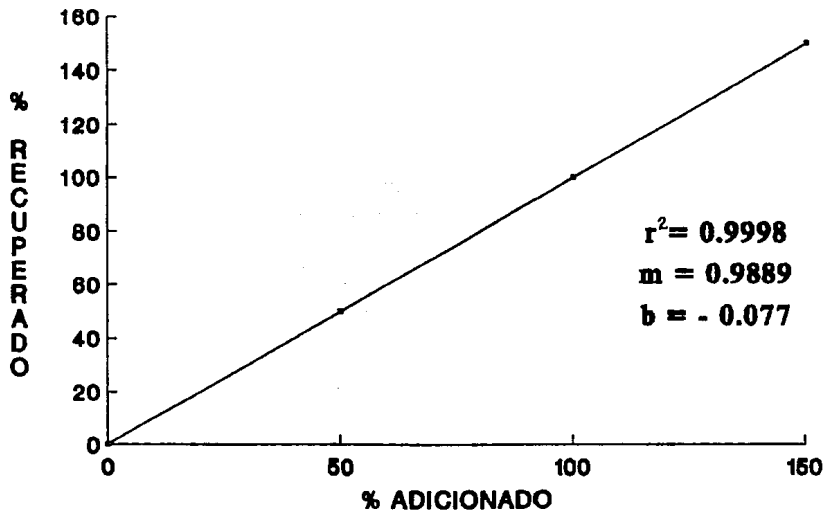
C) La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno.

D) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de la cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

<i>Cantidad adicionada</i> (%)	<i>Cantidad recuperada</i> (%)
50	49.99
50	49.97
50	50.00
100	99.99
100	100.00
100	100.00
150	150.00
150	149.97
150	149.95

CUADRO n° 7 Valores encontrados en la linealidad del método para Levodopa

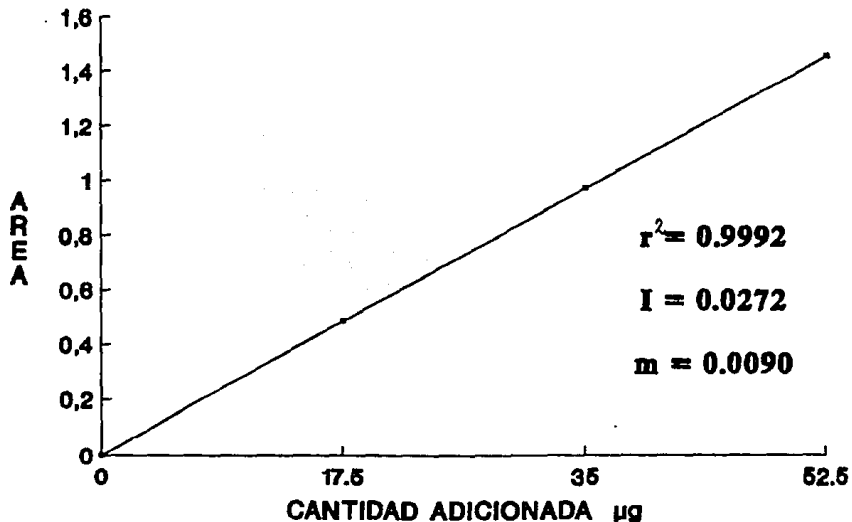
LINEALIDAD DEL METODO CLORHIDRATO DE BENSERAZIDA



<i>Cantidad Adicionada</i> (%)	<i>Cantidad Recuperada</i> (%)
50	49.98
50	50.00
50	49.69
100	99.99
100	99.87
100	100.00
150	149.99
150	149.98
150	149.92

CUADRO n° 8 Valores encontrados en la linealidad del método para Benserazida

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE LEVODOPA



FV	GL	SC	MC	F_{cal}	F_{crit}
REGRESION	1	14952.9	14952.9	2485.5	12.5
ERROR DE REGRESION	7	43.1	6.0	-----	-----
FALTA DE AJUSTE	1	43.0	43.0	5.4	5.99
ERROR PURO	6	0.047	7.95×10^{-3}	---	-----

TABLA III Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la Linealidad del Método en Levodopa.

FV	GL	SC	MC	F_{cal}	F_{cr}
REGRESION	1	1497.3	1497.3	583054.2	12.54
ERROR	7	0.1797	0.02568	-----	----
REGRESION					
FALTA DE AJUSTE	1	0.03309	0.03309	1.97×10^3	5.99
ERROR	6	0.14667	0.02444	-----	----

TABLA IV Tabla de análisis de Varianza para evaluar la linealidad del Método en Benserazida.

En los resultados obtenidos en la linealidad del método se observa que el valor de la F_{cal} es mayor que F_{cr} en los dos fármacos, para levodopa es $2485.5 \geq 12.54$ y para benserazida $583054.21 \geq 12.54$, por lo cual se considera que existe una relación altamente significativa entre el porcentaje adicionado y el porcentaje recuperado, que observa un comportamiento lineal ver la figura 3 para levodopa y figura 4 benserazida

En lo que respecta al valor de $F_{b=0}$ es menor que $F_{b=0}$ para los dos fármacos, para levodopa es $4.11 \leq 5.99$ y para benserazida

$5.85 \leq 5.99$, ambos son menores a 5.99 por lo que se considera que no existe falta de ajuste en la relación lineal cantidad adicionada -cantidad recuperada, lo que se comprueba con el valor de R^2 que es de 0.9992 para Levodopa y de 0.9996 para Benserazida.

Para determinar si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, se calcula el intervalo de confianza :

$$IC (B) = - 0.9921 \text{ a } 0.7552 \text{ para levodopa}$$

$$IC (B) = - 0.5051 \text{ a } 0.8367 \text{ para benserazida}$$

en ambos casos el intervalo incluye $b = 0$.

Para evaluar si la pendiente es estadísticamente igual a uno se calculo el intervalo de confianza :

$$IC (M) = 0.9992 \text{ a } 1.0112 \text{ para levodopa}$$

$$IC (M) = 0.9970 \text{ a } 0.9467 \text{ para benserazida}$$

en los dos casos los intervalos incluyen a $m = 1$.

8.4.4 Exactitud del Método

El cuadro n° 9 presenta los resultados obtenidos en la exactitud del método analítico para levodopa y benserazida.

CRITERIO

La media aritmética del porcentaje recuperado debe ser estadísticamente igual a 100%

DETERMINACION	% RECUPERACION DE LEVODOPA	% RECUPERACION DE BENSERAZIDA
1	100	100
2	100.0	100
3	100.0	99.98
4	99.99	99.99
5	99.97	99.99
6	99.98	99.96
	$X = 99.99 \%$	$X = 99.98 \%$
	$D.E. = 0.01265$	$D.E. = 0.01549$
	$C.V. = 0.01260$	$C.V. = 0.01545$

CUADRO n° 9 Valores encontrados en el % de recuperación

La media aritmética de ambos fármacos es relativamente al 100% para levodopa es 99.99% y para benzerazida es 99.98% por lo que el método se considera exacto.

El intervalo de confianza para el porciento de recobro fue el siguiente :

$$IC (M) = 99.65 \% \text{ a } 100.90 \% \text{ para levodopa}$$

$IC (M) = 99.57 \% \text{ a } 100.54 \% \text{ para benserazida}$

en el intervalo se encuentra contenido el 100 % por lo que es otra manera de comprobar que el método es exacto.

8.4.5 Precisión del método

En los cuadros 10 y 11 se presentan los resultados de la evaluación de la reproducibilidad del método, efectuado en dos días diferentes y por dos analistas y las tablas V y VI el análisis de varianza.

CRITERIO

A) El coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado (métodos cromatográficos C.V. $\leq 2 \%$).

B) La reproducibilidad interanalista y la reproducibilidad interdía/analista debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición :

Si $F_{analista\ real} \leq F_{analista\ crit}$ el método es reproducible por los analistas y si $F_{día\ real} \leq F_{día\ crit}$ el método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

ANALISTA			
		1	2
DIA	1	101.3	99.64
		100.3	99.00
		99.04	100.10
	2	100.00	100.19
99.87		100.00	
101.13		101.19	
<p>F calculada para los analistas 0.0321</p> <p>F crítica para los analistas 18.51</p> <p>F calculada para los días 0.9540</p> <p>F crítica para los días 4.46</p>			

CUADRO n°10 Valores encontrados en la reproducibilidad del método para Levodopa

ANALISTAS			
		1	2
DIA	1	100.15	100.23
		100.0	99.92
		99.78	98.99
	2	100.12	100.13
		99.78	100.00
		99.99	100.22
F Calculada para los analistas 0.00260			
F crítica para los analistas 18.51			
F calculada para los días 1.0269			
F calculada para los días 4.46			

CUADRO n° 12 Valores encontrados en la precisión del método para Benserazida

FV	GL	SC	MC	F_{cal}	F_{crit}
ANALISTA	1	0.10	0.1900	0.3210	18.51
DIA	2	1.1833	0.5916	0.9540	4.46
ERROR	8	4.96	0.6200	----	----

TABLA V Tabla de análisis de varianza para la precisión del método en Levodopa

FV	GL	SC	MC	F_{cal}	F_{crit}
ANALISTA	1	0.019	3.3×10^{-4}	2.6×10^{-3}	18.51
DIA	2	1.1833	0.25333	1.0269	4.46
ERROR	8	4.96	0.9866	----	----

TABLA VI Tabla de análisis de Varianza para evaluar la precisión del método en Benserazida.

8.4.6 Especificidad del Método

Esta prueba se realizó analizando una muestra de fase móvil utilizada, una muestra degradada en medio ácido y una en medio alcalino, se encontró que el método es específico dado que no se tiene interferencia de los posibles productos de degradación ni de los excipientes comunes en esta forma farmacéutica.

9. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo del método se procedió a validar el método óptimo establecido para la separación y cuantificación de la de Levodopa y benserazida en capsulas encontrandose los siguientes resultados :

Linealidad del sistema de medición

CRITERIO

A) La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa. ($F_{real} \geq F_{crit}$ existe una relación altamente significativa, $F_{real} \leq F_{crit}$ no existe falta de ajuste).

B) La ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración - propiedad medida, debe ser estadísticamente igual a cero.

C) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

Considerando a los resultados obtenidos en las tablas I y II de análisis de varianza se tiene que los sistemas de medición de Levodopa y Benserazida son lineales (ver figuras 1 y 2

respectivamente) para ambos sistemas se observa una relación altamente significativa entre la concentración y el área correspondiente, que se verifica con el coeficiente de determinación obtenido (R_s), el cual para levodopa fue de 0.9992 y para benserazida de 0.9996 en ambos casos es mayor a 0.98 como se establece en los criterios para evaluar este parámetro.

En ambos sistemas la ordenada al origen se considera como cero porque al calcular el intervalo de confianza para la ordenada este valor ($b = 0$) está incluido en los intervalos de confianza, por lo anterior el sistema de medición resulta lineal según los criterios establecidos para su aceptación

Precisión del sistema de medición

CRITERIO

C.V. \leq 1.5 %

Se tiene que el coeficiente de variación para levodopa es de 0.0279 % y para benserazida es de 0.0626 % ambos son menores a 1.5 % como se establece en el criterio de evaluación de este parámetro, por lo cual el sistema de medición es preciso.

Exactitud del Método analítico

CRITERIO

La media aritmética del porcentaje recuperado debe ser estadísticamente igual a 100%

El método analítico es exacto para los dos fármacos porque en los dos se considera a la media aritmética como el 100 % ya que los resultados obtenidos son aproximados a este valor para levodopa es de 99.99 % y para benserazida de 99.98 % , además que en los intervalos de confianza para la media aritmética queda incluido el 100 % por lo que el método se considera exacto.

Linealidad del Método

CRITERIO

A) La relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser altamente significativa ($F_{r,cal} \geq F_{r,cr}$,

$$F_{\mu,cal} \leq F_{\mu,cr}).$$

B) La ordenada al origen de la relación lineal simple de la cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.

C) La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser

estadísticamente igual a uno.

D) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de la cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

Al realizar la evaluación de las tablas de análisis de varianza III y IV y las gráficas de las figuras 3 y 4 se deduce que el método analítico es lineal, no existe falta de ajuste a la relación lineal cantidad adicionada-cantidad recuperada y su coeficiente de determinación para levodopa es de 0.9992 y para henserazida de 0.9998 ambos mayores a 0.98 que es el establecido para definir este parámetro, lo que comprueba una relación altamente significativa.

En los intervalos de confianza para la ordenada al origen se encuentra $b = 0$ y en los intervalos de confianza para la pendiente se encuentra $m = 1$ esto corrobora que el método es lineal.

Precisión del Método

CRITERIO

A) El coeficiente de variación total debe, cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado (métodos cromatográficos C.V. $\leq 2\%$).

B) La reproducibilidad interanalista y la reproducibilidad interdfalanalista debe de satisfacer

los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición :

Si $F_{\text{analistas cal}} \leq F_{\text{analistas cru}}$ el método es reproducible por los analistas y si $F_{\text{días cal}} \leq F_{\text{días cru}}$ el método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Esta prueba se realizó con dos analistas en dos días diferentes y conforme a los resultados obtenidos en las tablas V y VI de análisis de varianza se infiere que el método es reproducible por los analistas y reproducible en distintos días por un mismo analista.

Al evaluar la precisión del método se encontró que el coeficiente de variación total para ambos fármacos es menor al 2 % establecido para métodos cromatográficos para Levodopa es $C.V. = 0.8300$ y para Benserazida $C.V. = 0.6505$, además en los valores de $F_{\text{medidas cal}}$ es menor a $F_{\text{medidas cru}}$ en ambos fármacos, para levodopa $F_{\text{medidas cal}}$ es de 0.3210 y para benserazida es de 2.60×10^3 ambos valores menores a $F_{\text{medidas cru}}$ que es 18.51, por lo que se establece que el método analítico es reproducible por los analistas y los valores de $F_{\text{días cal}}$ son menores en ambos fármacos, para levodopa es de 0.9540 y para benserazida 1.0626 ambos menores al valor de $F_{\text{días cru}}$ que es de 4.46, por lo que se establece que el método analítico es reproducible por los analistas y reproducible en distintos días por un mismo analista, por lo que se asegura que el método es preciso.

El método resultó específico para la levodopa y benserazida dado que no se encontró interferencia de los excipientes comunes en esta forma farmacéutica y de los posibles productos de degradación.

10. CONCLUSION

Se cumplieron los objetivos planteados originalmente, se desarrollo un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, que sirve para determinar simultaneamente a levodopa y benserazida en la presentación de capsúlas.

El método analítico se eligio después de realizar la evaluación de dos columnas cromatográficas y varias proporciones de fase móvil hasta que se obtuvo un método que satisficiera todos los requisistos del análisis, separación y cuantificación de la levodopa y benserazida compuestos estructuralmente similares.

Con lo que respecta a la validación, los parámetros desarrollados certifican la eficacia del método establecido, por lo cual se establece que es un método analítico preciso, exacto y lineal y es específico para levodopa y benserazida.

11. BIBLIOGRAFIA

1. A.G. GHANEKAR and V. DAS GUPA " *Applications of Paired Ion High-Pressure Liquid Chromatography to Catecholamines and Phenylephrine* " *J. Pharm Sci* September 1978 67(2) 1247-1250

2. A. MECHKOVSKI " *The validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical materials* " *who Pharm.* 15 august 1989 541 Rev. 2

3. ALCANTARA A. *Manual de Validación de Métodos Analíticos* editado por Consultorio y Servicios en Estadística Biomédica y Farmacéutica, ed 1992.

4. ANDREW SHUM, MICHAEL J. SUJE and GLENR. VAN LOON
" *Simultaneous measurement of 5- hydroxytryptophan and L- dihydroxyphenylalanine by High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection* " *J. Chromatogr. Biomed Appl.*, 228 (1982) 123-130

5. BETTO, P.; RICCIARELLO, ; GIAMBENEDETTI " *Improved high-performance Liquid - chromatography analysis with double detection sistem for L-dopa, its metabolites and Carbidopa in plasma of Parkinsonian patients under L-dopa therapy* ". *J. Chromatogr.*, 28 dec 1988, 459, 341-349 pp.

6. CIARK, M.B., " *Quantitative static Secondary-ion mass Spectrometry of molecular ions from 1 - 8 - 3,4 - dihydroxyphenylalanine (L-dopa) and indolic derivatives* ". *Anal. Chem*, is Apr. 1990 62 (8), 870-875.
7. EL - KOMMOS M. E., " *Spectrophotometric determination of some catecholamine drugs using metaperiodate* ". *J. Assoc of Anal. Chem.*, jul-aug 1990 73(4).
8. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 5ta ed México 1988
9. GARY W SCHIEFFER " *Reversed - Phase High Performance Liquid Chromatography Investigation of Levodopa Preparations II: Levodopa Determination* ". *J. Pharm Sci* octuber 1979, 68(10)
1299-1301.
10. GOODMAN; GILMAN *Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica* octava edición, editorial Médica Panamericana, Marcelo T. Alvear 2145 Buenos Aires 1991. p 461 - 476.
11. GOMEZ RALPH. B. HAGEL ROBERT. and A. MACMULLAN EDWARD *Analytical Profiles of Drug Substances. Levodopa* 20 vols.; Edited by Klaus Florey ; ed. Academinc PRESS 1976 ;
VOL 5 p 61-137.

12. HAROL H. MCNAIR Cromatografía Líquida de Alta Presión, editor Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washinton, D.C. segunda edición actualizada 1980.

13. HASSIB S.T. EL-KHITEEB, " Spectrometric determination of madopar (levodopa) capsules ". *Anal. Lett.*, feb 1990 23 (2), 255-271.

14. JOHNSON L. E., R. STEVENSON. Basic Liquid Chromatography varian

15. KOROLKOVAS A. BURCKHALTER J.H. Compendio Esencial de Química Farmacéutica Editorial Reverté S.A. 1978 246,247 p.

16. L. J. LORENZ Modern Methods of Pharmaceutical Analysis, High Performance Liquid Chromatography ; Editor Roger E. Shirmer; 3 vols.; ed. CRC Press Inc. Florida 1982, vol III 61-137

17. LUCARELLI, C.; BETTO, P.; RICCIARELLO. " Simultaneous measurement of L - Dopa (levodopa), its metabolites and carbidopa in plasma of Parkinsonian patients by improved sample pre-treatment and high - performance liquid - chromatographic determination " *J. Chromatogr.*, 6 jul 1990, 511 167-176.

18. MARTIDALE The Extra Pharmacopoeia , a Edited Jones E. F. REYNOLDS, twenty - ninth

Edition, ed the Pharmaceutical Press 1989, p 1010-1015, 1020

19. PREMEL - CABIC, A.; ALLAIN, P. " Simultaneous Liquid - Chromatographic determination of Norepinephrine, 3,4, dihydroxyphenylethylenglycol, 3,4,- dihydroxyphenilacetic acid in human plasma " .J. Chromatogr., Biomed. Appl., 29 Dec 1988,

78(1(J. Chromatogr., 434)), 187-190 pp.

20. PARIKH K.M.; POSHI, U.J. " Estimation of L-dopa from the plant *Mucuna pruriens* and its formulation using high-performance liquid chromatography (HPLC). " Indian Drugs, Mar 1990
27 (6)353-356.

21. STROOMER, A.E.M.; OVERMARS, " Simultaneous determination of acidic 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) metabolites and 5-hydroxyndole-3-acetic acid (5-hydroxyndol-3-4 acetic acid) in urine by high-performance liquid chromatography ". Clin. Chem. oct 1990, 36(10), 1834-1837.

22. T. TUS, D.C.; AUGUST, T.F., " Simultaneous high-performance liquid-chromatographic analysis of Carbidopa, Levodopa and Dopamine in urine using electrochemical detection " .
J. Chromatogr., Biomed., Appl., 14 Dec 1990,

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

99(*J. Chromatogr.*, 534)), 87-100.

23. **THE MERK INDEX** *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*; Editor Susan Budavari, eleventh edition, Published by Merck CO, Inc Rahway N. J. U.S.A. 1989 P 5244-1059.

24. **THE PHARMACEUTICAL CODEX**, eleventh edition, ed The pharmaceutical Press 1979 p 84, 490-491.

25. TSUCHIWA H.; HAYASHI. T. " *Determination of L- 3,4 dihydroxyphenylalanine (Levodopa) in blood by high- performance liquid chromatography of ter solvent extraction.* " *J. Chromatogr., Biomed Appl.*, 21 Jul 1989 83 (2(*J. Chromatogr.*, 491)), 291 - 298 pp.

26. **USP XXII THE UNITED STATES PHARMACOPEIA** *Twenty-Second revision*, ed United States Pharmacopeial Convention INC 1989, P 756-758.

27. WILLARD MERRITT DEAN SETTLE *Métodos Instrumentales de Analisis* editorial CECSA, segunda edición en español octubre de 1986. p 451 - 471.

28. YUCESOY, C. " *Simultaneous determination of Levodopa and Benserazida using difference Spectrophotometry.* " *Gaz Univ. Euezacilik Fak Derg.*, 1990 7 (1), 43-53.

29. ZUERCHER, G.; DAPRADA. " Simple automated high-performance liquid-chromatographic column-switching Technique for the measurement of dopa and 3-o-methyldopa in plasma ".

J. Chromatogr., Biomed Appl., 14 sep 1990 95(2(J.Chromatogr., 53)), 253-262.