

300627

9
2EJ



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA CUANTIFICAR
HIDROCLOROTIAZIDA EN PLASMA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MYRIAM CORTES FUENTES

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. JOSE LUIS IBARMEA AVILA

MEXICO, D. F.

1995

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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A mis padres, con todo mi amor.

**Por enseñarme con su ejemplo, a tratar
de hacer siempre bien las cosas, y a
luchar por conseguir lo que se quiere.**

**Gracias porque sé que siempre puedo
contar con ustedes**

Con cariño para mi hermana Edna

Con sincero agradecimiento para el

**CENTRO A.F. DE ESTUDIOS
TECNOLÓGICOS**

**por permitirme realizar el presente
trabajo y por su valiosa aportación
dentro de mi formación profesional.**

Mi más sincero agradecimiento al

M. EN C. SALVADOR SALADO CARBAJAL

**por su valiosa colaboración como Asesor
Externo para la realización de esta Tesis.**

A LA UNIVERSIDAD LA SALLE

**Con gratitud, al director de esta
Tesis,**

**Q.F.B. JOSE LUIS IBARMEA
ÁVILA,**

**Al Jurado designado para la revisión de
esta tesis:**

**Q.F.B. Enrique Calderón García
Q.F.B. Ma. de Jesús Ramírez Palomares
I.B.Q. Ma. Eugenia Ramírez Salgado,
Q.F.B. Carlos Martínez Aquino**

Para mis amigas de siempre :

Paty, Rosa y Adriana

Con cariño, para mi amiga Gaby

Para Gabriel

INDICE

1. Introducción
2. Generalidades
 - 2.1. Bioequivalencia
 - 2.2. Técnicas analíticas para la determinación de fármacos en fluidos biológicos
 - 2.2.1. Cromatografía
 - 2.2.1.1. Generalidades
 - 2.2.1.2. Parámetros cromatográficos
 - 2.2.1.3. Equipo utilizado para cromatografía de líquidos de alta resolución.
 - 2.2.1.4. Cromatografía de par iónico
 - 2.2.2. Tratamiento de muestras en fluidos biológicos
 - 2.2.2.1. Propiedades de algunos fluidos biológicos.
 - 2.2.2.2. Extracción líquido-líquido
 - 2.2.2.3. Extracción sólido-líquido
 - 2.3. Validación de métodos analíticos en fluidos biológicos
 - 2.3.1. Criterios de validación
 - 2.4. Monografía de Hidroclorotiazida
 - 2.4.1. Descripción
 - 2.4.1.1. Nomenclatura
 - 2.4.1.2. Fórmula condensada
 - 2.4.1.3. Fórmula estructural
 - 2.4.1.4. Apariencia
 - 2.4.2. Solubilidad
 - 2.4.2.1. Solubilidad en soluciones acuosas
 - 2.4.2.2. Solubilidad en disolventes no acuosos
 - 2.4.2.3. pKa
 - 2.4.3. Espectro Ultravioleta
 - 2.4.4. Estabilidad
 - 2.4.5. Farmacología
 - 2.4.5.1. Modo y mecanismo de acción
 - 2.4.5.2. Usos y administración
 - 2.4.5.3. Nombres comerciales
 - 2.4.6. Efectos colaterales y toxicidad
 - 2.4.7. Farmacocinética
 - 2.4.8. Métodos analíticos reportados por cromatografía de líquidos de alta resolución
3. Planteamiento del problema
4. Objetivos
 - 4.1. Objetivo general
 - 4.2. Objetivos particulares
5. Reactivos y equipo utilizado
 - 5.1. Sustancias de referencia y reactivos
 - 5.1.1. Sustancias de referencia
 - 5.1.2. Reactivos
 - 5.2. Equipo
6. Desarrollo del método

7. Validación del método

- 7.1. Especificidad
- 7.2. Exactitud y precisión
- 7.3. Función respuesta
- 7.4. Sensibilidad
- 7.5. Estabilidad
- 7.6. Recobro absoluto

8. Resultados

- 8.1. Especificidad
- 8.2. Exactitud y precisión
 - 8.2.1. Precisión interdia
 - 8.2.2. Precisión intradia
 - 8.2.3. Exactitud
- 8.3. Función respuesta
- 8.4. Sensibilidad
 - 8.4.1. Límite de detección
 - 8.4.2. Límite de cuantificación
- 8.5. Estabilidad
- 8.6. Recobro absoluto

Conclusiones

Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN.

Para que una nueva molécula con actividad farmacológica llegue a manos de un paciente bajo una forma farmacéutica, deben pasar varios años en el transcurso de los cuales se realizan una serie de estudios farmacocinéticos, toxicológicos, clínicos y tecnológicos, con el fin de garantizar que el paciente recibirá un medicamento seguro y eficaz.

En otros países, como es el caso de Estados Unidos, cuando entran en el mercado dos productos con el mismo principio activo, misma dosis e igual forma farmacéutica deberá demostrarse que el segundo producto en salir al mercado es seguro, eficaz y terapéuticamente equivalente con respecto a la formulación de la compañía que recibió primero la aprobación para poner a la venta dicho medicamento (producto innovador o producto de referencia). Esta equivalencia terapéutica, generalmente se verifica llevando a cabo un estudio de Bioequivalencia, para lo cual es esencial contar con un método analítico confiable y seguro que permita cuantificar el fármaco en el fluido biológico apropiado (orina, sangre total, plasma, suero); este método debe ser capaz de proporcionar resultados reales, los cuales puedan ser interpretados satisfactoriamente; la confiabilidad del método se fundamenta en la validación de éste.

Los aspectos que deben ser validados son especificidad, exactitud, precisión, sensibilidad, función respuesta, estabilidad y recobro absoluto.

La finalidad de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para utilizarse durante un estudio de Bioequivalencia de medicamentos.

2. GENERALIDADES

2.1 BIOEQUIVALENCIA (1)

Actualmente existen en el mercado diferentes clases de medicamentos para el tratamiento de un mismo padecimiento, los cuales producen efectos benéficos similares y casi los mismos efectos secundarios. Un mismo agente puede estar disponible en forma de diferentes sales y la sal de un fármaco en específico puede estar contenida en diferentes formas farmacéuticas, que pueden afectar la liberación del fármaco de la formulación. Es posible que una tableta o cápsula provenga de diferentes fuentes, y las únicas diferencias que existan entre ellas son los excipientes, color, cubierta y etiqueta de éstas.

La disponibilidad de formulaciones farmacéuticas provenientes de diferentes fuentes, con una etiqueta similar o idéntica es una práctica clínica que cada vez se hace más frecuente; un ejemplo es la introducción de formulaciones genéricas de un producto que se encuentran en el mercado, las cuales han perdido la protección de la patente; un segundo ejemplo es la sustitución de una formulación de un fármaco con patente protegida por otra formulación, como resultado de cambios en el proceso de manufactura.

El poner a la venta diferentes formulaciones de una mismo fármaco, proporcionado en la misma potencia, misma forma de dosificación y por la misma vía se ha convertido en un reto importante para los profesionales al cuidado de la salud, para las agencias reguladoras y para los farmacéuticos. En parte, este reto tiene que ver con aspectos económicos y con aspectos relacionados con la seguridad y eficacia de los medicamentos.

En Estados Unidos, desde 1926, se han generado diversas leyes donde se establece que para que un producto farmacéutico pueda ser aprobado y puesto a la venta, se requiere que se hayan generado previamente la información que respalde la seguridad y eficacia de las sustancias activas. En las últimas décadas, organismos regulatorios como la "Food and Drug Administration" (FDA) han permitido que una formulación sustituya a otra aun que sea necesario repetir los estudios de seguridad y eficacia, los cuales resultan muy caros y consumen mucho tiempo.

Las bases científicas para esta legislación se fundamentan en que es posible establecer estándares biofarmacéuticos, farmacocinéticos y estadísticos para documentar que una formulación de prueba es intercambiable por una formulación de referencia (innovador). Una formulación de prueba que cumple con estos criterios se denomina bioequivalente y terapéuticamente intercambiable con respecto a la formulación de referencia. Desde la década de los 70s, en los Estados Unidos estos criterios han dado origen a políticas reguladoras de la FDA que permiten la comercialización de productos genéricos. Estos criterios se aplican también cuando un producto que se encuentra en el mercado es reformulado por razones de comercialización o de manufactura.

El mecanismo mediante el cual un producto genérico puede ser comercializado es la solicitud abreviada para la venta de un nuevo medicamento (abbreviated new drug application, ANDA). Para la reformulación de un producto con patente protegida, se requiere un suplemento de la solicitud para la venta de un nuevo medicamento (new drug application, NDA)

La similitud que existe entre dos productos (producto de prueba y producto innovador) en cuanto a la documentación del producto en sí, y la documentación de su proceso de manufactura son los criterios bajo los cuales se determina que una formulación es equivalente a otra. Los criterios tomados en cuenta en la documentación del producto son que la nueva formulación contenga los mismos ingredientes activos, en la misma dosis y potencia, y que sea administrada por la misma vía que el producto innovador. Los criterios que se consideran en la documentación del proceso de manufactura son aquellos que aseguren que el producto farmacéutico posee una estabilidad, potencia y pureza conocidas y consistentes. Un requisito final para la determinación de equivalencia entre una formulación y otra, es un estudio de bioequivalencia humana in vivo, el cual tiene como finalidad

confirmar que el fármaco en ambas formulaciones, se absorbe en la misma cantidad y velocidad; esto se evita determinando los niveles del fármaco o del metabolismo en el fluido biológico seleccionado, estableciendo así si estos niveles son comparables después de la administración de cada una de las formulaciones.

2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

2.2.1 Cromatografía

2.2.1.1 Generalidades (2)

La cromatografía es una técnica de separación que ha encontrado aplicación en todas las ramas de la ciencia, y es indudablemente la técnica más común para el análisis de fármacos en fluidos biológicos. Esto se debe a que los métodos cromatográficos combinan un poderoso proceso de separación con un sistema de detección sensible y específico.

La cromatografía se basa en un sistema compuesto por dos fases inmiscibles: una fase móvil constituida por un fluido que se desplaza sobre una fase estacionaria; la fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico. La fase estacionaria puede ser un líquido soportado en un material poroso e inerte, o por la pared interior de una columna tubular, o puede también consistir en moléculas químicamente unidas a dicho material de soporte o a la pared de la columna.

Las sustancias a ser separadas poseen diferentes afinidades relativas por la fase estacionaria y por la fase móvil, de manera que una sustancia con afinidad relativamente alta a la fase estacionaria se moverá con una velocidad menor a través del sistema cromatográfico que una sustancia con una afinidad menor a ésta. Tales diferencias en velocidad de migración son las que permiten una separación física de los componentes de una muestra.

Existen cuatro mecanismos de separación (3) que dependen de la forma en que se retienen las moléculas en la fase estacionaria; estos mecanismos dan origen a cuatro métodos básicos de cromatografía de líquidos (Ver TABLA 1)

TABLA 1. Mecanismos de separación en cromatografía de líquidos.

Mecanismo de separación	de	Método cromatográfico	
líquido / líquido		Cromatografía de partición	Involucra una fase estacionaria líquida, de composición diferente a la fase móvil. Las moléculas se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria, como en una extracción líquido/líquido.
sólido/líquido		Cromatografía de adsorción	Involucra partículas de gran área superficial, donde la retención se debe a que las moléculas de la muestra son atraídas a la superficie de la partícula.
intercambio iónico		Cromatografía de intercambio iónico	La fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos junto con contraiones de carga opuesta. Los contraiones normalmente están presentes en la fase móvil en forma de sal. Las moléculas iónicas de la muestra se retienen por intercambio iónico.
Exclusión por tamaño		Cromatografía en gel.	La columna está empacada con un material con poros de cierto tamaño. Las moléculas grandes se mueven rápido a través de la columna pues son excluidas de los poros, mientras que las pequeñas son retenidas.

En la cromatografía líquido-líquido el soporte sólido está cubierto por una fase estacionaria líquida; este tipo de cromatografía puede dividirse en cromatografía de fase normal y en cromatografía de fase reversa.

La distribución relativa de los solutos entre las dos fases líquidas es lo que determina la separación. La fase estacionaria puede ser tanto polar como no polar. Si la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar, se dice que se trata de una cromatografía de partición en fase normal. En cromatografía de fase normal, la separación también puede llevarse a cabo debido a fenómenos de adsorción (fase estacionaria de sílice). Cuando la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, se trata entonces de una cromatografía de partición en fase reversa. En la fase normal, las moléculas polares se distribuyen preferentemente en la fase estacionaria y son retenidas en mayor medida que los compuestos no polares. En la fase reversa se observa lo contrario. En la actualidad se emplean extensamente fases químicamente enlazadas a la superficie del soporte sólido. Estas fases enlazadas funcionan como una fase líquida en el proceso de partición.

Otra modificación a la cromatografía líquido/líquido es la cromatografía de par iónico, que puede considerarse como una combinación de cromatografía líquido/líquido y cromatografía de intercambio iónico. Este tipo de cromatografía se describe posteriormente.

2.2.1.2 Parámetros Cromatográficos.

Al élar una muestra de una columna cromatográfica, los resultados se obtienen en forma de un cromatograma, que es la representación gráfica de la respuesta que proporciona un detector y es proporcional a la cantidad de sustancia que fluye a través del detector como una función del tiempo o del volumen(4)

Las definiciones de algunos de los parámetros más importantes en la cromatografía de líquidos se explican brevemente a continuación (5):

a) Tiempo de retención (t). Es el tiempo medido entre el momento de la inyección hasta obtenerse la máxima altura del pico de interés durante la elución. Es característico para cada compuesto en un sistema cromatográfico específico.

b) Tiempo muerto (t₀). Es el tiempo que tarda en élar un compuesto no retenido por el sistema cromatográfico.

c) Resolución (R). Representa la separación entre dos compuestos en una mezcla. La expresión para calcularla es la siguiente:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

d) Ancho del pico a la línea base (W). Es la distancia que se mide entre las líneas de extrapolación del pico al intersectarse con la línea base.

e) Ancho del pico al 5% (W_{0.05}). Es la distancia que se mide entre las líneas del pico a una altura del 5% del máximo.

f) Factor de capacidad (k'). Es la relación entre la cantidad de sustancia que se encuentra entre la fase estacionaria y la fase móvil; se relaciona con el coeficiente de partición para el soluto y se calcula por la siguiente expresión:

$$k' = (t/t_0) - 1$$

g) Número de platos teóricos (N). Se considera que una columna cromatográfica está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales denominadas platos teóricos. En cada plato teórico se lleva a cabo el equilibrio de distribución de la muestra entre las fases móvil y estacionaria y es una medida de la eficiencia de la columna analítica. Su expresión es la siguiente:

$$N = 16(t/W)^2$$

h) Distancia medida entre la bisectriz del máximo del pico y la línea izquierda del pico a una altura de 5% de la altura máxima del pico (f).

i) Factor de asimetría (T). Es el grado de "codo" o asimetría en la forma de los picos. Se calcula por:

$$T = W_{0.05} / 2f$$

- j) Retención relativa (α). Se denomina también como selectividad y es la distancia medida entre las zonas centrales de dos picos, nos indica la diferencia de afinidad de los solutos por las fases móvil y estacionaria. Se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0)$$

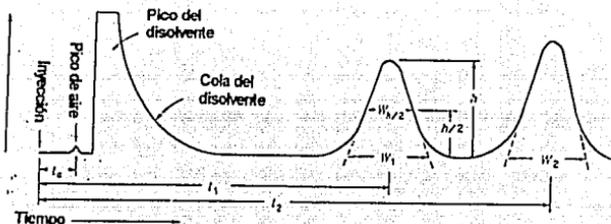


FIGURA 1. Esquema representativo de los Parámetros Cromatográficos (20).

La forma de los picos cromatográficos es influenciada por tres procesos bajo control cinético: la difusión en remolino, la difusión longitudinal y la transferencia de masas fuera del equilibrio(4). Las magnitudes de estos efectos están determinadas por variables controlables tales como la velocidad de flujo, el tamaño de partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y el grosor de la fase

estacionaria. La ecuación de Van Deemter relaciona estos fenómenos con la velocidad lineal de flujo (u) y la altura del plato (H)

$$H=A+B/u + Cu$$

donde la magnitud A se relaciona con la difusión de remolino, B con la difusión longitudinal y C con la transferencia de masa fuera del equilibrio.

Difusión de remolino.

El ensanchamiento del pico debido a la difusión de remolino se debe a la gran cantidad de trayectorias que puede encontrar una molécula en su camino a través del empaque de una columna; las longitudes de estas trayectorias no son iguales y en consecuencia los tiempos de residencia de las moléculas de la misma especie en la columna también son variables. Esta magnitud se relaciona con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.

Difusión longitudinal.

La difusión longitudinal se debe a la tendencia de las moléculas a migrar desde la porción central concentrada de una banda hacia las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este tipo de difusión puede ocurrir tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria y la magnitud de la difusión aumenta con el tiempo; en consecuencia, el grado de ensanchamiento aumenta a medida que disminuye la velocidad de flujo.

Transferencia de masa fuera del equilibrio.

Las bandas cromatográficas se ensanchan también debido a que el flujo de la fase móvil es por lo general tan rápido que no se puede alcanzar un verdadero equilibrio entre las fases. Por ejemplo, al frente de la zona donde la fase móvil encuentra fase estacionaria nueva no se logra el equilibrio en forma instantánea y el soluto se transporta entonces un poco más de lo que se esperaría en verdaderas condiciones de equilibrio. La velocidad de transferencia de las moléculas del soluto no es instantánea, así que el soluto se transporta hacia los extremos de la banda originando un ensanchamiento de ésta. Los efectos de transferencia de masa fuera de equilibrio se hacen menores a medida que disminuye la velocidad de flujo debido a que hay más tiempo disponible para que se alcance el equilibrio.

2.2.1.3 Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Las partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son el reservorio para disolventes, la bomba, el inyector, la columna, el detector y el registrador o integrador (8).

a) Reservorio para disolventes.

El reservorio para disolvente o fase móvil debe ser de una composición tal que no interactúe con las fases móviles acuosas y no acuosas. En muchos casos, los disolventes acuosos y algunos orgánicos son desgasificados antes de ser usados, lo cual se hace para evitar la formación de burbujas en el detector. Agitar la fase móvil bajo vacío o burbujearla con helio son maneras efectivas de desgasificarla. Consecuentemente, el reservorio debe estar construido de tal manera que facilite la desgasificación de la fase móvil. Cuando se requiere controlar la temperatura de la columna, es conveniente que la fase móvil se encuentre a la temperatura de ésta, por lo que el reservorio de la fase móvil pueda contar con un dispositivo que tenga la capacidad de controlar la temperatura.

b) Bombas.

Las bombas deben estar construidas de un material inerte a la fase móvil, y deben ser capaces de generar una presión superior a 5000 psi. El flujo del disolvente posterior a la bomba, debe ser sin pulsos, reproducible y constante.

Las bombas con movimiento alternado o bombas reciprocantes, que son las más utilizadas, producen un flujo pulsante que debe ser amortiguado. La ventaja de este tipo de bombas es que con ellas se puede utilizar sin límite el volumen del disolvente; además, su reducido volumen interno las hace ideales para la elución en gradiente.

c) Inyector.

Las principales características del inyector son: la muestra debe inyectarse como un paquete compacto con el fin de obtener una máxima eficiencia en la separación; la técnica de inyección debe ser reproducible para una máxima exactitud en análisis cuantitativos. Finalmente, el sistema debe ser capaz de inyectar contra una presión elevada sin que ocurra pérdida de muestra.

d) Columna (8).

Las partículas de las columnas para CLAR se encuentran disponibles tanto en forma irregular como esférica, y en la mayoría de los casos las partículas son totalmente porosas con una estructura de los poros relativamente uniforme. La reproducibilidad y estabilidad a largo plazo de las columnas para CLAR son de importancia crítica en el desarrollo de un método.

La elección del tamaño del poro y del área superficial del empaque de la columna es determinado por su aplicación. Para moléculas pequeñas generalmente se usan columnas con partículas de 7 a 12 μ m mientras que las moléculas grandes generalmente son separadas con empaques de poros de mayor tamaño (por ejemplo, 30 μ m para proteínas).

Las primeras columnas usadas en CLAR se basaban en una cromatografía de adsorción; sin embargo, un avance trascendente en CLAR se consiguió con la introducción de materiales empaque donde la fase estacionaria se encuentra unida de manera covalente a un soporte de sílice(2). Esto permitió que los sistemas de fase reversa fueran usados sin riesgo del eventual lavado de la fase estacionaria de la columna. El soporte de sílice es tratado con organocloroalano, o algún compuesto similar para generar una fase estacionaria de la polaridad deseada.



Estas columnas tienen gran aplicación en el análisis de fluidos biológicos, donde el fármaco es de los componentes más lipofílicos de la muestra, por lo que se retiene más que los compuestos endógenos. Esto incluye a los metabolitos, los cuales son generalmente más polares que el fármaco del que provienen; además, en fase reversa, la fase móvil es de carácter acuoso, que es un medio más apropiado para muestras acuosas. El uso de un sistema de partición en vez de un sistema de adsorción origina picos con menor efecto de colapso.

TABLA 2 Empaque de columnas para CLAR(8)

Método cromatográfico	Tipo de empaque	Descripción
Fase reversa y per iónico.	C-18, octadecil, ODS	Alta capacidad de retención. Fácilmente disponible
	C-8, octil	Menor capacidad de retención que C-18. Fácilmente disponible
	C-3, C-4	Menor capacidad de retención; usada principalmente para péptidos y proteínas
	C-1, trimetil- α -III, TMS	Menor capacidad de retención; menor estabilidad.
	Fenil	Capacidad de retención moderada; algunas diferencias en selectividad.
	CN, ciano	Capacidad de retención moderada; usada en fase normal y en fase reversa.
	NH ₂ , amino	Capacidad de retención débil; usada para carbohidratos; menos estable.
	Poliestireno	Estable a pH de 1 a 13; mejor forma de picos y tiempo de vida de la columna mayor para algunas separaciones.
Fase normal	CN, ciano	Muy polar.
	OH, diol	Más polar que CN
	NH ₂ , amino	Altamente polar; menos estable.
	Silice	Barata, usada en cromatografía preparativa.
Exclusión por tamaño	Silice	Con capacidad de adsorción.
	Silice silicizada	Menos capacidad de adsorción; amplia compatibilidad con disolventes; usada con disolventes orgánicos.
	OH, diol	Menos estable; usada en filtración en gel acuosa.
	Poliestireno	Usada ampliamente en filtración en gel acuosa; incompatible con disolventes muy polares.
Intercambio iónico	Fase unida	Menos estable y reproducible
	Poliestireno	Menos eficiente, estable, menos reproducible.

e) **Detector.**

Los detectores para CLAR pueden clasificarse en dos categorías.

1.- Los detectores diferenciales que proporcionan una medida diferencial de una propiedad "gruesa" que poseen tanto el soluto como la fase móvil. Estos detectores generalmente no son específicos y responden a una amplia gama de compuestos.

El detector de índice de refracción se encuentra dentro de esta categoría.

2.- Los detectores de propiedades del soluto o detectores específicos miden una propiedad de la muestra que no posee la fase móvil. Los detectores ultravioleta y de fluorescencia caen dentro de esta categoría.

Detectores Ultravioleta-Visible. (8)

Son los detectores más comunes en el análisis farmacéutico. En general, estos detectores resultan útiles para compuestos aromáticos y otros tipos de compuestos no saturados. Se clasifican en detectores de onda fija y de onda variable. Los detectores UV-Visible no destruyen las muestras, son relativamente insensibles a cambios en el flujo del disolvente, a la temperatura y a los cambios de composición de la fase móvil, por lo que resultan apropiados para la elución en gradiente.

2.2.1.4 Cromatografía de Par Iónico(7)

Muchos compuestos de interés farmacéutico son ionizables, y los procedimientos clásicos de extracción para su concentración a menudo fallan por el carácter hidrofílico de estos compuestos. En consecuencia, el análisis de dichas sustancias presenta dificultades, en particular en la obtención de especificidad y precisión. La solución más efectiva a este problema ha sido el desarrollo de técnicas de extracción por per iónico. El principio de la extracción por per iónico está basado en la formación de un complejo entre la sustancia de interés y un contraión proporcionado por un reactivo apropiado. El complejo, que se designa como par iónico, posee idealmente una carga neutra, y es soluble en el disolvente de extracción.

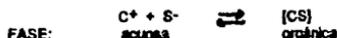
La selectividad que puede obtenerse con una extracción por per iónico, así como la gran cantidad de compuestos farmacéuticos que pueden extraerse por esta técnica, originó la aplicación de este principio en cromatografía.

La cromatografía por per iónico es una forma especializada de cromatografía de partición. Tiene como ventajas que puede ser usada para la separación de compuestos ionizables así como para la resolución de mezclas de compuestos ionizables y no ionizables; puede además incrementar la sensibilidad de detección mediante el uso de un contraión que sea cromóforo cuando se encuentre formando un complejo con el ion de la sustancia de interés, la cual es no cromófora.

Mecanismo de la cromatografía de par iónico

Un par iónico es una especie que resulta de una asociación por fuerzas de Coulomb entre dos iones de cargas eléctricas opuestas, es decir, entre la sustancia de interés y el contraión. El contraión es un ácido o una base débil que se caracteriza por estar constituido por una región polar ionizable y una región no polar. Se han propuesto diversos modelos para explicar el proceso de cromatografía de par iónico.

El primer modelo es una extrapolación directa de la teoría de extracción líquido-líquido por par iónico. El modelo establece que el soluto ionizado forma un par iónico con un contrón de carga opuesta. El par iónico es soluble en la fase orgánica del sistema cromatográfico. El mecanismo puede ser expresado como sigue:



donde el ion del soluto, con carga negativa (S^-) forma un complejo en la fase acuosa, con el contrón cargado positivamente (C^+). El complejo neutro (CS) se distribuye entonces en la fase orgánica. En este modelo, el par iónico se forma en la fase acuosa. Datos experimentales indican que este no es el único mecanismo que opera. Particularmente, en cromatografía de fase reversa con par iónico donde se utilizan contrones que poseen una parte lipofílica, se piensa en la posibilidad de que esta región de la molécula interactúe con la fase orgánica estacionaria.

Estas consideraciones son las bases para un segundo modelo el cual propone que la parte de la molécula del contrón que es soluble en la fase estacionaria, domina a la parte insoluble en esta fase. El mecanismo puede expresarse como sigue:

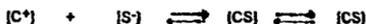


FASE acuosa acuosa acuosa orgánica

donde el contrón es adsorbido por la fase orgánica mientras que el ion con carga positiva (C^+) se encuentra libre para reaccionar con el ion soluto (S^-) que se encuentra en la fase acuosa.

La adsorción de la parte soluble en la fase estacionaria conduce a un intercambio iónico de tipo dinámico mientras que la mayoría de los conceptos de cromatografía de par iónico involucran un intercambio estático. En un sistema de intercambio iónico, la concentración de los iones que interactúan permanece fija con sitios iónicos estáticos. En un sistema dinámico de par iónico, la fase orgánica puede contener concentraciones variables del contrón. Un sistema dinámico de par iónico proporciona mayor versatilidad, y la ventaja de una mayor eficiencia en la columna.

Recientemente se ha propuesto un tercer modelo, que no involucra el concepto de la formación de un par iónico, pero sí de una "interacción iónica" que implica alguna interacción Coulombica y otras fuerzas que imponen a una sustancia cierta afinidad o repulsión hacia la fase móvil o a la fase estacionaria. En este modelo se establece que el contrón es adsorbido en la fase estacionaria, formándose una primera capa cargada y una capa secundaria con iones de cargas opuestas. Los iones de la sustancia de interés, que se encuentran en la capa secundaria son atraídos por la capa primaria, neutralizando una carga en este proceso. Para restaurar el equilibrio, un contrón es adsorbido en la superficie. El movimiento del ion de la sustancia de interés y el contrón ocurren como eventos individuales y no necesariamente como un par iónico. Uno de los usos de este modelo es la explicación del por qué la adición a la fase móvil de modificadores que consisten en compuestos ionizables similares al compuesto de interés, originan una reducción en el factor de capacidad e intervienen en la simetría del pico. En esta explicación, el modificador, de carga y características similares a la sustancia de interés, se comporta siguiendo un mecanismo de exclusión de carga sobre la superficie de la fase estacionaria.



FASE orgánica acuosa orgánica acuosa

FACTORES QUE AFECTAN LA CROMATOGRAFIA DE PAR IONICO.

Características del contralón.

El tipo de contralón, su tamaño y concentración, son factores importantes para la separación. El tipo de contralón depende de la sustancia de interés, así como de su clasificación como ácido o base débil. El contralón es edicionado en forma de un reactivo contralón; en cromatografía de fase reversa por par iónico existe la posibilidad de seleccionar un contralón a partir de una gran variedad de compuestos similares, cuya diferencia radica principalmente en el tamaño de la región hidrofóbica. Durante la optimización de una separación es importante considerar la hidrofobicidad del contralón, pues a medida que la hidrofobicidad aumenta, se incrementa también el factor de capacidad. El efecto de hidrofobicidad debe ser aplicado cuidadosamente pues podría ocurrir que la retención del contralón supere a la retención del par iónico.

Concentración del contralón.

La concentración del contralón depende de diversos factores que operan durante la separación. En general, al aumentar la concentración del contralón, aumenta la retención; si esta concentración se sigue aumentando, la retención disminuye; la explicación a esto es que a medida que se incrementa la concentración del contralón, la aglomeración de sus moléculas se hace significativa. Esta aglomeración reduce la eficiencia del par iónico porque solo algunas moléculas pueden interactuar con la sustancia de interés.

Debe tomarse en cuenta que las aminas cuaternarias usadas en altas concentraciones pueden solubilizar la base de sílice de la columna; este efecto puede minimizarse mediante el empleo de una precolumna antes del inyector para prevenir que se solubilice el empaque de la columna analítica por la saturación de la fase móvil con sílice.

El contralón no deberá interferir con la detección, excepto cuando se usa para incrementar la respuesta del detector. El contralón no debe estar sujeto a ningún equilibrio secundario.

Efecto del pH

La selectividad de los solutos iónicos en cromatografía de par iónico, depende en gran medida del pH. Esta dependencia es una consecuencia directa del equilibrio de protonación en el que se pueden encontrar la sustancia de interés y el contralón. Por ejemplo, si la sustancia de interés es un ácido débil HA, el equilibrio de disociación en medio acuoso será:



donde la concentración efectiva de la forma aniónica dependerá del pH elegido. El soluto y el contralón se distribuirán entre la fase móvil y la fase estacionaria, dependiendo del pH de la fase acuosa.

El equilibrio de ionización también se verá afectado por la temperatura, incrementando o disminuyendo los valores de pK. Para asegurar la reproducibilidad, resulta apropiado amortiguar la fase móvil y mantener tanto a la columna como a la fase móvil a una temperatura constante.

Efecto de la fuerza iónica en el factor de capacidad (k')

Si la concentración del amortiguador en la fase móvil es muy elevada, puede originarse una fuerza iónica excesiva, generando una competencia entre los iones del amortiguador y el contralón que es adsorbido en la fase estacionaria, lo que origina una reducción de la eficiencia del sistema. Una competencia similar puede ocurrir con la formación de pares iónicos en la fase móvil.

Si la concentración del contralón es muy elevada, las moléculas del contralón pueden interactuar entre sí evitando la formación de pares iónicos con la sustancia de interés lo cual se refleja en una disminución de la eficiencia.

La fuerza iónica influirá en la k' de un soluto: un incremento en la concentración originará una disminución en los valores de k'.

Efecto de la temperatura.

La temperatura es una variable importante en la cromatografía de par iónico porque influye en la partición de un soluto entre dos fases inmiscibles. Un incremento en la temperatura de la columna se asocia generalmente a una disminución de k' del par iónico. De aquí que las variaciones en la temperatura ambiente pueden reflejarse en una reproducibilidad pobre de k' . La temperatura puede ser usada con el fin de optimizar la separación.

2.2.2 Tratamiento de muestras en fluidos biológicos (2)

Un fluido biológico es una mezcla muy compleja que contiene una multitud de componentes los cuales pueden reaccionar entre sí y originar interferencias, las cuales podrían elevar o enmascarar la sustancia de interés. Los fluidos biológicos más comúnmente usados son sangre, plasma o suero y orina.

2.2.2.1 Propiedades de algunos fluidos biológicos.

SANGRE. Es uno de los fluidos más complejos, que consiste en un fluido claro, amortiguado, que contiene proteínas solubilizadas, grasas y sales disueltas y células suspendidas. Las células rojas, que son el componente principal pueden ser separadas del fluido claro o plasma por simple centrifugación.

En general, existen cuatro tipos de muestras que pueden derivar de una muestra de sangre: sangre total, suero, plasma y fracción libre de proteínas. Al analizar sangre total, los componentes celulares de la sangre deben ser lisados para que su contenido puede formar una mezcla homogénea con la porción fluida de la sangre. Las células pueden ser lisadas usando ultrasonido o congelando las muestras por un tiempo, y someterlas a ultrasonido posteriormente. El plasma se distingue del suero en que el suero es plasma al que le ha sido eliminado el fibrinógeno. Para obtener plasma a partir de sangre total, debe adicionarse a ésta un anticoagulante. La fracción libre de proteínas es la porción de la sangre que queda después de que los componentes celulares y las proteínas plasmáticas han sido eliminados. Esta fracción contiene sustancias que no están unidas a proteínas plasmáticas, y puede obtenerse mediante ultrafiltración.

SUERO Y PLASMA. La principal característica del plasma y del suero es la presencia de grandes cantidades de proteínas. El primer paso en la preparación de plasma o suero para su análisis es la obtención de una solución acuosa libre de proteínas, para su posterior extracción con disolventes orgánicos. Se enlistan a continuación algunos métodos para la precipitación de proteínas de plasma o suero. (Ver TABLA 3)

TABLA 3. Métodos para precipitación de proteínas en plasma y suero

MÉTODO	COMENTARIO
Calentamiento a 90°C por 5 - 10 min.	No es muy eficiente y puede decomponer a la sustancia de interés
Ciclos de congelación-descongelación	No es muy eficiente y consume mucho tiempo
Saturación con sulfato de amonio	Eficiencia moderada, pH al final de la precipitación de 7, alta concentración de sales en el sobrenadante.
Sulfato de zinc / hidróxido de sodio	Excelente eficiencia, pH al final de la precipitación de 7. Puede llevarse a cabo a temperaturas bajas.
Ácido metafosfórico.	Excelente eficiencia, el pH ácido puede decomponer a la sustancia de interés.
Ácido perclórico	Excelente eficiencia, el pH ácido puede decomponer a la sustancia de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.
Ácido tricloroacético	Buena eficiencia, el reactivo debe permanecer frío y puede resultar difícil removerlo de la sustancia de interés.
Etanol	Se requieren de 2 volúmenes para una desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido
Acetonitrilo	Se requieren de 1.5 volúmenes para una desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido
Cloruro de aluminio	Es mejor que el sulfato de amonio para compuestos básicos.

La desnaturalización de proteínas previa a la extracción no debe considerarse como una regla general; aunque los fármacos pueden estar firmemente unidos a las proteínas plasmáticas, esta unión es reversible, por lo que a un pH apropiado la muestra puede ser extraída con un disolvente orgánico. La estrategia consiste en agregar un volumen de amortiguador igual al volumen de la muestra y extraer con dos o tres volúmenes de disolvente orgánico, con la ventaja de que se obtiene así un procesamiento más rápido de la muestra.

ORINA. La orina, a diferencia del plasma o del suero, generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos y está constituida por sustancias solubles en agua, mientras que la mayoría de los fármacos son solubles en disolventes orgánicos por lo tanto, pueden extraerse directamente de ésta. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puedan excretar en un intervalo de tiempo fijo, es de interés la cantidad de fármaco excretada, y no las concentraciones observadas. La orina se encuentra en un amplio intervalo de pH el cual depende en gran medida de la dieta o del fármaco administrado.

2.2.2.2 Extracción Líquido/Líquido

El método tradicional para la extracción de fármacos de matrices biológicas es la extracción líquido/líquido; para llevar a cabo esta extracción deben considerarse estos parámetros:

pH: el pH de la fase acuosa debe ajustarse para asegurar la transferencia del fármaco a la fase orgánica; el fármaco debe estar en su forma no ionizada para ser extraído de la fase acuosa al disolvente de extracción.

naturaleza del disolvente orgánico: los compuestos altamente lipofílicos serán extraídos fácilmente por disolventes no polares, mientras que para los fármacos que contengan, por ejemplo, grupos hidroxilo, se requerirán disolventes más polares (Ver TABLA 4)

La elección del disolvente de extracción deberá basarse en la densidad de éste con respecto a la fase acuosa, así como en su volatilidad.

TABLA 4. Orden de polaridad de disolventes usados para la extracción de fármacos en fluidos biológicos.

Disolvente	Límite al UV (nm)	Punto ebullición (°C)	de
n-Hexano	210	69	Menos polar
Ciclohexano	210	81	
Tetracloruro de carbono	de 285	77	
Benceno	280	80	
Tolueno	285	111	
Di-isopropil éter	220	68	
Di-etil éter	220	35	
Amil acetato	285	149	
Cloroformo	245	61	
1,2-Diclorometano	230	83	
Metil- <i>tert</i> -butilcetona	330	116	
Acetato de etilo	280	77	
n-Butanol	215	118	Más polar

2.2.2.3 Extracción Sólido/Líquido.

Aunque tradicionalmente se ha utilizado la extracción líquido/líquido para extraer fármacos de fluidos biológicos, la extracción en fase sólida es una alternativa que cobra importancia rápidamente. Esta involucra la selección de un "adsorbente" apropiado (fase normal, fase reversa, intercambio iónico, etc.), pero una vez que ha sido seleccionado, el método es rápido y fácil de operar, se evitan pérdidas de la muestra por una manipulación excesiva y es un método que puede automatizarse fácilmente (2, 25)

La extracción en fase sólida consiste en la adición de la muestra a una columna empujada con algún adsorbente en el cual el fármaco es retenido. El adsorbente debe ser lo suficientemente fuerte para separar al fármaco de las proteínas, sin embargo debe ser capaz de liberarlo durante el subsecuente paso de elución.

2.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (28, 29, 30, 31)

Los métodos analíticos empleados en la determinación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos ocupan un lugar muy importante en la evaluación e interpretación de datos farmacocinéticos. El éxito de cualquier estudio biofarmacológico in-vivo que involucre el análisis de datos farmacocinéticos depende de la sensibilidad y especificidad del método. Una de las causas reportadas por las que un producto no es aprobado por la FDA son tanto la validación inadecuada de la metodología analítica como la información incompleta de ésta.

La validación del método analítico incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular, para la determinación cuantitativa de un compuesto, en una matriz biológica determinada cumple con la finalidad para la que fue desarrollado.

Los parámetros esenciales para asegurar la aceptabilidad de un método analítico son estabilidad del fármaco en la matriz de estudio bajo condiciones de almacenamiento, precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad (selectividad), función respuesta y reproducibilidad. La validación de métodos analíticos debe realizarse para apoyar estudios de farmacocinética, bioequivalencia y estudios relacionados con la solicitud para la venta de un nuevo medicamento (new drug application, NDA) o para la solicitud abreviada para la venta de un nuevo medicamento (abbreviated new drug application, ANDA).

2.3.1 Criterios de Validación

ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD.

Un método específico es aquel que permite diferenciar al compuesto de interés de sus metabolitos, de sustancias degradantes y de compuestos endógenos provenientes de la matriz biológica. Generalmente la evaluación se realiza verificando que en por lo menos seis fuentes de la misma matriz biológica, no hay interferencias del compuesto de interés con compuestos endógenos. Cuando la presencia de metabolitos o degradantes, puedan interferir con el compuesto de interés, la especificidad del método puede verificarse analizando estos compuestos con la técnica propuesta; el no se cuenta con ellos, pueden analizarse muestras de sujetos que recibieron el fármaco. Cuando el fármaco en estudio sea administrado en terapia conjunta con otras sustancias, es conveniente verificar que estos compuestos no interfieran con la sustancia de interés.

EXACTITUD.

La exactitud de una medición se define como la diferencia entre el valor observado y el valor real. La exactitud puede ser expresada solamente cuando se conoce el valor verdadero; puede expresarse como error o porcentaje de error. El "valor verdadero" para los ensayos de exactitud puede obtenerse

de dos formas: la sustancia de interés se adiciona a la matriz biológica en una cantidad conocida para obtener una valor conocido de concentración; o bien, los resultados de un método pueden compararse con los resultados de un "método de referencia".

La exactitud debe ser determinada usando un mínimo de 5 determinaciones por concentración; debe de estar dentro del intervalo de $\pm 15\%$ del valor real ($\pm 20\%$ para la concentración mínima cuantificable).

PRECISION.

La precisión en un conjunto de muestras describe las diferencias de las medidas individuales entre sí. La precisión es generalmente determinada mediante el análisis repetido de muestras "control de calidad" conocidas, a concentraciones baja, media y alta en el intervalo de calibración e interpoladas en la curva de calibración. La precisión debe evaluarse en un día (precisión intradía o repetibilidad) y entre días (precisión inter día o reproducibilidad).

La precisión intra e inter día debe ser menor al 15% de Coeficiente de Variación (menor al 20% para la concentración mínima probada).

SENSIBILIDAD

Puede expresarse como límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección o cantidad mínima detectable es aquella en la que el fármaco puede ser detectado, aunque no se cuantifique, y se determina realizando diluciones sucesivas de la sustancia de interés, hasta obtener una muestra tal que genere una respuesta en el detector igual a dos a cuatro veces el ruido del sistema.

El límite de cuantificación o cantidad mínima cuantificable se define como la concentración a la cual es posible cuantificar cumpliendo los criterios aceptables de precisión y exactitud. Se determina analizando la concentración mínima a cuantificar, la cual debe cumplir con $\pm 20\%$ para exactitud y para precisión, un coeficiente de variación menor o igual al 20%.

INTERVALO LINEAL Y FUNCION RESPUESTA.

El método debe definir el intervalo de concentraciones en el cual la sustancia de interés será cuantificada. Esto determina a la curva de calibración, la cual está constituida por cinco a ocho puntos, incluyendo a la concentración mínima cuantificable. Es deseable que la curva de calibración se prepare utilizando el fluido biológico en el cual se realizará la cuantificación.

Es necesario usar un número suficiente de puntos para definir adecuadamente la relación entre concentración y respuesta, la cual debe demostrarse que es continua y reproducible. El número de estándares a ser usados está en función del intervalo dinámico y de la naturaleza de la relación concentración-respuesta. Debe establecerse la relación más simple para respuesta contra concentración, y el ajuste debe ser evaluado de manera estadística.

La función respuesta se evalúa verificando la calidad de ajuste a la recta, comparando "el cálculo de regresión" de los puntos estándar, con el valor nominal, esto es, interpolando en la curva de calibración la respuesta obtenida de las muestras; estos resultados deben cumplir con lo establecido para precisión y exactitud.

ESTABILIDAD.

Cuando las muestras deben ser almacenadas, debe asegurarse la estabilidad del fármaco durante el periodo de almacenamiento.

El aseguramiento de la estabilidad del fármaco puede llevarse a cabo analizando las muestras adicionales inmediatamente y en días subsiguientes, después de un periodo de almacenamiento; La estabilidad de la muestra deberá evaluarse también en la mesa de trabajo y en el disolvente de inyección. El criterio de aceptación es el mismo mencionado para precisión y exactitud.

RECUBRO.

El recobro de una sustancia determinada se expresa como el porcentaje extraído de la sustancia de interés, con respecto a la cantidad adicionada de dicha sustancia, a la matriz biológica.

Puede determinarse comparando la respuesta obtenida de muestras extraídas, a las que se les ha adicionado una cantidad conocida del fármaco, con muestras que no han sido extraídas, de concentración idéntica a la que se obtiene en la disolución de reconstitución. Es deseable que el recobro no sea menor al 80%, y se aproxime al 100 %, además, debe ser constante en el intervalo estudiado.

2.4 MONOGRAFIA DE HIDROCLOROTIAZIDA

2.4.1 Descripción (8,9)

2.4.1.1 Nomenclatura:

6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1 dióxido

6-cloro-3,4-dihidro-7-sulfamoi-2H-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dioxido

6-cloro-7-sulfamoi-3,4-dihidro-1,2,4-benzotiadiazina 1,1 dióxido

2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-6-cloro-3,4-dihidro-,1,1-dioxido

2.4.1.2 Fórmula condensada:

$C_7H_8ClN_3O_4S_2$

2.4.1.3 Fórmula estructural: Ver FIGURA 2

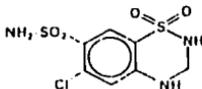


FIGURA 2

Fórmula estructural de Hidroclorotiazida

2.4.1.4 Apariencia

Polvo cristalino, blanco o prácticamente blanco; inodoro. De ligero sabor amargo.

2.4.2 Solubilidad (8)

Hidroclorotiazida es soluble en soluciones acuosas de bases inorgánicas como hidróxido de sodio o hidróxido de amonio y en bases orgánicas como n-butilamina.

2.4.2.1 Solubilidad en soluciones acuosas.

La solubilidad de Hidroclorotiazida en soluciones acuosas se describe en la TABLA 5.

TABLA 5. Solubilidad de Hidroclorotiazida en soluciones acuosas.

Disolvente	t°C	pH de la solución	Solubilidad en g/100 ml. de solución
agua	25	6,2	$80,9 \times 10^{-3}$
agua	37	7,2	108×10^{-3}
NaCl 0,9%	25	6,1	$59,4 \times 10^{-3}$
HCl 0,1 N	25	1,0	$80,8 \times 10^{-3}$
ácido ascórbico 0,1 N	25	2,9	$63,6 \times 10^{-3}$
amortiguador de fosfato 0,067 M	25	7,4	$61,6 \times 10^{-3}$
amortiguador borato 0,05 M	25	9,0	103×10^{-3}
amortiguador 1 M	25	11,6	2,2
NaOH 0,1 N	25	10,2	1,79
fluido gástrico simulado pH 1,1	37	1,1	108×10^{-3}
fluido intestinal simulado pH 7,4	37	7,5	109×10^{-3}

2.4.2.2 Solubilidad en disolventes no acuosos.

La solubilidad de Hidroclorotiazida en disolventes orgánicos se describe en la TABLA 6

TABLA 6. Solubilidad de Hidroclorotiazida en disolventes orgánicos.

Disolvente	° l C	Solubilidad en de solución g/100 mL
acetona	25	13.7
ácido acético	25	0.15
acetonitrilo	25	2.0
acetato de etilo	25	0.59
cloroformo	23	0.1
metanol	23	3.9 - 4.1
diclorometano	23	< 0.02

2.4.2.3 pKa (9, 10)

Las constantes de ionización reportadas difieren entre sí. Éstas se enlistan en la TABLA 7. La primera constante de ionización se atribuye al grupo sulfamilo mientras que la segunda constante, es proporcionada por la ionización de la benzotiazidina (Ver estructura de Hidroclorotiazida, FIGURA 2).

TABLA 7. Constantes de ionización reportadas para Hidroclorotiazida:

pKa 1	pKa 2
7.0	9.2
8.8	10.4
8.6	9.9
8.7	-

2.4.3 Espectro ultravioleta

El espectro ultravioleta de Hidroclorotazida se describe en la TABLA 7.

TABLA 8. Espectro UV de Hidroclorotazida

DISOLVENTE	λ max (nm)	λ min (nm)	log ϵ
etanol	225		4.578
	269		4.307
	231		3.505
metanol	226	241.5	4.513
	271		3.129
	317		4.279
agua	270		3.471
	315		4.286
HCl 0.10 N	270		3.495
	315		4.290
NaOH 0.01 N	272		3.500
	323		4.193
NaOH 0.1 N		247	3.435
	273		4.198
	319/320	299	3.466

2.4.4 Estabilidad.(9, 11)

En soluciones acuosas, la hidroclorotiazida sufre una hidrólisis para dar formaldehído y 4-amino-6-cloro-1,3 bencen disulfonamida (FIGURA 4) Esta reacción es dependiente de la temperatura y del pH. Entre un pH de 2.5 y 11.5 hay una velocidad de hidrólisis máxima alrededor de 7.2. A un pH menor a 2 y mayor a 12, la velocidad de reacción se incrementa rápidamente (FIGURA 5)

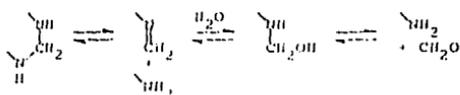


FIGURA 4. Reacción de Hidrólisis para Hidroclorotiazida.

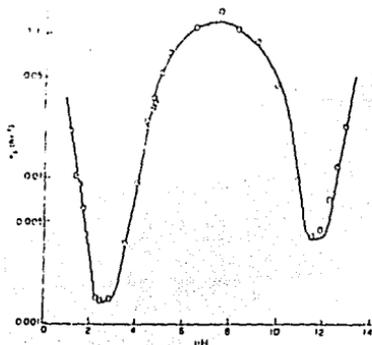


FIGURA 5. Relación Velocidad de hidrólisis de Hidroclorotiazida Vs pH.

2.4.6 Farmacología (12,13, 14)

La hidroclorotiazida es un potente diurético que pertenece al grupo de las benzotiazidas, la cual se prescribe frecuentemente ya sea sola o en combinación con otros fármacos para el tratamiento de la hipertensión, Actúa directamente sobre el riñón a nivel de los túbulos proximales incrementando la excreción de cloruro de sodio, potasio y agua. Es uno de los diuréticos de acción en el manejo de edema debido a una insuficiencia cardíaca; también responde favorablemente el edema debido a enfermedad hepática o renal crónica.

Es importante resaltar que la hidroclorotiazida causa reducción de la poluria en pacientes con diabetes insípida.

2.4.5.1 Modo y Mecanismo de acción

Su modo de acción diurética consiste en una disminución de la reabsorción tubular de cloruro y de sodio y secundariamente de agua por acción osmótica. La excreción aumentada de potasio es debida a un intercambio con el exceso de sodio que llega a los segmentos distales del nefrón que, al reabsorberse, produce un potencial eléctrico negativo que atrae al catión potasio hacia la luz tubular.

En el movimiento de sodio a través de la membrana luminal desde el líquido tubular hasta el interior de las células intervienen diferentes mecanismos que difieren con respecto a su localización en el nefrón así como aspectos biofísicos y bioquímicos del proceso de transporte. Uno de estos mecanismos es la entrada de iones sodio acoplada a la entrada de un ion cloruro. La acción de la hidroclorotiazida puede atribuirse al bloqueo de dicho mecanismo de transporte.

2.4.5.2 Usos y Administración.

Después de la administración de Hidroclorotiazida, el efecto diurético comienza a observarse a las dos horas y termina entre las 6 y 12 horas.

La dosis usual inicial en el tratamiento de edema es de 50 a 100 mg al día, reduciendo la dosis de 25 a 50 mg. diarios o de manera intermitente; la dosis inicial sugerida para niños es de 2.5 mg por kg. de peso corporal al día en dosis divididas. En el tratamiento de hipertensión la dosis usual es de 25 a 50 mg al día, ya sea sola o en combinación con otros agentes antihipertensivos.

2.4.5.3 Nombres comerciales (15)

En México, la Hidroclorotiazida se encuentra disponible comercialmente en combinación con otros fármacos como son Captopril (Capozide, Squibb), maleato de Enalapril (Co-Renitec, Prosalud), Triamtereno (Dyazide, Smith Kline), Amilorida y Timolol (Moduren, Prosalud), Amilorida (Moduretic, Prosalud; Rheflun, Siegfried), Metoprolol (Seloprea, Astra)

2.4.6 Efectos colaterales y toxicidad.

Entre las reacciones adversas que puede provocar están: náuseas, anorexia, cefalea, inquietud, fatiga y estreñimiento; hiponatremia, hipocalcemia, hiperglucemia, alcalosis metabólica y dermatitis alérgica con fotosensibilidad; pancreatitis, ataques agudos de gota con su uso prolongado; en gestantes,

hiperuricemia; los hijos de madres tratadas con fliclozid durante el embarazo pueden presentar hiponatremia, hipocalcemia y trombocitopenia neonatales. La intoxicación aguda se manifiesta por transtornos hidroelectrolíticos.

Cuando el tratamiento es prolongado o en el caso de pacientes susceptibles, la pérdida de potasio puede ser suficiente para producir hipocalcemia; para evitar esto, pueden administrarse conjuntamente suplementos de potasio o diuréticos ahorradores de potasio.

2.4.7 Farmacocinética.

La Hidroclorotiazida se absorbe rápidamente, aunque de manera incompleta después de una administración oral, teniendo una biodisponibilidad de alrededor del 70 %. Después de una administración intravenosa se observa que más del 95 % de la dosis es excretada sin cambio a través de la orina en 24 horas.

Tiene una vida media en plasma de 8 a 15 horas y un volumen de distribución de alrededor de 3 litros/kg. Se une a proteínas plasmáticas en un 40 % (10).

La absorción de Hidroclorotiazida es proporcional a la dosis cuando se administran 25, 50 y 100 mg.

Datos farmacocinéticos reportados: Ver TABLA 8.

TABLA 8. Datos farmacocinéticos de Hidroclorotiazida reportados.

DOSIS (tabletas)	mg	C _{max} ng/mL	T _{max} h	AUC ng/h/mL	Cl _r mL/min
(16) 25		127±34	2.4±0.9	978±237	257±83
(16) 50		280±108	2.1±1.0	1988±360	222±36
(16) 100		437±105	2.3±1.0	3654±779	232±52
(17) 100		667	2	4421	-
(18) 60		310±130	2.4±1.8	2067±717	307±1.24
(26) 25		158±40	-	1266±292	-

2.4.8 Métodos analíticos reportados por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se han reportado diversos métodos para la cuantificación de Hidroclorotizida en varios fluidos biológicos utilizando diferentes técnicas de cuantificación.

En 1981, Barbraña y colaboradores (19) reportan la determinación de Hidroclorotizida en plasma y orina, empleando una columna C18 con detección al UV a 226 nm para plasma y 271 nm para orina. La fase móvil para la cuantificación de orina consistió en una mezcla de acetonitrilo/perclorato de sodio 0.01 M a pH 4.6 (4/96) , y para plasma, en una mezcla metanol/perclorato de sodio 0.01M a pH 4.6 (15/85). La extracción de Hidroclorotizida de la orina (1 mL), se realiza con acetato de etilo, después de ajustar el pH en 5 con solución amortiguadora de acetatos. La fase orgánica se evapora y reconstituye en metanol. El procesamiento de las muestras de plasma consiste en una extracción de la muestra (2 mL) con tolueno; éste se desecha y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo, después de ajustar el pH en 3.8 con solución amortiguadora de acetatos. La fase orgánica se evapora y reconstituye en metanol.

Van Ginneken y Gribnau reportaron en 1984 (20) un método para la determinación de Hidroclorotizida en plasma y orina por CLAR, donde utilizaron una columna Lichrosorb RP-18, controlando la temperatura a 38 °C. La fase móvil reportada consiste en una mezcla de metanol / agua (20 / 80), que contiene sulfato de tetrabutilo amonio 0.01024 M y tria(hidroxi)metano 0.00676 M a un pH de 5.5. Se utiliza un detector UV a 272 nm. El pH de la muestra (0.5 mL) se ajusta con una solución amortiguadora de acetatos a 3.8 , y posteriormente se extrae con 5 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se transfiere a un tubo limpio que contiene 400 mg de bicarbonato de sodio; se mezcla, se centrifuga y la fase orgánica se lleva a sequedad , para posteriormente reconstituirse en 0.5 mL de fase móvil, inyectando 30 µL al sistema cromatográfico.

El método que reporta Van Der Meer y Brown (1987) para cuantificar Hidroclorotizida en plasma por CLAR (21) utiliza una columna Spherosorb ODS, con una fase móvil constituida por acetonitrilo / metanol / fosfato de tetraetil amonio a pH 2.8 en proporciones 10/9/100, con detección UV a 271 nm. En este método, a 1 mL de plasma se le adiciona un amortiguador de carbonatos a pH de 10, extrayéndose con 5 mL de acetato de etilo. Después de agitar y centrifugar, la fase orgánica se transfiere a un tubo limpio, se evapora y reconstituye en 100 µL de fase móvil, inyectando 50 µL al sistema cromatográfico.

Park y colaboradores (22) realizaron un trabajo donde determinan en orina diferentes diuréticos, entre ellos, Hidroclorotizida; el sistema cromatográfico que utilizan emplea una columna Hypersil ODS y la fase móvil es un sistema de gradiente de solución amortiguadora de fosfatos y acetonitrilo, donde la proporción de acetonitrilo se incrementa desde 4% hasta 60%. La columna se mantiene a 40°C y la detección se realiza mediante un detector de arreglo de diodos a 220, 273 y 326 nm.

En este estudio se comparó el recobro obtenido al realizar una extracción en fase sólida empleando columnas de extracción C18, con una extracción líquido/líquido con éter dietílico a diferentes pH (5, 7, 9), encontrándose que para Hidroclorotizida el recobro por extracción en fase sólida es de aproximadamente el 50 %, y por extracción líquido/líquido a pH 5 es de 89%; a pH de 7, 77.8 % y a pH 9 de 78.8 %.

Otro método, reportado por Azumaya (23) donde se cuantifica Hidroclorotizida en plasma humano por CLAR, emplea una columna Hypersil ODS, con detección UV a 272 nm, y una fase móvil que consiste en acetonitrilo/heptanosulfonato de sodio 0.007M (18/82) que contiene además 1% de ácido acético glacial y 0.035 % de trietilamina. Las muestras se preparan extrayendo 0.5 mL de plasma con 5 mL de metil ter-butil éter. La fase orgánica se evapora y el residuo se reconstituye en fase móvil (200 µL) inyectando 100 µL al sistema cromatográfico.

Campins y colaboradores publicaron en 1992 (24) un método para la cuantificación de diversos diuréticos en orina por Cromatografía de líquidos con detección ultravioleta, y entre éstos, a la Hidroclorotizida. Se utilizó una columna Hypersil ODS, con detección a 230 nm. La fase móvil

constituyó en acetonitrilo / solución amortiguadora de fosfatos a pH 3, que contenía 1.4 mL/L de propilamina, con un sistema de gradiente que incrementó la concentración de acetonitrilo desde un 15 % hasta un 80%. Hidroclorizida se extrajo con columnas de extracción en fase sólida C18, sin embargo, los recobros eran bajos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se pretende establecer un Método para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma, con ventajas sobre los métodos antes reportados en cuanto a sensibilidad, rapidez en la preparación de las muestras, confiabilidad y que además no involucre el uso de reactivos muy caros. Este método será utilizado durante un Estudio Bioequivalencia, y para ello es necesario tomar en cuenta los criterios de validación de Métodos Analíticos establecidos por organismos internacionales, como la FDA .

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Obtener un Método analítico para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para ser usado durante un estudio de Bioequivalencia y/o Biodisponibilidad.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

Realizar una revisión bibliográfica enfocada hacia los aspectos de la Hidroclorotiazida que permitan delimitar las características que debe tener el Método Analítico a desarrollar, para ser utilizado en un estudio de Bioequivalencia y/o Biodisponibilidad.

Obtener condiciones cromatográficas y de limpieza de muestra que permitan separar la Hidroclorotiazida, de los compuestos endógenos del plasma, y de su metabolito, para obtener una adecuada cuantificación de ésta en las muestras provenientes de un Estudio Clínico.

Validar el Método analítico propuesto según los criterios de linealidad del método, función respuesta, precisión, exactitud, estabilidad, especificidad, cantidad mínima cuantificable y cantidad mínima detectable.

6. REACTIVOS Y EQUIPO UTILIZADO

6.1 SUSTANCIAS DE REFERENCIA Y REACTIVOS.

6.1.1 Sustancias de Referencia

HIDROCLOROTIAZIDA: Sustancia Patrón de Referencia USP.
ACETANILIDA Sustancia de Referencia Interna
4-AMINO-6-CLORO-1,3 BENCENDISULFONAMIDA : Sustancia Límite de Referencia.

6.1.2 Reactivos

- Agua grado HPLC,
- Acetonitrilo Fisher, grado HPLC
- Metanol Fisher, grado HPLC
- Acetato de etilo Mallinckrodt, R.A. ACS
- Trisilamina para síntesis, Merck.
- Fosfato de sodio monobásico J.T. Bator R.A. ACS
- Borato de sodio J.T. Bator, R.A. ACS
- Ácido fosfórico J.T. Bator R.A. ACS
- Nitrógeno Linde, N.F.

6.2 EQUIPO

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con las siguientes características:

Bomba de flujo isocrático, marca Waters modelo 800E inyector automático marca Waters, modelo 717, detector UV de onda variable marca Waters modelo 466, integrador de datos marca Waters modelo 717, horno para columna y controlador de temperatura, marca Waters modelo TCM.

El sistema utilizó una columna Ultrasphere ODS C18, Beckman de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, 5mm de tamaño de partícula, con una guardacolumna Guarda-Pak Holder, marca Waters, con inerte de tipo mBondapak C18, con tamaño de partícula de 10mm.

Para proteger a la columna de la acción de la trisilamina, se utilizó una precolumna Waters de 3.9 mm de diámetro interno x 2.5 cm de longitud, empaçada con empaque Corasil (Waters) de 3.7-5µm de tamaño de partícula

Equipo adicional:

Centrífuga de mesa marca Sorvall,

Potenciómetro Beckman modelo pH14S,

Balanza analítica marca Mettler, modelo AE260

Pipetas automáticas de transferencia de volúmenes de 50 a 200 μ L y de 200 a 1000 μ L, marca

Finpipette

Pipeta de descarga múltiple de 100 μ L a 5 mL, marca Eppendorf

8. DESARROLLO DEL METODO

El desarrollo del método consistió fundamentalmente en los siguientes aspectos:

- 1) Selección de intervalo dinámico de trabajo de acuerdo a las concentraciones plasmáticas observadas en estudios farmacocinéticos de Hidroclorotiazida.
- 2) La obtención de condiciones cromatográficas que permitan la cuantificación de Hidroclorotiazida en el intervalo dinámico establecido, sin que existan interferencias por parte del metabolismo o de sustancias endógenas provenientes del plasma.
- 3) Desarrollar un método para aislar el principio activo de la matriz biológica.
- 4) Elección de estándar interno.

Para esto, se realizó una revisión bibliográfica de la información publicada de Hidroclorotiazida, enfocándose principalmente a los aspectos fisicoquímicos, farmacocinéticos y métodos analíticos para la cuantificación de Hidroclorotiazida en fluidos biológicos por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Las características que debe reunir este método son: volúmenes pequeños de muestra (0.2 a 0.5 mL), tiempos de análisis cortos, costos relativamente bajos y un método de extracción tal que permita obtener la sensibilidad deseada; por esta razón deben evitarse métodos que impliquen una manipulación excesiva de las muestras. El método debe ser específico, lineal, exacto y preciso.

SELECCION DEL INTERVALO DINAMICO.

El artículo publicado por Howes, Conway y Phillips (26) reporta una concentración plasmática máxima de 158.40 ng/mL cuando se administra una dosis de 25 mg (Ver TABLA 8). A partir de este trabajo, y considerando que la absorción de Hidroclorotiazida es proporcional a la dosis cuando se administran 25, 50 y 100 mg (10), se estableció un intervalo dinámico de 10 a 600 ng/mL para una dosis de 50 mg.

Los métodos reportados para la cuantificación de Hidroclorotiazida en plasma se caracterizan por ser sistemas cromatográficos que involucran el uso de par iónico.

Por lo anterior, se probó en primer término el método reportado por Van Der Meer (21), que consiste en una columna Spherosorb ODS, con una fase móvil constituida por acetonitrilo / metanol / fosfato de tetraetil amonio a pH 2.8 en proporciones 10/9/100, con detección UV a 271 nm. En el sistema que se probó se utilizó fosfato de tetrabutil amonio como control, en vez de fosfato de tetraetil amonio y la detección se realizó a 272 nm.

Con este sistema fue posible alcanzar la sensibilidad que el método requiere, así que se decidió trabajar sobre la limpieza de muestra empleando estas condiciones cromatográficas (Sistema Cromatográfico 1).

En los métodos reportados, se utiliza como disolventes de extracción acetato de etilo (19, 20, 21) o metil-ter-butil éter (23). Además, estos métodos fijan el pH de la muestra con amortiguador de acetatos, pH 3.8 (19,20) o amortiguador de carbonatos, pH 10 (21).

Se sabe, por otra parte, que la Hidroclorotiazida presenta una solubilidad muy baja en solución de borato de sodio 0.05M a pH 9.

Considerando esta información se investigó cuáles son las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción de Hidroclorotiazida, comparándose la eficiencia de extracción y la limpieza de la muestra cuando se utiliza acetato de etilo o metil-ter-butil éter, después de adicionar a las muestras

amortiguador de acetatos, pH 3.8 amortiguador de carbonatos, pH 10 o solución de borato de sodio 0.05M a pH 9.

Se determinó que entre metil-ter-butil éter y acetato de etilo, resulta más conveniente el uso de éste último, pues con él se obtiene mayor recobro de Hidroclorotiazida. Con respecto al amortiguador adicionado a la muestra, se observó que el recobro de Hidroclorotiazida se incrementa a medida que el pH de la muestra disminuye, sin embargo, a pH bajo, se extraen del plasma una gran cantidad de compuestos endógenos los cuales interfieren con Hidroclorotiazida. Es por esto que se descartó el uso de amortiguador de acetatos. La limpieza de la muestra que se obtiene con amortiguador de carbonatos y con solución de borato de sodio es prácticamente la misma, aunque el recobro con borato de sodio es significativamente mayor: con amortiguador de carbonato el recobro es de aproximadamente 50 %, mientras que con borato es de alrededor del 75%. (Ver FIGURA 6)

Se estableció así que las condiciones óptimas para la extracción de Hidroclorotiazida del plasma son: fijar el pH de la muestra con solución de borato de sodio 0.05 M y extraer con acetato de etilo.

Con este método de limpieza de muestra, utilizando el Sistema Cromatográfico 1, se obtiene la sensibilidad requerida, y en los blancos de plasma no se observan interferencias en el área de interés, sin embargo, dado que el fosfato de tetrabutil amonio, que se utiliza como reactivo par iónico en este método, es una sustancia muy cara, se decidió buscar otro sistema cromatográfico que no involucre su uso.

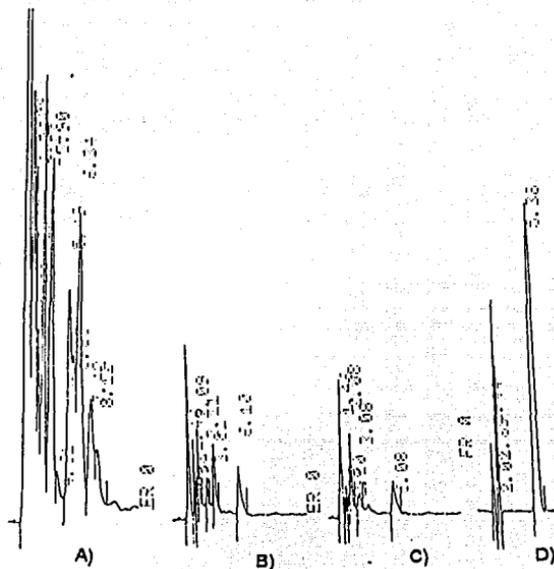


FIGURA 6. Blancos de plasma con Sistema Cromatográfico 1, utilizando como amortiguador A) Solución de acetatos, pH=3.8; B) Solución de borato de sodio, pH=9.; C) Solución de carbonatos, pH=10, D) Hidroclorotiazida, 300 ng/ml

Se probó entonces el sistema cromatográfico propuesto por Azumaya (22), que también se basa en una cromatografía de par iónico. Este sistema emplea una columna Hypersil ODS, con detección UV a 272 nm, y una fase móvil que consiste en acetronitrilo/heptanosulfonato de sodio 0.007M (18/82) que contiene además 1% de ácido acético glacial y 0.035 % de trietilamina. (Sistema cromatográfico 2)

Estas condiciones cromatográficas no permitieron una buena resolución entre los compuestos endógenos provenientes del plasma y la Hidroclorotiazida, cuando se utilizaba el método de limpieza de muestra antes descrito. (FIGURA 7)

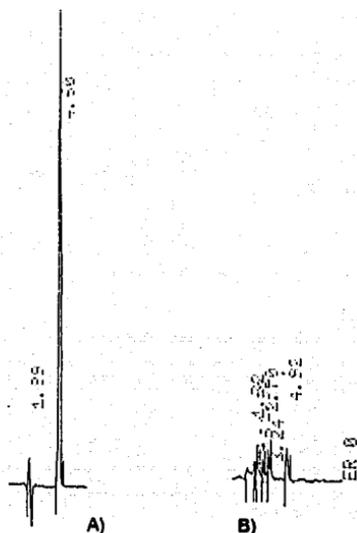


FIGURA 7 Sistema cromatográfico 2 A) Hidroclorolazida, 300 ng/mL; B) Blanco de plasma.

Campins y colaboradores (24) publicaron un trabajo donde utilizan propilamina como contralón a una concentración de 1.4 mL/L, además la fase móvil está amortiguada con una disolución de fosfatos a pH 3. La composición de la fase móvil es acetonitrilo : disolución de fosfatos en proporción 15:85. por otro lado la bibliografía indica que a medida que se incrementa la concentración del contralón, la retención disminuye; con base en estos argumentos, se decidió incrementar la concentración de trietilamina a 3.7 mL por litro de fase móvil, eliminando el uso de heptanosulfonato de sodio, con el fin de separar la Hidroclorolazida de los compuestos endógenos provenientes del plasma; al cambiar a este sistema cromatográfico fue necesario tomar ciertas precauciones para proteger a la columna; se encuentra reportado que las aminas cuaternarias usadas en altas concentraciones pueden solubilizar la base de sílice de la columna; así que para disminuir este efecto, se colocó una precolumna antes del inyector para prevenir que se solucible el empaque de la columna analítica, mediante la saturación de la fase móvil con sílice(7)

Con este sistema cromatográfico se consiguió la cuantificación de Hidroclorotiazida en el intervalo dinámico establecido, sin que existan interferencias por parte del metabolito o de sustancias endógenas provenientes del plasma. En los sistemas cromatográficos probados anteriormente se observó que existía gran variación en los tiempos de retención de Hidroclorotiazida, lo cual originaba problemas en la reproducibilidad del método. Esto era debido a que el soluto y el contralón se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria, dependiendo del pH de la fase acuosa. Si la fase móvil no se encuentra amortiguada, dicha distribución no ocurrirá de manera regular (7). La fase móvil a la que se llegó finalmente tiene la ventaja de se encuentra amortiguada, lo cual se refleja en tiempos de retención con variaciones mínimas. (Sistema cromatográfico 3, ver FIGURA 8)

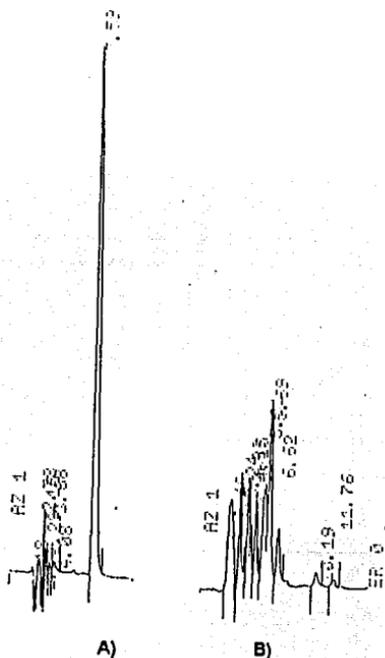


FIGURA 8. Sistema cromatográfico 3. A) Hidroclorotiazida 300ng/mL B) Blanco de plasma

Al realizar experimentos de limpieza de muestra, utilizando plasmas provenientes de diferentes sujetos, se observó que en algunos de ellos se presentaba un pico que interfería con Hidroclorotiazida; el tiempo de retención de este compuesto endógeno era modificado por la concentración del contrólón, así como por la temperatura de la columna, por lo que con el fin de prevenir un deterioro de la columna por efecto de la trietilamina, además de optimizar la separación, se decidió observar el comportamiento de Hidroclorotiazida y los picos provenientes de sustancias endógenas del plasma, variando la concentración de la trietilamina. Las concentraciones probadas de trietilamina fueron 8 mL/L, 5 mL/L, 1 mL/L y 0.5 mL/L. Se observó que el cambio en la altura y en la forma del pico de Hidroclorotiazida no son significativas al modificar la concentración de trietilamina; además, se observan variaciones en el tiempo de retención del pico que proviene del plasma, y no en el tiempo de retención de Hidroclorotiazida. Esto hace pensar que la trietilamina favorece la resolución entre la Hidroclorotiazida y el compuesto proveniente del plasma mediante la formación de un par iónico con dicho compuesto, y no con la Hidroclorotiazida.

A una concentración de 0.5 mL/L de trietilamina, se obtiene una zona sin interferencias al tiempo de retención de Hidroclorotiazida, por lo que se eligió esta concentración; además, dado que es la concentración mas baja, el daño que pudiera causar la trietilamina a la columna será menor. (Ver FIGURA 9)

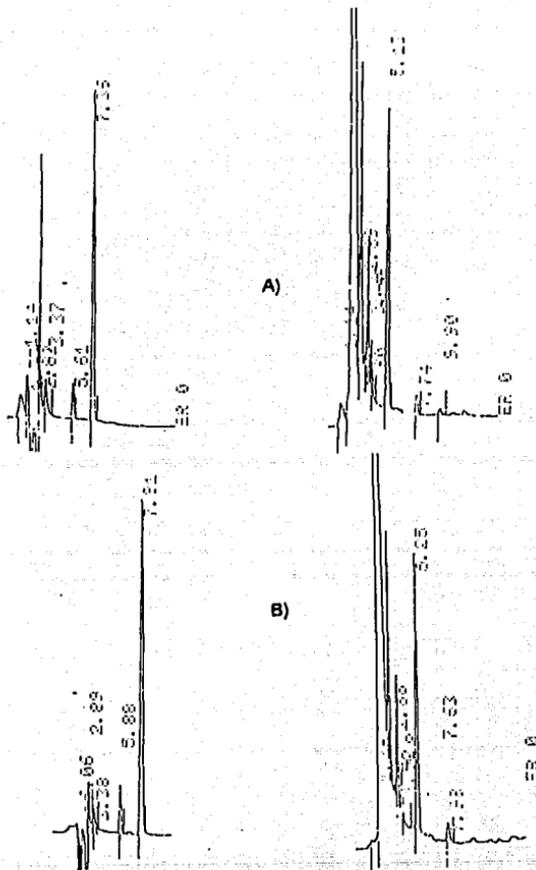


FIGURA 9. Muestras de Hidroclorotiazida y blancos de plasma, utilizando diferentes concentraciones de trietilamina en la fase móvil: A) 8 mL/L; B) 5 mL

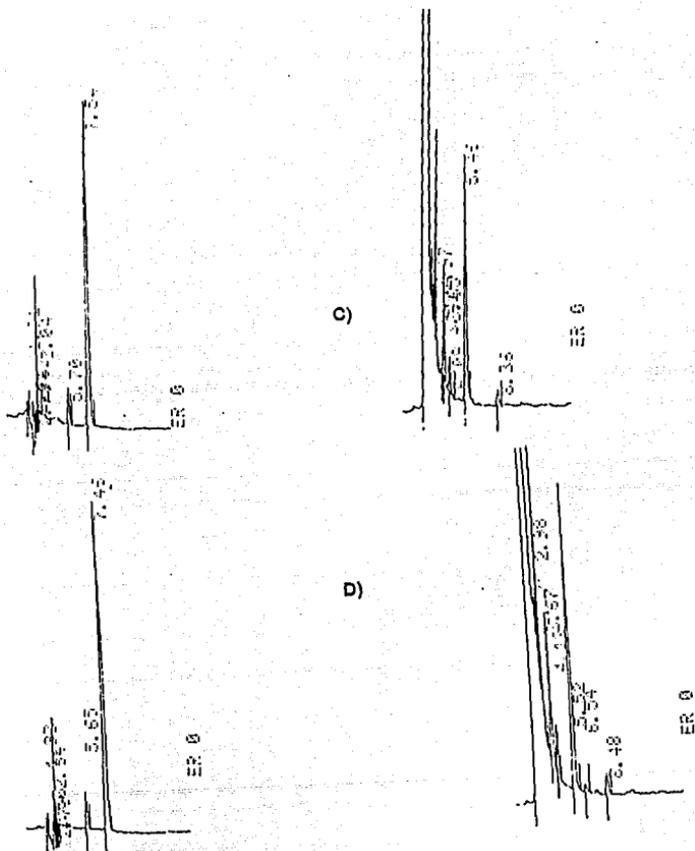


FIGURA 9. (Continuación) Muestras de Hidroclorotiazida y blancos de plasma, utilizando diferentes concentraciones de trietilamina en la fase móvil: C) 1 mL/L; D) 0.5 mL/L.

Se observó también que, en el transcurso de varias inyecciones de muestras de Hidroclorotiazida en plasma, existían cambios en los tiempos de retención de Hidroclorotiazida y del compuesto endógeno, así que se decidió controlar la temperatura de la columna; cuando esta temperatura se fijó en 28 °C, se observó consistencia en los tiempos de retención de Hidroclorotiazida y del compuesto endógeno, lográndose una adecuada separación de éstos.

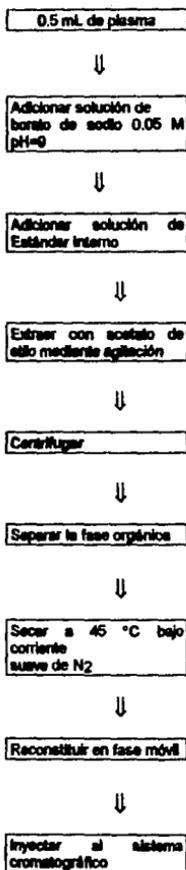
Para la selección del estándar interno, se evaluaron diferentes sustancias: salicilamida, acetanilida, 2-7, dihidrodistileno, clortalidona, sulfametoxazol, tinciazol furcaemida; de éstas, la que resultó más adecuada por el tiempo de retención que presenta en el sistema cromatográfico empleado, porque no interfiere con Hidroclorotiazida, con el metabolito o con las sustancias endógenas provenientes del plasma, y porque puede extraerse con el método de limpieza establecido, con un recobro apropiado, fue ACETANILIDA.

El método analítico fue establecido finalmente como sigue:

a) Sistema cromatográfico.

Se utiliza una columna Ultrasphere ODS C18, Beckman de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, 5µm de tamaño de partícula. La columna se mantiene a una temperatura de 28°C. La fase móvil es una mezcla de fosfato de sodio monobásico 0.05 M: Acetonitrilo (85:15) + 0.5 mL de trietilamina por litro de fase móvil, pH 3.0 a flujo de 1.2 mL/min, con detección UV a 272 nm. Para proteger a la columna de partículas que pudiera contener la muestra, se emplea una guardacolumna con insertos de tipo µBondapak C18, con tamaño de partícula de 10µm, y para evitar que la trietilamina disuelva la base de sílice de la columna se utiliza una precolumna empaçada con sílice antes del inyector.

b) **Procesamiento de la muestra.**



En la FIGURA 10 se observan cromatogramas típicos al utilizar las condiciones cromatográficas y de limpieza de muestra a las que se llegaron finalmente.

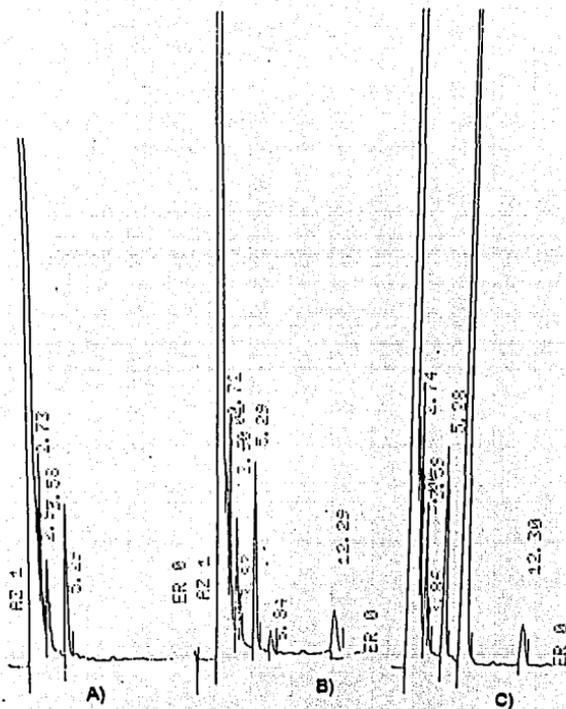


FIGURA 10. Cromatogramas típicos con las condiciones cromatográficas y de limpieza de muestra finales. A) Blanco de plasma. B) Hidroclorotiazida 600 ng/mL. C) Hidroclorotiazida 10 ng/mL.

7. VALIDACION DEL METODO.

Los criterios que se consideraron para la validación del método son:

Especificidad
Exactitud y precisión
Sensibilidad
Función respuesta
Estabilidad
Recobro.

7.1 ESPECIFICIDAD

Para la evaluación de especificidad, se analizaron plásmas provenientes de 6 sujetos sanos, voluntarios, siguiendo el método propuesto para comprobar que no existan interferencias a los tiempos de retención de Hidroclorotizida y Acetanilida (estándar interno).

Se verificó también que el metabolito de la Hidroclorotizida, el 4- amino, 6-cloro 1-3 bencendisulfonamida no interfiriera con los compuestos de interés.

Se analizaron soluciones de sustancias pudieran interferir con los compuestos de interés: clorotizida, cafeína, ácido salicílico y neprolén.

7.2 EXACTITUD Y PRECISION.

Se evaluó la precisión intradía (en un solo día) y la precisión interdía (en varios días), preparando soluciones de Hidroclorotizida en plasma, a las concentraciones de 10, 40, 150 y 500 ng/mL. Estas muestras se procesaron siguiendo el método propuesto, determinando las concentraciones respectivas mediante la interpolación de las respuestas obtenidas en la curva patrón.

Para la determinación de la precisión intradía se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las concentraciones interpoladas, procesadas por triplicado, a los cuatro niveles de concentración estudiados, considerando al método preciso si se cumple que el coeficiente de variación sea menor al 15 % (menor al 20 % a la concentración de 10 ng/mL).

Para la determinación de la precisión interdía, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las concentraciones interpoladas, procesadas por triplicado, obtenidas en diferentes días, a los cuatro niveles de concentración estudiados, considerando al método preciso si se cumple que el coeficiente de variación sea menor al 15 % (menor al 20 % a la concentración de 10 ng/mL).

La evaluación de exactitud se realizó verificando que el promedio de la concentración interpolada, en los experimentos de precisión intradía e interdía, no estuviera fuera del intervalo de $\pm 15\%$ de la concentración adicionada ($\pm 20\%$ en la concentración de 10 ng/mL)

7.3 FUNCION RESPUESTA.

Se estableció como intervalo de trabajo de 10 a 600 ng/mL de Hidroclorotizida en plasma. Para caracterizar el intervalo lineal, se procesaron por duplicado, durante cuatro días, siguiendo el método establecido, curvas patrón independientes, las cuales estaban constituidas por seis puntos dentro del intervalo de trabajo. Con los datos obtenidos se obtuvo la ecuación de la recta generada por análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (x) a la

concentración y como variable dependiente (y) a la altura relativa de Hidroclorotiazida con respecto a Acetanilida (estándar interno).

La función respuesta se evaluó verificando que el coeficiente de determinación de la recta generada no fuera menor a 0,98; además, la concentración calculada al interpolar en las curvas de calibración la respuesta obtenida (cálculo de regreso), debe cumplir con los criterios de exactitud y precisión de las muestras.

7.4 SENSIBILIDAD.

Para evaluar la sensibilidad se estableció el límite de detección y el límite de cuantificación.

Límite de detección.

Esta prueba se realizó analizando con el método propuesto, soluciones de Hidroclorotiazida a concentraciones de 5, 3 y 1 ng/mL, para determinar qué concentración produce una señal de 2 a 4 veces el ruido del sistema cromatográfico.

Límite de cuantificación.

Se estableció con la concentración de 10 ng/mL, la cual debió cumplir con el criterio de $\pm 20\%$ para precisión y exactitud.

7.5 ESTABILIDAD.

La estabilidad de la muestra se evaluó bajo diferentes condiciones:

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

Se prepararon soluciones de Hidroclorotiazida en plasma a concentraciones de 10, 40, 200 y 500 ng/mL; estas muestras se sometieron a 4 ciclos de 2 horas de congelación a -40°C seguido de 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar los ciclos, cada nivel de concentración se procesó por triplicado y las respuestas obtenidas fueron interpoladas en una curva patrón fresca, observándose que se cumplieran los parámetros establecidos para precisión y exactitud.

7.5.2 Estabilidad de la muestra en el disolvente de reconstitución

Muestras de Hidroclorotiazida en plasma a 10, 40, 150 y 500 ng/mL se procesaron para ser cuantificadas a las 0, 24, 48 horas después de permanecer en el inyector automático del cromatógrafo. La cuantificación se realizó sobre una curva patrón fresca, para determinar las variaciones ocurridas con el tiempo.

7.6 RECOBRO ABSOLUTO.

Esta prueba se realizó preparando soluciones de Hidroclorotiazida en plasma a 10, 20, 50, 100, 300 y 600 ng/mL, y procesándolas con el método propuesto. El recobro absoluto se determinó comparando la respuesta obtenida para cada concentración con la respuesta que se obtiene en soluciones de Hidroclorotiazida, a la concentración en que ésta se encuentra después de procesar las muestras (25, 50, 125, 250, 750, 1500 ng/mL), expresando esta relación en forma de porcentaje. El recobro absoluto para el estándar interno se determinó comparando el promedio de las respuestas obtenidas después de procesar las muestras, con una solución de Acetanilida a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$.

8. RESULTADOS

8.1 ESPECIFICIDAD.

En la FIGURA 11 se observan los cromatogramas correspondientes a Hidroclorotiazida, Acetanilida (estándar interno) y el metabolito de Hidroclorotiazida, así como blancos de plasma provenientes de diferentes sujetos. Como se observa en esta figura, los blancos de plasma no presentan interferencia alguna con los compuestos de interés, y el metabolito no interfiere con la Hidroclorotiazida ni con el estándar interno.

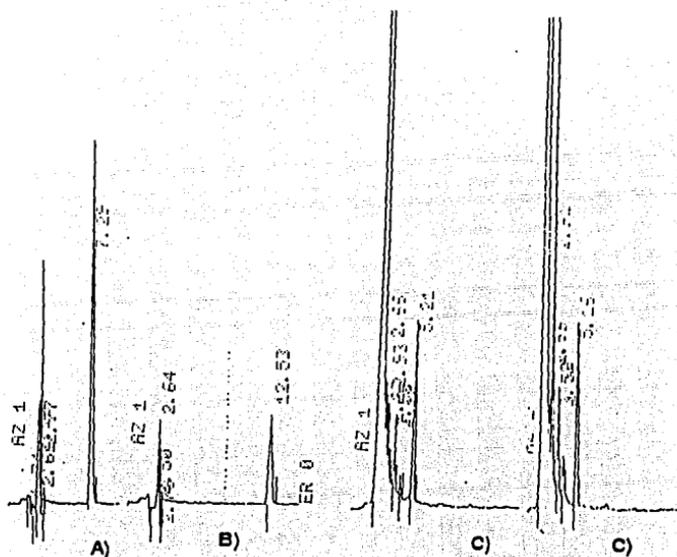


FIGURA 11. Cromatogramas representativos de A) Hidroclorotiazida, B) Acetanilida, C) Blancos de plasma provenientes de diferentes sujetos.

FALLA DE ORIGEN

En la TABLA 9 se reportan los tiempos de retención de las sustancias probadas para la evaluación de especificidad a sustancias relacionadas, observándose que ninguna de ellas interfiere con Hidroclorotiazida ni Acetanilida.

TABLA 9 Tiempos de retención de las sustancias probadas para la evaluación de especificidad a sustancias relacionadas.

NOMBRE	TIEMPO DE RETENCION (min)
Hidroclorotiazida	7.22
Acetanilida	13.1
4-amino-6-cloro-1,3-bencendisulfonamida	5.56
Clorotiazida	6.15
Cafeína	5.71
Ácido salicílico	No se detectó
Naproxén	5.8

8.2 EXACTITUD Y PRECISIÓN.

8.2.1 Precisión Interdía.

En la TABLA 10 se muestran los resultados correspondientes a Precisión Interdía, donde se observa que el máximo coeficiente de variación obtenido fue de 9,64% para la concentración de 10 ng/mL, cumpliéndose con el criterio de precisión que indica que el coeficiente de variación deberá ser menor al 15 % (menor al 20 % a la concentración de 10 ng/mL).

TABLA 10. Precisión inter día. Muestras adicionadas interpoladas en la curva patrón.

DIA	REPLICA	CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)			
		10.00	40.00	150.0	500.0
		CONCENTRACION CUANTIFICADA (ng/ml.)			
1	1	9.30	33.11	145.0	483.2
	2	9.03	37.16	156.6	489.7
	3	.	.	155.6	488.1
2	1	8.96	35.88	124.9	436.3
	2	8.85	37.81	139.1	471.0
	3	7.09	.	147.1	454.4
3	1	8.28	31.93	144.6	466.4
	2	8.67	37.79	120.1	390.7
	3	7.34	26.89	.	457.2
	n	8	7	8	9
	Promedio	8.44	35.76	141.5	460.8
	D.E.	0.81	2.31	13.23	32.28
	C.V.	9.64	6.54	9.35	7.00
	% DE ERROR	-15.6	-10.58	-5.67	-7.84

*Muestras perdidas durante el procesamiento.

8.2.2 Precisión intradía.

En la TABLA 11 Se muestran los resultados correspondientes a Precisión intradía, observándose que el máximo coeficiente de variación obtenido fue de 9.816 para la concentración de 40 ng/mL, cumpliéndose con el criterio de precisión que indica que el coeficiente de variación deberá ser menor al 15 % (menor al 20 % a la concentración de 10 ng/mL). Basándose en estos resultados, se afirma que el método es preciso.

TABLA 11 Precisión intradía. Muestras adicionadas interpoladas en la curva patrón.

REPLICA	CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)			
	10.00	40.00	150.0	500.0
	CONCENTRACION CUANTIFICADA (ng/mL)			
1	10.25	39.24	130.3	418.0
2	10.20	34.72	148.3	496.3
3	10.14	36.58	143.0	490.5
4	10.43	40.41	145.2	522.9
5	11.48	45.81	144.9	483.9
6	11.62	41.55	159.4	521.3
n	6	6	6	6
Promedio	10.69	39.72	145.2	488.8
D.E.	0.6772	3.899	9.36	38.26
C.V.	6.336	9.815	6.45	7.82
% DE ERROR	6.867	-0.7042	-3.21	-2.24

8.2.3 Exactitud.

En las tablas 10 y 11 se observa que la máxima desviación obtenida entre la concentración cuantificada con respecto a la concentración adicionada fue de 15.8%, que corresponde a la concentración de 10 ng/mL, durante la evaluación de Precisión intradía. Dado que este valor se encuentra dentro de los límites establecidos para exactitud, es decir, $\pm 15\%$ de la concentración adicionada ($\pm 20\%$ en la concentración de 10 ng/mL), se afirma que el método es exacto.

8.3 FUNCION RESPUESTA.

En la TABLA 12 se observan los resultados de los estadísticos de regresión de las curvas patrón generadas durante los experimentos de precisión y exactitud. Se observa en ésta que existe consistencia de las curvas patrón generadas, obteniéndose en todas un coeficiente de determinación mayor al 98 %.

TABLA 12. Análisis de regresión de las curvas generadas durante los experimentos de exactitud y precisión, para la cuantificación de Hidroclorotiazida en el intervalo de 10 a 600 ng/mL.

DIA	ORDENADA AL ORIGEN (A)	PENDIENTE (B)	COEFICIENTE DE DETERMINACION
1	0.070886	0.042864	0.999866
2	0.063616	0.041443	0.99503
3	0.126505	0.042052	0.968577
4	0.292062	0.042940	0.998242

En las figuras 12 a 15 se muestran las curvas patrón generadas en los experimentos de exactitud y precisión.

FIGURA 12

Evaluación de Función respuesta del método para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma. Día 1

$$y = 0.070886 + 0.042864 x$$

$$r^2 = 0.999866$$

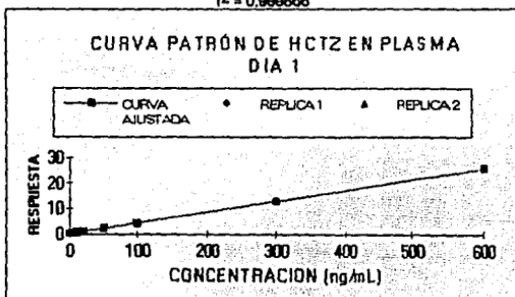


FIGURA 13

Evaluación de Función respuesta del método para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma. Día 2.

$$y = 0.063616 + 0.041443 x$$

$$r^2 = 0.999503$$

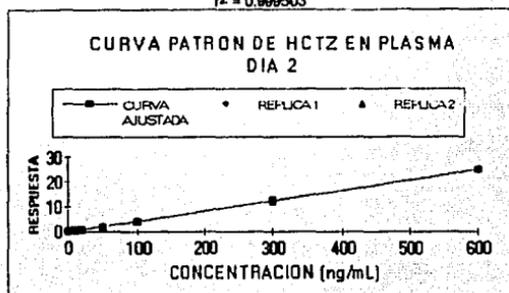


FIGURA 14

Evaluación de Función respuesta del método para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma. Día 3.

$$y = 0.126506 + 0.042052 x$$

$$r^2 = 0.998577$$

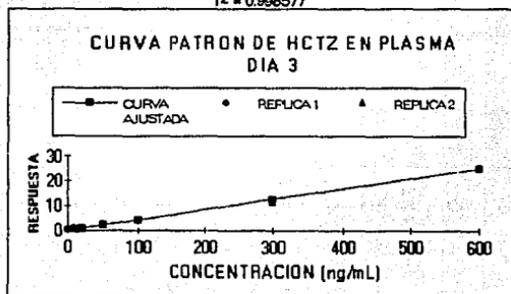
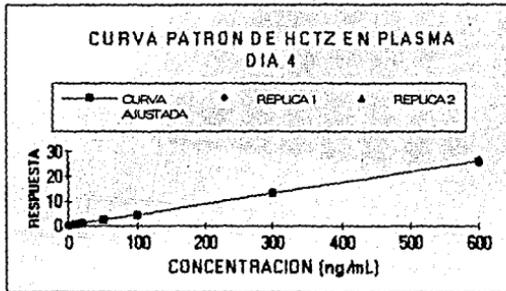


FIGURA 15

Evaluación de Función respuesta del método para cuantificar Hidroclorotiazida en plasma. Día 4.

$$y = 0.292862 + 0.042940 x$$

$$r^2 = 0.998242$$



En la tabla 13 se observan los resultados de calidad de ajuste de las curvas generadas durante la evaluación de precisión y exactitud; se observa que todos los puntos de la curva cumplen con los criterios establecidos para precisión y exactitud.

Tabla 13 Calidad de ajuste para las curvas patrón generadas durante los experimentos de exactitud y precisión, para la cuantificación de Hidroclorotiazida en el intervalo de 10 a 600 ng/mL.

DÍA	REPLICA	CONCENTRACION ADICIONADA (ng/mL)					
		10.00	20.00	50.00	100.0	300.0	600.0
		CONCENTRACION INTERPOLADA					
1	1	8.432	17.10	50.54	94.62	305.7	597.4
	2	9.017	23.13	49.62	100.5	306.8	597.2
2	1	10.88	20.88	50.72	101.3	291.0	596.3
	2	10.90	21.46	48.58	103.8	293.7	610.4
3	1	10.34	22.44	52.70	96.77	294.3	604.1
	2	9.180	22.48	56.00	103.2	276.8	609.4
4	1	10.84	22.43	44.60	85.53	290.0	581.7
	2	10.82	20.44	51.39	93.70	308.5	619.3
n		8	8	8	8	8	8
Promedio		10.05	21.30	50.52	97.43	295.8	602.0
D.E.		1.011	1.924	3.278	6.119	10.72	11.45
C.V.		10.06	9.032	6.488	6.281	3.624	1.902
% DE ERROR		0.511	6.48	10.38	-2.572	-1.383	0.3292

Con base en los resultados anteriores, se afirma que la curva patrón presenta un comportamiento lineal del tipo $y = A + Bx$ al relacionar la concentración de Hidroclorotiazida con la respuesta obtenida en el sistema cromatográfico.

8.4 SENSIBILIDAD

8.4.1 Límite de detección.

Se determinó como límite de detección la concentración de 3 ng/mL, ya que con esta concentración se observa una respuesta que es de 2 a 4 veces el ruido cromatográfico.

8.4.2 Límite de cuantificación.

Se estableció como límite de cuantificación la concentración de 10 ng/mL, pues como se observa en las tablas 10, 11 y 13, esta concentración cumple con los criterios de precisión, exactitud y función respuesta, es decir, en ningún caso se observó un coeficiente de variación mayor al 20%, ni una desviación mayor al 20% de la concentración nominal. Es además, la concentración más baja considerada en el intervalo lineal. (Ver FIGURA 16)

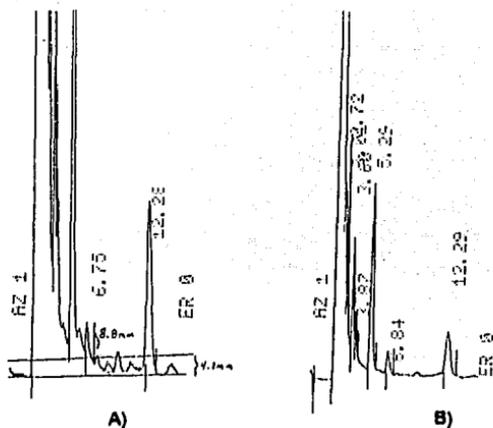


FIGURA 16. Cromatogramas de Hidroclorotiazida en plasma A) Cantidad mínima detectable (3 ng/mL). B) Cantidad mínima cuantificable (10 ng/mL).

8.5 ESTABILIDAD

8.5.1 Estabilidad a ciclos de congelación - descongelación.

En la TABLA 14 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de estabilidad de la muestra después de ser sometida a 4 ciclos de congelación-descongelación, encontrándose que se cumplen con los parámetros establecidos de precisión y exactitud.

Por lo tanto se considera que las muestras de Hidroclorotiazida son estables a las condiciones antes mencionadas.

TABLA 14 Estabilidad de Hidroclorotiazida a ciclos de Congelación-Descongelación

Réplica	Concentración adicionada ng/ml			
	10.00	40.00	150.0	500.0
	Concentración cuantílic.			ng/ml.
1	11.06	39.59	131.9	484.0
2	11.27	40.25	131.0	489.1
3	10.20	39.30	143.7	*
n	3	3	3	2
Promedio	10.84	39.71	135.5	486.5
C.V.	0.56	0.488	7.08	3.597
D.E.	5.19	1.229	5.23	0.74
Porcentaje de error	8.4	-0.725	-10.00	-2.700

*Muestra perdida durante el procesamiento

8.5.2 Estabilidad de la muestra en el disolvente de reconstitución.

Los resultados de la cuantificación de Hidroclorotiazida durante la evaluación de estabilidad en el disolvente de reconstitución se observan en las figuras 17 a 20, donde se aprecia que la Hidroclorotiazida es estable a 48 horas en el inyector lista para su análisis.

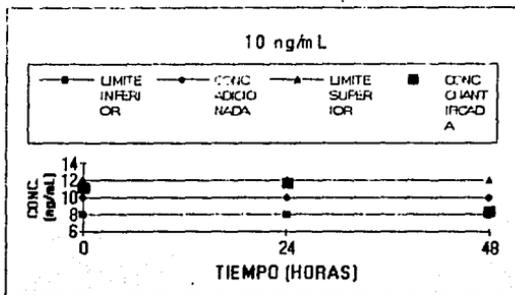


FIGURA 17. Estabilidad de Hidroclorotiazida en el disolvente de reconstitución por un periodo de 48 horas (10 ng/mL)

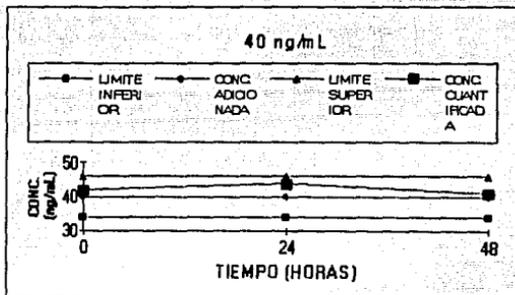


FIGURA 18. Estabilidad de Hidroclorotiazida en el disolvente de reconstitución por un periodo de 48 horas (40 ng/mL)

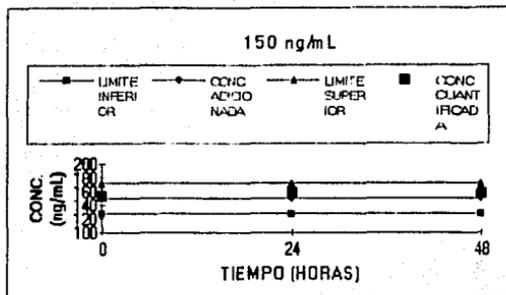


FIGURA 19. Estabilidad de Hidroclorotiazida en el disolvente de reconstitución por un periodo de 48 horas (150 ng/mL)

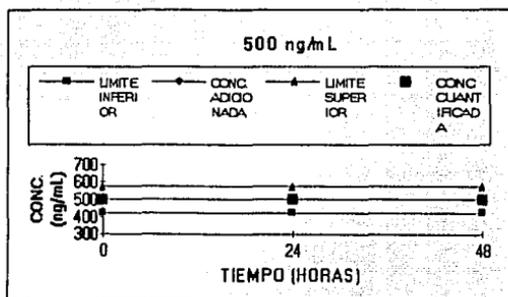


FIGURA 20. Estabilidad de Hidroclorotiazida en el disolvente de reconstitución por un periodo de 48 horas (500 ng/mL)

8.6 RECOBRO ABSOLUTO.

En la tabla 14 se presentan los resultados de recobro absoluto de Hidroclorotiazida. El recobro promedio fue de 87.20%, variando de 79.77 a 98.12 %.

El recobro absoluto de acetanilida se reporta en la tabla 15 donde se observa que el recobro promedio fue de 80.77%.

TABLA 14 Recobro absoluto de Hidroclorotiazida en plasma.

REPLICA	CONCENTRACION DE SOLUCIONES ACUOSAS DE HCTZ (ng/mL)					
	25	50	125	250	750	1500
	RESPUESTA DE HCTZ EN SOLUCIONES ACUOSAS					
1	325	737	1949	3647	11672	23621
2	325	632	1684	3367	10081	21293
3	341	671	1803	3556	10512	21547
4	320	647	1779	3575	10808	21077
5	335	679	1783	3505	10476	20936
n	5	5	5	5	5	5
Promedio	329	673	1798	3590	10710	21695
D.E.	0.956	40.29	98.67	215.5	598.8	1101
C.V.	2.999	5.985	5.384	6.003	5.572	5.078
REPLICA	CONCENTRACION DE SOLUCIONES DE HCTZ EN PLASMA (ng/mL)					
	10	20	50	100	300	600
	RESPUESTA DE HCTZ EN SOLUCIONES PLASMATICAS					
1	345	624	1331	2484	8538	15616
2	296	621	1437	2899	9255	17189
3	331	596	1532	2680	8736	16536
4	331	656	1511	3005	9391	18579
5	312	675	1636	3051	9775	19843
n	5	5	5	5	5	5
Promedio	323	634	1489	2964	9139	17953
D.E.	19.12	31.13	113.6	224.0	501.9	1609
C.V.	5.919	4.908	7.626	7.822	5.492	8.990
% DE RECOBRO	98.12	94.24	82.95	79.77	85.33	82.75

RECOBRO PROMEDIO: 87.20 %

TABLA 15 Recobro absoluto de Acetanilida (estándar interno) en plasma

	RESPUESTA ACETANILIDA EN SOLN ACUOSA	DE EN SOLN	RESPUESTA DE ACETANILIDA EN PLASMA
n	30		30
Promedio	993		802
D.E.	57,3		38,1
C.V.	5,777		4,757
% DE RECOBRO.	80,77		

CONCLUSIONES.

Con base en el análisis de las características de Hidroclorotiazida y en el trabajo experimental realizado, se consiguió llegar a un método analítico para cuantificar Hidroclorotiazida por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), utilizando Acetanilida como estándar interno. Este método podrá ser utilizado en un estudio de Bioequivalencia.

El método desarrollado proporciona las condiciones cromatográficas y de limpieza de muestra que permiten separar la Hidroclorotiazida de los compuestos endógenos del plasma y de su metabolismo, obteniéndose así una adecuada cuantificación de la Hidroclorotiazida.

Este método permite la cuantificación de Hidroclorotiazida sin que existan interferencias de compuestos endógenos provenientes de plasma, del 4-amino-6-cloro-1,3-benzocdisulfonamida, así como de sustancias relacionadas como clorotiazida, cafeína, ácido salicílico y naproxén.

El método es exacto y preciso, pues cumple con los criterios de validación de Métodos Analíticos aceptados internacionalmente.

La Hidroclorotiazida se cuantificó con este método, en el intervalo lineal de 10 a 800 ng/mL, presentando una función lineal del tipo $y = A + Bx$.

A la concentración de 10 ng/mL, la Hidroclorotiazida se puede cuantificar de manera confiable, alcanzándose a detectar hasta 3 ng/mL.

Las muestras de Hidroclorotiazida son estables a 4 ciclos de congelación-descongelación, y después de 48 horas en el inyector, una vez que fueron reconstruidas.

El recobro de Hidroclorotiazida es de alrededor de 87%; el recobro de su estándar interno es de 80.7%.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFÍA

1. Welling Peter, Tee Francis, Dughe Shrifant, Pharmaceutical Bioequivalency. Marcel Dekker, INC, 1991 USA
2. Chamberlain Joseph. Analysis of Drugs in Biological Fluids. CRC Press INC, 1987, USA
3. Jonsson Jan Åke Chromatographic Theory and Basic Principles. Marcel Dekker, INC., 1987
4. Skoog D.A. West D.M. Analysis Instrumental. Mc. Graw Hill, 1989, México
5. The United States Pharmacopeia. Twenty-third Edition (USO XXIII)(1995). The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, M.D. USA
6. Snyder Lloyd R. Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons. 1988 USA
7. Millon T.W. Hearn. Ion-Pair Chromatography. Marcel Dekker, INC., 1985, USA
8. James W. Munson Pharmaceutical Analysis, Modern Methods, Part B Marcel Dekker, INC, 1984 USA
9. Finley Klaus Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 10, Academic Press INC, USA, 1981
10. Chloro-amination and Identification of drugs. The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1986, The Pharmaceutical Press England.
11. Pharm Sci, 58.5 (1980)
12. Goodman Gilman A, Rail Theodore W. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Médica Panamericana, Octava Edición, México, 1991.
13. Liter Manual Farmacología Clínica y Experimental. El Ateneo, Séptima Edición, México, 1985
14. Reynolds E.F.(Editor) Martindale, the extra pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press, (1989), 23ª edición, Londres
15. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ediciones PLM, 1989, 36ª edición, México
16. Pharm Sci, 73, 3, (1984)
17. Pharm Sci, 74, 7, (1985)
18. Pharm Sci, 71,2, (1982)

FALLA DE ORIGEN

19. Pharm. Sci. 70,3, (1981)
20. Chromatogr., 307. 445, (1984)
21. Chromatogr., 423. 351, (1987)
22. Analytical Toxicology 14, 84, (1990)
23. Chromatogr., 532. 108, (1990)
24. Chromatogr., 612. 245, (1993)
25. Chromatogr., 411. 325, (1987)
26. Biopharmaceutics and Drug Disposition, 12, 47, (1991)
27. Analytical Chemistry, 48, 8, (1976)
28. Talanta, 34, 7, (1987)
29. Pharm. Res. 8, 4, (1991)
30. Pharm. Res. 9, 4, (1992)
31. Clin. Res. Practices & Drug Reg. Affairs. 5, 1, (1987)