



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



31
29

**“ Manejo de Fármacos en Fluidos Biológicos y su
Cuantificación por Cromatografía de Líquidos
de Alta Resolución ” (CLAR).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LAURA MARQUEZ NOYOLA

ASESOR: D.F.B. JOSE A. GARDUÑO ROSAS

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo
"Manejo de Fármacos en Fluidos Biológicos y su Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución"

que presenta la pasante: Laura Márquez Moyola
con número de cuenta: 8209123-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de AGOSTO de 1995

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Maricela Noé Martínez</u>	<i>Maricela Noé</i>
VOCAL	<u>M.enC. Luisa Martínez Aguilar</u>	<i>L.M.A.</i>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	<i>J.A.G.R.</i>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Elia Granados Enriquez</u>	<i>E.G.</i>
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Rebollier Barrera</u>	<i>G.R.B.</i>

**MANEJO DE FARMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS Y SU
CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).**

DEDICATORIA

A mi Madre (QEPD) no sólo por darme la vida, sino por enseñarme a vivirla en la fortaleza, la honestidad y la lucha contra la adversidad.

A mi Padre y mis Hermanos, María Guadalupe, José, Isela y María Eugenia. Por estar conmigo en los peores momentos a pesar de todo.

A Jorge por enriquecer mi vida, por su impulso, su apoyo y su comprensión. Por nuestros sueños y por el futuro.

A mis sobrinos José Alberto y Alejandro. Porque a través de ellos redescubrimos la vida y su sonrisa lo alivia todo.

A mis amigos Leticia, Claudia, Alfonso, María Luisa, Héctor y Angelina. Por su alegría, por su apoyo y por todos los momentos gratos.

Al M. en C. José Juárez Ayala cuya idea original generó la realización de este trabajo.

A todos los profesores que con su dedicación hacen posible que nosotros avancemos. En especial a la Profa. Cristina Reyes y al Prof. Moisés Huerta (QEPD).

A mi querida escuela por todo lo que nos ha brindado.

INDICE

Objetivos	5
Introducción	7
Definiciones	11
Capítulo 1. La Muestra, proceso de adquisición	21
1.1 Selección del sujeto sano voluntario	22
Edad	23
Sexo	23
Peso y morfotipo	24
Interferencia de fármacos	25
Efecto de la dieta	26
Efectos genéticos	26
Otros efectos	27
1.2 Administración del medicamento o forma farmacéutica	28
Administración oral	28
Administración rectal	29
Administraciones intravenosa e intraarterial	29
Administraciones intramuscular y subcutánea	29
Administración por inhalación	30
Elección de las modalidades de toma	30
Posología	32
Modalidades de toma	33
1.3 Toma de la muestra de fluido biológico	34
Sangre	34
Saliva	35
Bilis	38
Orina	39
Heces	40
1.4 Conservación, mantenimiento y transportación de la	41
muestra de fluido biológico.	
Sangre	41
Saliva	44
Bilis	45
Orina	45
Heces	46
Capítulo 2. Procedimiento de recepción de muestras de	47

fluidos biológicos.	
Solicitudes	48
Control de calidad	50
Control de calidad interno	51
Control de calidad externo	52
Capítulo 3. Etapa previa al análisis	53
3.1 Diseño de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos de fluidos biológicos.	54
Revisión bibliográfica	54
Ruptura de los conjugados del fármaco	56
Procedimientos de limpieza	57
Procedimientos estándar de laboratorio	57
Precipitación	57
Filtración y sedimentación	58
Evaporación	58
Liofilización	59
Extracción	59
Extracción en fase sólida	64
Formación de derivados	68
Switching de columna	82
Técnicas misceláneas	88
Extracción en fluido supercrítico	88
Cromatografía miscelar	87
Saponificación	87
3.2 Desarrollo de métodos analíticos para la cuantifi- cación de fármacos en fluidos biológicos.	88
3.3 Validación	90
Linealidad del sistema	91
Linealidad del método	91
Exactitud	95
Precisión	96
Reproducibilidad	96
Límite de detección	97
Límite de cuantificación	97
Especificidad	98

Estabilidad	99
Tolerancia	99
Capítulo 4. Etapa de Análisis	101
Capítulo 5. Adquisición y evaluación de datos cromatográficos.	106
Método de estándar externo	109
Método de estándar interno	113
Método de adición de estándar	113
Capítulo 6. Destino final de los resultados	119
Biodisponibilidad	120
Regla del trapecoide	122
Método de la integración	124
Métodos físicos	126
Bioequivalencia	127
Farmacocinética	129
Volumen de distribución aparente	134
Depuración	135
Cinéticas de primer orden	137
Conclusiones	139
Bibliografía	142

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los diferentes procedimientos en el manejo de los fármacos contenidos en muestras de fluidos biológicos y la cuantificación por CLAR para su aplicación en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1) Exponer las opciones de obtención de muestras de fluidos biológicos, los cuidados que deben tenerse, y resaltar la importancia de esta etapa para una cuantificación exitosa del fármaco.

2) Apreciar la importancia que tiene la adecuada recepción de las muestras de fluidos biológicos siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) para evitar errores analíticos.

3) Exponer las diferentes técnicas de extracción, concentración o recuperación de los fármacos a partir de sus matrices biológicas, para aplicarlas en el diseño de métodos analíticos.

4) Resaltar los cuidados al aplicar un método de CLAR para fármacos en fluidos biológicos de acuerdo a las BPL.

5) Explicar el tratamiento de datos obtenidos durante la cuantificación de fármacos en muestras de fluidos biológicos.

6) Enfocar el manejo y cuantificación por CLAR de fármacos en fluidos biológicos hacia los estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética.

INTRODUCCION

La primera investigación de biotransformación de fármacos fue realizada en la segunda mitad de este siglo, comenzando con la Quinina en 1869 (1). La farmacocinética es una ciencia más reciente y sus orígenes pueden ser por el año de 1934 cuando L. S. Long y W. G. Winkler y colaboradores sobre la eliminación del alcohol fueron publicadas (2). En ambos casos, los progresos en los descubrimientos fueron lentos hasta el fin de la Segunda Guerra Mundial, después, una explosiva emergencia de metodología analítica moderna produjo una fantástica aceleración de las investigaciones del destino de los fármacos en el organismo (3).

De ese desarrollo de metodologías, surgió la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, una técnica realmente útil en el monitoreo de los fármacos en Fluidos Biológicos. Además de su alta eficiencia, tiene una gran versatilidad porque puede acoplarse a otras técnicas (extracción, filtración, etc.), a diversos detectores para aumentar la sensibilidad (de fluorescencia, UV-VIS, etc.) y al desarrollo actual de integradores, computadoras y automatizadores, sin olvidar que opera bajo diversos conceptos de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico, etc.) (3).

Sin embargo, a pesar de todo este desarrollo en metodologías, en México el proceso ha sido lento, porque sólo recientemente es que se ha reconocido la importancia de los estudios de fármacos en fluidos biológicos. En la actualidad se ha incrementado la necesidad de estos estudios por los problemas relacionados a: la biodisponibilidad y bioequivalencia, al abuso de fármacos, la farmacocinética (2) y al desarrollo de nuevos fármacos (4,5); seguidos del énfasis que se ha venido dando a la regulación de los fármacos para que cumplan con la eficiencia esperada y evitar que lleguen a ser tóxicos (6) en la cantidad administrada, ya que en la determinación de la posología, los estudios biofarmacéuticos también juegan un papel muy importante.

El principal problema que afecta a este tipo de estudios, es encontrar a un Profesional ampliamente capacitado para resolver los problemas que se presentan en el diseño y desarrollo de un análisis biofarmacéutico. El análisis de fármacos y de sus productos de

biotransformación en especímenes fisiológicos requiere de consideraciones detalladas en tres niveles:

1) La metodología requerida en la colección, almacenamiento y preparación de una muestra antes del análisis. Esta etapa puede ser decisiva para los resultados correctos o erróneos que se obtengan en la investigación, ya que una muestra tomada de manera errónea, a destiempo ó tratada incorrectamente, puede conducir a errores en el análisis o a la pérdida de información.

2) La selección y evaluación de la técnica analítica óptima. Esta última, además de ser adecuada, debe dar un buen nivel de recobro, ser sensible, selectiva y no consumir demasiado tiempo por la gran cantidad de muestras que se analizan en una sola vez (1). En este contexto, el principal problema es la complejidad de las muestras biológicas, que dificulta poder aislar el fármaco para cuantificarlo (8); en ocasiones se consigue un buen nivel de recobro para el analito, pero la reproducibilidad del método difícilmente se logra. Por eso en este trabajo se dan variadas opciones a las que se puede recurrir para lograr una buena limpieza de las muestras.

3) El manejo e interpretación de los resultados obtenidos de la técnica analítica. En la actualidad muchos prefieren la automatización por lo que el tratamiento de la información lo realizan por medio de computadoras (7).

Atendiendo a la complejidad de un estudio biofarmacéutico, se puede ver que para efectuarse, se necesita contar con profesionistas que tengan amplio conocimiento en clínica, metodología analítica, bioquímica, farmacología, química orgánica, instrumentación, diseño, desarrollo, estadística, y estar al tanto de las regulaciones que rigen tales estudios.

El objeto del presente trabajo es reunir la información necesaria sobre los diferentes procedimientos para el diseño y desarrollo del bioanálisis con información actualizada; de manera que el Profesionista interesado en ello pueda encontrar fácilmente tal información ahorrando de esta manera tiempo que resulta esencial en cualquier estudio.

Se han preparado los capítulos de manera progresiva como modelo de los pasos en que de manera común se realizan estos estudios.

DEFINICIONES

CROMATOGRAFIA (200).

La cromatografía es un proceso basado en la distribución diferencial de una mezcla de sustancias entre dos fases, una de las cuales pasa a través de la otra.

Una de estas fases se determina como fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, o un sólido finamente dividido, ó un líquido que ha sido enlazado a algún soporte de material inerte. La fase móvil puede ser un líquido (puro ó una solución) o un gas (puro ó una mezcla homogénea).

Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se determina cromatografía de adsorción. Si la fase estacionaria es líquido el proceso se determina cromatografía de partición. La diferencia entre la cromatografía de adsorción y la cromatografía de partición radica en la naturaleza de las fuerzas que determina la distribución del soluto entre las dos fases.

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil pasa sobre la fase estacionaria, acarreado en ella el compuesto disuelto. La velocidad a la cual el soluto se mueve o se separa depende de los diferentes grados de afinidad que el soluto tiene por la fase estacionaria.

En la cromatografía de partición, una matriz porosa, como la celulosa o la sílica gel, inmoviliza una capa de solvente, lo que conforma la fase estacionaria. La fase móvil pasa sobre la matriz, y la solubilidad relativa de los compuestos en las dos fases líquidas es el factor que controla el proceso de separación.

La cromatografía de intercambio iónico, generalmente se clasifica separadamente. Aunque esta emplea una fase sólida, la adsorción de la interfase sólido-líquido no es el fenómeno primario. En este caso, el intercambio de iones o electrones es el factor más importante. Los efectos de adsorción y de partición operan en muchas instancias, y no es un sólo factor el que gobierna el proceso cromatográfico entero.

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR) (290).

En años recientes el término cromatografía líquida ha sido aplicado a una variedad de técnicas cromatográficas en las que una fase móvil líquida pasa sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna. El soporte sólido puede ser la fase estacionaria por sí sola (como es el caso de la de adsorción, intercambio iónico, de exclusión estérica o afinidad cromatográfica), o puede estar un líquido retenido sobre la fase estacionaria como en el caso de la cromatografía de partición en columna.

Los sistemas de alta presión para líquidos que se necesitan para estas separaciones han hecho que se les asigne el término de cromatografía de líquidos de alta presión, o más recientemente cromatografía de líquidos de alta resolución, así llamada por el gran número de platos teóricos que usualmente se encuentran.

BIODISPONIBILIDAD (9).

Biodisponibilidad se define tanto como la cantidad relativa de fármaco, proveniente de una forma de dosificación administrada, que entra a la circulación sistémica así como a la velocidad en la cual el fármaco aparece en la corriente sanguínea.

La biodisponibilidad es una característica del medicamento administrado a un sistema biológico intacto.

Indica simultáneamente:

- * Según qué cinética, y
- * según qué proporción, respecto a la dosis administrada, un principio activo llega a la circulación general.

Así pues, la biodisponibilidad comprende dos aspectos distintos: velocidad e intensidad.

En esta definición, el medicamento es la forma farmacéutica que contiene el principio activo y el sistema biológico se considera como un organismo entero.

De todo esto se deduce:

- * Que un estudio de biodisponibilidad consiste en una evaluación de las características cuantitativas y cinéticas de un medicamento administrado a un organismo concreto.

* Que un estudio de biodisponibilidad excluye la utilización de montajes "in vitro" (fragmentos del organismo, en particular conducto digestivo; aparatos para el estudio de la disolución de un principio activo o para el estudio de su paso a, o a través de, una fase lipófila).

* Que el estudio de los factores capaces de modificar la disponibilidad de un principio activo es un estudio biofarmacéutico

BIOEQUIVALENCIA (9).

La bioequivalencia de un medicamento se cumple si la extensión y la velocidad de absorción no es significativamente diferente, hablando en términos estadísticos, de un medicamento de biodisponibilidad comprobada cuando se administran a la misma dosis molar.

La noción de equivalencia de medicamentos se aplica solo a las distintas formas farmacéuticas de un mismo principio activo y no puede ser generalizada a diferentes principios activos aunque sean de una misma clase terapéutica (p. ej. antibióticos β -lactámicos).

Se pueden distinguir diferentes tipos de bioequivalencia, a saber:

* La *equivalencia farmacológica*, que corresponde a la incorporación en dos medicamentos de moléculas químicamente distintas, pero que conducen a una misma actividad intrínseca que indica la presencia "in vivo" de un mismo sustrato molecular activo. Las sales o los ésteres de un mismo principio activo poseen esta equivalencia, en la medida en que una parte de la actividad no es imputable al agente salificante o esterificante. Un metabolito activo común, procedente de dos moléculas inactivas por sí mismas, puede, teóricamente, asegurar esta equivalencia.

* La *equivalencia química*, que corresponde a la incorporación, en dos medicamentos destinados a una vía de administración común, de una dosis nominal idéntica del mismo principio activo. En general, la forma farmacéutica de estos medicamentos es parecida (cápsulas y comprimidos, por ejemplo) y cumple las mismas normas físico-químicas oficiales (valoración del principio activo y tiempo

de disgregación, por ejemplo).

* La *equivalencia farmacéutica*, que corresponde a la incorporación, en dos formas farmacéuticas de la misma especie, de una dosis nominal idéntica del mismo principio activo. Estos equivalentes deben satisfacer por otra parte, el conjunto de las normas oficiales presentadas o susceptibles de ser establecidas a nivel de la farmacopea (cinética de liberación "in vitro" del principio activo, por ejemplo).

* La *equivalencia biológica o bioequivalencia*, que corresponde a medicamentos, equivalentes químicos o farmacéuticos, que, a la misma posología y según los niveles sanguíneos del principio activo, presentan criterios de biodisponibilidad idénticos en un mismo individuo.

* La *equivalencia clínica o terapéutica*, que corresponde a medicamentos equivalentes farmacológicos, químicos o farmacéuticos, que conducen, con una posología idéntica, a la misma eficacia terapéutica controlada (o a la misma toxicidad) en un mismo individuo.

FARMACOCINETICA (8,9).

Estudio cronológico de los fenómenos que rigen los cambios in vivo de los principios activos (absorción, distribución, excreción y biotransformación) y de las respuestas biológicas correspondientes (farmacológica, biológica, tóxica, terapéutica).

Los cambios "in vivo" son, por regla general, cualitativamente constantes para un principio activo y para una especie receptora dados, pero pueden ser cuantitativamente variables, no sólo según las propiedades fisicoquímicas de los distintos fármacos y según la fisiología de las distintas especies, sino también en el seno de una misma especie, en función del estado fisiopatológico del organismo receptor. El estudio farmacocinético de un principio activo consiste en la identificación y cuantificación de su paso por el organismo y ello conduce a los modelos paramétricos descriptivos.

Esquemáticamente, los cambios que sufre un fármaco en el

organismo puede resumirse en cuatro etapas: Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción, que constituyen el sistema designado clásicamente por las siglas: A.D.B.E. (Fig. A).

Es preciso prestar atención al hecho de que las 4 etapas que constituyen esta secuencia a nivel molecular pueden ser simultáneas desde un punto de vista macroscópico y todo fenómeno analizado a este nivel será, en realidad, la superposición de las 4 etapas.

La fase farmacocinética, cuyos principales parámetros se resumen en el cuadro B, está estrechamente relacionada, al igual que la fase farmacodinámica, con los factores que dependen del individuo y existe una acción permanente entre los factores fisiopatológicos del cuadro C y los parámetros del cuadro B.

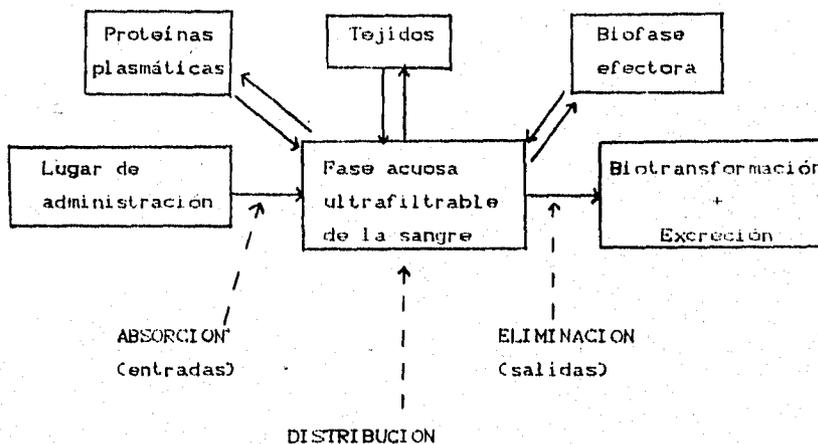
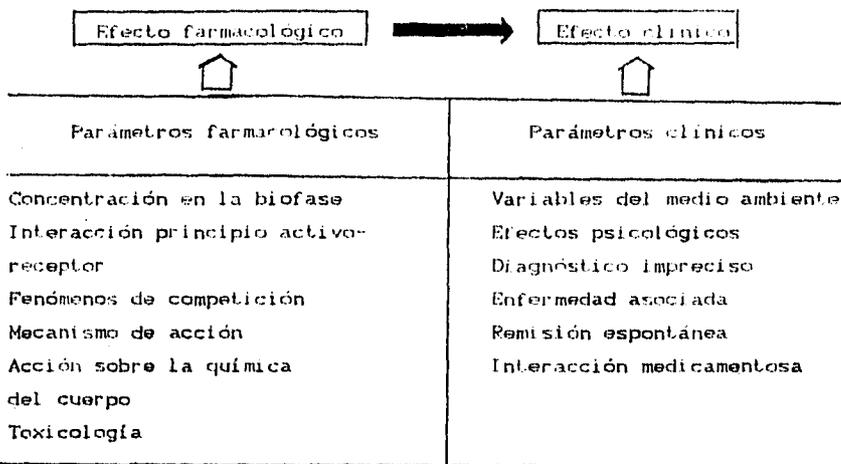


Fig. A. Farmacocinética de los cambios in vivo de un fármaco: sistema ADDE.



Cuadro B. Parámetros directos de la fase farmacocinética de la evolución in vivo de un fármaco.

Raza	Posición del cuerpo	pH urinario
Sexo	Actividad relativa	Flujo urinario
Edad	Estado nutricional	Flujos sanguíneos
Morfología	Gestación	Medio ambiente
Farmacogenética	Menopausia	Patología
Cronofarmacología	Temperatura	Efecto no específico y placebos

Cuadro C. Factores fisiopatológicos que influyen en las fases farmacocinética y farmacodinámica de la evolución in vivo de un fármaco.

MEDICAMENTO (9).

Preparación farmacéutica que resulta de la incorporación de una cantidad exactamente medida de un principio activo (o varios) en el seno de una forma farmacéutica. Esta definición, distinta de la definición oficial de un medicamento (Código de Sanidad, OMS).

es típicamente biofarmacéutica: corresponde a la preparación administrada intacta y posee por este hecho, una biodisponibilidad que le es propia y que la caracteriza de la misma manera que la cantidad nominal del principio activo.

PRINCIPIO ACTIVO O FARMACO (9).

Sustancia que posee, por ella misma o debido a sus metabolitos, propiedades farmacodinámicas (o físicas) susceptibles de aplicaciones terapéuticas (o diagnósticas) y administradas como tal bajo forma de medicamento.

FORMA FARMACEUTICA (9).

Resultado de haber realizado varias operaciones farmacéuticas sobre los principios activos asociados o no a los excipientes.

ABSORCION (9).

Fenómeno de paso del principio activo (o de un metabolito) a través de una barrera fisiológica que separa al medio interno, especialmente la sangre, del lugar de administración.

DISTRIBUCION (9).

Conjunto de los fenómenos que rigen el reparto del principio activo (o un metabolito) en el organismo.

ELIMINACION (9).

Conjunto de fenómenos que conducen a la desaparición progresiva del principio activo (o de un metabolito) del medio interno.

METABOLITO (9).

Molécula resultante de la biotransformación de un principio activo.

EXCIPIENTE (9).

Sustancia, a priori farmacológicamente inerte, utilizada para

dar a una forma farmacéutica una presentación conveniente para su utilización (peso, volumen, consistencia, conservación, compatibilidad fisiológica, etc.).

FORMULACION (555).

Arte de seleccionar cualitativa y cuantitativamente los principios activos y los excipientes (naturaleza química, estado físico, caracteres organolépticos, ...) en función de la forma farmacéutica y de las operaciones farmacéuticas correspondientes.

PRODUCTO (555).

Mezcla de todos los componentes para lograr una fórmula obtenida mediante el proceso de fabricación.

BLANCO O PLACEBO (555).

Formulación o producto preparado omitiendo el analito.

SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA (555).

Sustancia patrón de la sustancia a analizar y que está certificado de acuerdo a normas oficiales.

PREPARACION DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA (555).

Es la solución de la sustancia patrón de referencia como se especifica en el procedimiento analítico.

PREPARACION DE LA MUESTRA (555).

Una formulación preparada como se especifica en el procedimiento analítico.

BLANCO O PLACEBO ADICIONADO (555).

Blanco o placebo preparado a una cantidad equivalente a la del producto, adicionado de concentraciones variables de la sustancia patrón de referencia dentro de un intervalo de concentración especificado.

EXACTITUD (555).

Es la concordancia que existe entre el valor obtenido experimentalmente y el valor verdadero.

PRECISION (555).

Es la repetibilidad de los resultados dentro de una serie de mediciones.

REPRODUCIBILIDAD (555).

Es la concordancia entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método y material de prueba, pero bajo diferentes condiciones considerando analista, reactivos y equipo.

ESPECIFICIDAD (555).

Es la selectividad del método analítico para la sustancia en estudio en presencia del blanco o placebo específico y de los productos de degradación.

CANTIDAD MINIMA CUANTIFICABLE (555).

Es la mínima cantidad a la cual el método analítico es lo suficientemente preciso para producir un estimado satisfactorio de una concentración desconocida.

CANTIDAD MAXIMA CUANTIFICABLE (555).

La concentración donde la sensibilidad comienza a cambiar, por ejemplo, la función de la curva de calibración no es lineal.

CAPITULO I
ETAPA I. LA MUESTRA, PROCESO DE ADQUISICION

1.1 SELECCION DEL SUJETO SANO VOLUNTARIO .

Los criterios de admisión del sujeto deben ser definidos con precisión. Es razonable seleccionar sujetos de edad media (por ejemplo: 20 a 50 años) y morfología normal (por ejemplo, relación peso-talla). Los criterios de las compañías de seguros o las tablas clásicas (por ejemplo: Manual Merck) pueden constituir puntos de referencia útiles.

El reclutamiento y selección del sujeto sano voluntario debe enfocarse a prevenir los eventos que, aunque raros, pueden encontrarse entre los sujetos "sanos" y ser potencialmente adversos en un estudio.

En la búsqueda de los voluntarios potenciales se envuelven tres etapas principales: (1) la revisión de todas las aplicaciones, es decir, los requerimientos que debe cubrir el sujeto, (2) historia, examen e investigación; (3) un resumen de toda esta información para cuando el método sea aplicado.

Etapas 1. Todos los voluntarios llenan un cuestionario para dar sus datos personales, médicos y sociales. Tal cuestionario se analiza para saber si la persona puede ser apta para estos estudios, o si presenta algún problema para no ingresar en los estudios.

Etapas 2. Se realiza una amplia historia clínica y examen físico (signos vitales, electrocardiograma) (10), así como química clínica, hematología (incluyendo pruebas de función renal y hepática) e investigación serológica para hepatitis B y HIV. Además debe examinarse la orina en depuración de creatinina, proteínas, glucosa, sangre, bilirrubina y uso de drogas. Se deberán de incluir todas aquellas pruebas que aseguren la normalidad de los voluntarios. Si se detectan anomalías como hipertensión, disfunción hepática o uso de fármacos se tendrá que excluir al sujeto del estudio.

Etapas 3. Entre los sujetos que han sido aceptados se les informará de los fines del estudio, todas las características del fármaco, incluyendo sus reacciones secundarias y adversas. Se les aplicará un segundo cuestionario para ampliar la historia clínica

del sujeto y revisar si no se incluye algún impedimento clínico para que no participen en el estudio y, si no existen alguna objeción, con información más capacitada, de participar en el estudio. Si el individuo no es rechazado deberá firmar un consentimiento escrito por sí mismo de su participación en el estudio (11,12,13).

Aunque clínicamente esto debería ser suficiente, la motivación de los sujetos sanos voluntarios es también importante, por lo que será necesario reafirmar ante ellos la importancia de su participación en el estudio (14).

EDAD.

La distribución y la eliminación de muchos fármacos cambian como una función de la edad (15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26). En general, la eliminación es deficiente en los recién nacidos y se mejora en bebés mayores y niños (27,28). Sin embargo, la eliminación declina con la edad (29,30,31).

La diferencia más importante relacionada con la edad se da entre los recién nacidos y los adultos (32,33,34,35). Muchos de los sistemas microsomales que intervienen en el metabolismo de los fármacos están presentes al nacer pero sus niveles son considerablemente menores que en los adultos (36,37,38,39). En general, los fármacos sujetos a la biotransformación se eliminan mucho más lentamente en recién nacidos que en adultos (40,41,42,43).

La oxidación de fármacos en recién nacidos es deficiente igual que la sulfuroconjugación y conjugación con ácido glucurónico. Se alcanzan los niveles de adulto sólo a los tres años de edad (44,45,46,47).

SEXO.

Muchos estudios demuestran la diferencia del sexo en la disposición de los fármacos (48), la naturaleza y el grado de esas diferencias dependen de la especie y el fármaco estudiado (49,50). Los andrógenos estimulan la actividad de los microsomas y de las

oxidadas (51); esa inducción se refleja en una eliminación más rápida de los fármacos en los hombres que en las mujeres, por eso es que los efectos adversos se observan con mayor frecuencia en la mujer (52).

El embarazo está asociado con retraso en el vaciamiento gástrico y disminución en la motilidad del tracto gastrointestinal. Estos cambios pueden reducir la velocidad de absorción del fármaco. El volumen disponible para la distribución del fármaco incrementa durante el embarazo por el crecimiento del útero, la placenta y el feto. El volumen plasmático y el volumen del fluido extracelular también aumenta. La concentración de las proteínas plasmáticas tienden a bajar gradualmente durante el progreso del embarazo y el enlace del fármaco a proteínas puede reducirse. La velocidad de filtración glomerular y depuración de creatininas se incrementa, lo cual hace pensar que la eliminación de ciertos fármacos puede favorecerse durante el embarazo (53).

PESO Y MORFOTIPO.

El volumen aparente de distribución de un fármaco está determinado por el espacio anatómico en el cual se distribuye y es relativo al grado de enlace vascular y extravascular. Ya que tanto el volumen total de agua corporal como de fluido extracelular, en adultos con complexión normal, es directamente proporcional al peso del cuerpo, hay una relación entre el volumen de distribución aparente y el peso corporal (54). Esta relación es más evidente en fármacos que son enlazados débilmente a proteínas en el cuerpo (55,56).

El tamaño de los órganos, su función y el flujo sanguíneo también están relacionados al peso (57,58,59), pero la relación entre la depuración del fármaco y el peso no está muy elucidado. La correlación entre la depuración de fármacos y el peso en adultos jóvenes normales no es muy conocida y no hay una guía general para relacionar la dosis de un fármaco con el peso corporal (60).

La estrecha relación entre el agua del cuerpo y la masa muscular en el peso total y la gran proporción de grasa en los

obesos, afectan la distribución de los fármacos en los diferentes compartimientos del cuerpo. La adiposidad contiene menor fluido extracelular que en otros tejidos. El espacio de distribución para fármacos polares como los antibióticos es relativamente menor en pacientes obesos. Por otro lado, el espacio de distribución relativo para fármacos muy poco liposolubles puede ser el mismo en pacientes obesos que en pacientes delgados. En resumen, el enlace de fármacos, el metabolismo y la excreción pueden modificarse en sujetos obesos (61,62).

INTERFERENCIA DE FARMACOS.

El antagonismo o potencialización de los efectos de un fármaco por otro es un fenómeno bien conocido (63,64,65,66,67). La absorción, la distribución, la excreción o la biotransformación de un fármaco puede estar afectado por la administración de un segundo fármaco llevando a diferencias en la concentración y los efectos clínicos (68,69,70,71). Existen tres fármacos que no son reconocidos como tales por la mayoría de la gente, se les encuentra de manera general en los humanos y pueden alterar el destino del fármaco: alcohol, cafeína y tabaco.

El efecto dañino del alcohol sobre el hígado humano está bien documentado. La biotransformación hepática de muchos fármacos está impedido en pacientes con cirrosis hepática. El exceso en el consumo de alcohol, también afecta la biotransformación de los fármacos aún en personas que no muestran daño en el hígado (72,73).

El humo del tabaco es una mezcla compleja compuesta principalmente de gases, pero también contiene materia particulada. La materia particulada consiste en compuestos solubles en agua como la nicotina y compuestos liposolubles incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y tal vez otros constituyentes del tabaco, son potentes inductores de ciertas enzimas metabolizantes de fármacos, particularmente la arilhidrocarburo hidroxilasa (74,75,76,77).

La automedicación debe ser nula ya que representa una forma de interferencia farmacológica (78,79,80,81,82,83,85,85,86,87).

EFEECTO DE LA DIETA.

La homogeneidad de los sujetos puede ser también afectada por los hábitos en la dieta (88,89). Los ácidos grasos libres se enlazan a sitios de la albúmina humana y pueden desplazar a fármacos enlazados ahí (90,91). Los ácidos grasos libres contenidos en los aditivos alimenticios pueden contribuir al desplazamiento de los fármacos de los sitios en que se encuentran enlazados (92,93,94,95).

Los alimentos afectan la circulación enterohepática de los fármacos y, con una administración postfármaco, puede apreciarse la relación de los ácidos biliares a través de la acción de la colecistocinina sobre la vesícula biliar (96,97). Los fármacos que se almacenan dentro de ella son vaciados en el intestino delgado y reabsorbidos para incrementar los niveles en sangre (99,99,100).

La variedad de dietas por la alimentación *ad libitum*, trae una increíble variabilidad biológica (102) debido a que los alimentos alteran la circulación enterohepática (101) y el enlace de los fármacos a las proteínas debido a la interferencia con el metabolismo enzimático por competencia con los fármacos por los sitios activos. El protocolo óptimo debe indicar la misma dieta así como alimentos al mismo intervalo de tiempo para todos los sujetos, para lograr resultados consistentes (103,104), particularmente en análisis que involucren la circulación enterohepática (105).

La falta de alimentos puede afectar los resultados. Los cambios en la dieta de proteínas, carbohidratos (106), ácidos grasos o lípidos también afectan el metabolismo de los fármacos, esto se observa principalmente en el caso de la desnutrición (107,108,109).

EFECTOS GENETICOS.

La causa principal de diferencias entre sujetos en la concentración de fármacos en sangre o plasma es la variabilidad en la biotransformación del fármaco (110,111,112,113,114). En cualquier población grande uno encuentra individuos que biotransforman un fármaco mucho más lentamente o mucho más

rápida que la mayoría de las personas (115,116,117,118,119). Esto hace evidente que los factores genéticos contribuyan sustancialmente a las diferencias entre la gente en la depuración metabólica de los fármacos (120,121,122,123,124,125,126,127,128).

OTROS EFECTOS.

Otros factores que afectan la biotransformación de los fármacos incluyen la enfermedad (129,130,131,132,133,134,135,136), el ritmo circadiano (137,138,139,140,141,142) y los compuestos químicos caseros o de origen industrial (143).

El destino de un fármaco puede estar modificado por factores de orden patológico (144,145,146,147,148,149,150) en todas las etapas de su cinética (151,152,153,154): absorción, transporte plasmático (155,156), difusión y distribución (157), degradación (158,159,160,161,162,163) y eliminación (164,165,166,167). Sus efectos pueden estar disminuidos o acrecentados aunque su disminución es menos frecuente que su incremento (168,169,170,171).

1.2 ADMINISTRACION DEL MEDICAMENTO O FORMA FARMACEUTICA.

Clásicamente la absorción medicamentosa depende directamente del paso a través de las membranas (172). Sin embargo, este no es el único factor que afecta el curso del principio activo en el organismo. Debe recordarse la importancia de la forma farmacéutica: es necesario que el principio activo esté en una forma que favorezca su paso a través de la membrana y esté solubilizado o sea solubilizable si se trata de una sustancia sólida. La solubilidad es un factor que puede ser modificado por las condiciones de pH en el lugar de absorción. La concentración del principio activo, al menos para los mecanismos de difusión pasiva, es un elemento determinante de la velocidad de absorción (173,174).

A pesar de la unidad de la estructura de la membrana y del conjunto de leyes que rigen el paso a través de ella, la absorción depende de las características anatomofisiológicas del lugar de administración y, en particular, del aporte sanguíneo que le corresponde, aunque también de la estructura conformacional del fármaco (175,176).

Este conjunto de datos deberán tenerse en cuenta para definir las modalidades de absorción mejor adaptadas al principio activo, es decir, para escoger la vía de administración (177,178,179,180,181,182).

ADMINISTRACION ORAL.

Los medicamentos introducidos en la boca pueden ser administrados por deglución -vía oral propiamente dicha- o por vía sublingual.

Los fármacos administrados por vía oral se absorben principalmente en el intestino delgado y también en el estómago (183,184,185).

Las desventajas de esta vía son la destrucción de algunos fármacos por los jugos gástricos y su inactivación a nivel del hígado (186).

VIA SUBLINGUAL. Ciertos fármacos pueden administrarse en forma

de tabletas que se colocan bajo la lengua hasta que se absorban (desaparición del sabor de fármaco). Como la absorción es directa por la mucosa, sin pasar por el tubo digestivo ni por el hígado, resulta rápida y completa (187).

ADMINISTRACION RECTAL.

Se denomina vía rectal a la administración de sustancias a través del ano en el recto con el fin de actuar localmente o bien producir efectos sistémicos luego de la absorción; esta absorción se realiza en el recto y el resto del colon. La absorción es más rápida que por vía oral, pueden emplearse fármacos que se destruyen en el estómago o/y en el intestino delgado y se evita parcialmente el pasaje por el hígado con menor inactivación del fármaco (188,189).

ADMINISTRACIONES INTRAVENOSA E INTRAARTERIAL.

La inyección intravenosa e intraarterial es la introducción de fármacos en solución directamente en la circulación por administración en la luz de una vena o arteria. En esta forma se elimina la absorción y el fármaco se mezcla primero con una pequeña cantidad de plasma formando un bolo, se diluye luego en la sangre venosa circulante, es llevada al corazón y de allí a los tejidos por la sangre arterial, de esta manera se consigue la concentración deseada del medicamento en la sangre casi inmediatamente por lo que la acción es muy rápida, en 15 a 20 segundos (tiempo de circulación) (190).

ADMINISTRACIONES INTRAMUSCULAR Y SUBCUTANEA.

La administración intramuscular y la administración subcutánea se emplean con frecuencia cuando se desea una respuesta rápida y la vía intravenosa se considera peligrosa o bien cuando no se puede utilizar una vía enteral debido a la naturaleza de la sustancia (por ejemplo, destrucción por las enzimas digestivas). Presentan muchas características comunes, aunque la absorción es generalmente más rápida cuando la sustancia es inyectada en una masa muscular

que cuando lo es en el tejido celular subcutáneo.

La diferencia en la velocidad de absorción se explica por el hecho de que antes de llegar a la red capilar, el principio activo debe difundir a través del tejido conjuntivo y el tejido celular subcutáneo es más rico en tejido conjuntivo que el tejido muscular. Otro factor determinante de la velocidad de absorción es la irrigación del tejido; aunque la permeabilidad de los capilares cutáneos y musculares es comparable (y superior a la de los capilares intestinales), el tejido muscular está infinitamente más vascularizado que el tejido subcutáneo; así pues, en el músculo hay una superficie potencial de absorción mucho más amplia. De hecho, la velocidad de absorción puede estar considerablemente disminuida o acelerada según que los vasos estén dilatados (calor, etc.) o contraídos (adrenalina, frío, etc.).

ADMINISTRACION POR INHALACION.

Se denomina inhalación a la administración de fármacos vehiculizadas a través del aire inspirado, con el fin de obtener efectos locales sobre la mucosa respiratoria o bien generales después de la absorción. Su efecto es rápido aunque la eliminación también lo es, ya que la vía de excreción es la misma que la de absorción (191,192).

ELECCION DE LAS MODALIDADES DE TOMA.

A continuación estudiaremos los distintos elementos que intervienen a nivel de la elección de las modalidades de administración.

Ciertos medicamentos son de toma única mientras que otros se administran en dosis repetidas (193,194). La elección de estos métodos no sólo depende del régimen normal de utilización terapéutica del medicamento estudiado, sino también de las posibilidades experimentales y de las ventajas o inconvenientes respectivos de estas modalidades de administración (195,196,197).

ADMINISTRACION DE DOSIS UNICA. Para la determinación correcta de los parámetros farmacocinéticos en las curvas de concentración

de fármaco en sangre con respecto al tiempo, el muestreo se debe continuar hasta 3 ó 5 vidas medias.

Deben tenerse tres puntos de nivel sanguíneo durante la fase absorbiva, tres en la región del pico y tres durante la fase de distribución (en el modelo de dos compartimientos abiertos) y tres durante la fase de eliminación.

Para la determinación del factor f (fracción del fármaco absorbido) el fármaco debe administrarse por vía intravenosa para comparación.

Si la curva de excreción acumulativa se emplea para determinar parámetros farmacocinéticos el muestreo debe continuarse hasta siete ó diez vidas medias.

Cualquier curva de concentración de fármaco en sangre con respecto al tiempo puede extrapolarse a otro tamaño de dosis u otro peso corporal mediante el parámetro Δ' (coeficiente de distribución) asumiendo que: a) la farmacocinética no es dependiente de la dosis, b) no hay cambios en la excreción urinaria (cambio de pH, cambios en la depuración de creatinina), c) la extrapolación es en base a un paciente de estatura normal y d) la extrapolación no es válida para niños, individuos edematosos, obesos o de edad avanzada (198,199).

ADMINISTRACION DE DOSIS REPETIDA. De manera general se reconoce que la concentración de un fármaco en sangre, plasma o suero puede mantenerse en un nivel terapéutico a través de una medicación que asegure la eficiencia clínica.

Si se administra una dosis elevada a intervalos fijos ocurre una acumulación cuando el fármaco que es absorbido excede la velocidad en que es eliminado (200). Conociendo la acumulación de un fármaco en el cuerpo es posible calcular un régimen de dosis, es decir, el tamaño de dosis y el intervalo necesario para mantener una concentración mínima terapéutica (201-202).

En este tipo de administración la siguiente dosis se administra antes de que la dosis previa sea totalmente eliminada, y se produce una acumulación. La acumulación será notoria solamente si el intervalo interdosis es menor a tres vidas medias. Después de

tres vidas medias la concentración total tras de la primera dosis es cerca del diez por ciento del primer pico de concentración.

Todos los tamaños de dosis serán iguales, tanto la dosis inicial como las subsiguientes.

El intervalo de dosis es igual durante el curso de la terapia.

Bajo dosis múltiples, la curva de nivel sanguíneo (o plasmático) se incrementa (acumulado) a un valor asintótico. La razón de la acumulación de las curvas de nivel en una asintota es el término $e^{-kd \cdot T}$ y siempre es menor de 1.

En estas consideraciones farmacocinéticas se asume que todos los parámetros farmacocinéticos permanecen constantes durante el curso entero de la terapia. Los factores que podrían afectar la concentración del fármaco en sangre que se esperaba son los siguientes: a) cambio en la excreción urinaria (cambio de pH urinario, cambio en la depuración de creatinina), b) cambio en la depuración hepática (daño hepático, saturación de las vías metabólicas), c) inducción e inhibición enzimática y d) farmacocinética dependiente de la dosis (203,204).

POSOLOGIA: Es fundamental que la posología sea común para los distintos medicamentos comparados (205). Si se trata de especialidades cuyas dosis nominales son distintas, deben aproximarse las posologías, se trate de dosis únicas o de dosis repetidas (206).

En el caso de un estudio de biodisponibilidad realizado mediante una administración de dosis repetida, se implica la observación de un intervalo de tiempo idéntico entre las tomas o si no el cálculo de un tiempo de estudio, teniendo en cuenta la dosis unitaria por toma y el intervalo entre tomas, que permita una toma total idéntica (mínimo común múltiplo: dosis y ritmo) (207,208).

Este imperativo se debe a la intervención, sobre todo a nivel de la eliminación por biotransformación, de mecanismos susceptibles de hacer no lineal la relación entre el fenómeno observado, por ejemplo, las concentraciones sanguíneas y la dosis

(209,210,211,212,213,214).

MODALIDADES DE TOMA: La gran cantidad de parámetros que intervienen sobre el tránsito "in vivo" de un principio activo implica el seguimiento de un protocolo de administración constante y estudiado para evitar la introducción de factores suplementarios de variabilidad. Suponiendo un estudio realizado sobre una muestra única de sujetos, deben observarse las siguientes precauciones:

a) **CRONOLOGIA:** Se deben tener en cuenta tres aspectos: horario, intervalo y orden de las administraciones consecutivas.

* **Horario:** Si es posible, el estudio debe ser dirigido respetando una misma hora de toma para todos los sujetos y para todos los fármacos a fin de tener en cuenta la intervención eventual de los fenómenos cronológicos.

* **Intervalo:** Si el estudio se realiza después de la administración de una dosis única, la sucesión de toma de muestra debe ser programada en función de la eliminación del principio activo antes de cada nueva administración (215,216); se recomienda esperar un intervalo de seis vidas medias antes de una nueva administración (217), aunque, esto va a depender de la cinética de eliminación del fármaco en análisis (218,219).

* **Orden:** El ensayo debe ser hecho al azar y el orden aleatorio de las tomas debe evitar la posible intervención de los mecanismos de inducción enzimática que acelera la eliminación del principio activo por biotransformación.

b) **SUJETOS:** Deben permanecer doce horas en ayunas a fin de eliminar la intervención del bolo alimenticio en el proceso de absorción (220,221), aunque en el caso de las sustancias liposolubles puede favorecerse tal absorción (222,223).

Por otra parte, debe evitarse cualquier consumo de alcohol y cualquier toma de medicamentos aunque no parezcan tener importancia (analgésicos, laxantes, etc.) (224,225,226,227,228,229,230,231,232, 156). Si el estudio tiene lugar con enfermos, es muy importante que su medicación permanezca constante durante la duración de los ensayos (233,234,235).

1.3 TOMA DE LA MUESTRA DE FLUIDO BIOLÓGICO.

SANGRE.

La venipuntura es el método común de obtención de muestras de sangre. Este proceso consiste en introducir una aguja en una vena y extraer lentamente la sangre dentro de un contenedor apropiado.

El fármaco y la composición bioquímica de la muestra tomadas por venipuntura son afectadas por la posición del sujeto (supina, erecta o sentado), la distancia de aplicación del torniquete y los contenedores que son usados para coleccionar el espécimen. Los cambios en la composición de proteínas sanguíneas afectarán en el análisis de fármacos si estos se enlazan fuertemente a ellas y si la técnica analítica detecta sólo el fármaco no enlazado en plasma.

El uso de un torniquete durante el tiempo de colección de la muestra, puede provocar que la muestra lleve linfa y fluido extravascular debido a la exudación del tejido circundante y la fibra natural de la vena punzada. Es mejor evitar la aplicación continua del torniquete.

Si se emplea jeringa, debe ser de dimensiones adecuadas para la cantidad de sangre que vaya a extraerse. Se emplean generalmente jeringas de plástico desechable. La aguja debe elegirse asimismo de un calibre y una longitud convenientes. La longitud de la aguja depende de la profundidad de la vena. La punta deberá examinarse con sumo cuidado, pues si está rota o torcida puede afectarse el éxito de la punción y lastimar además la vena.

En vez de jeringa, se pueden emplear otros instrumentos diversos para extraer sangre de las venas. Uno de estos es el B-D Vacutainer. Los tubos Vacutainer están provistos de una cantidad determinada de anticoagulante (algunos no) y de un vacío suficiente para sacar un volumen predeterminado de sangre; están sellados con un tapón de goma. La aguja desechable se enrosca en el sujetador, y se coloca el tubo Vacutainer en el sujetador de manera que el tapón de goma alcance justo la línea de guía. La aguja más corta se mete dentro del tapón de goma, pero no lo penetra y, por lo tanto, no

rompe el vacío. Una vez que la aguja se introduce en la vena del brazo, se empuja el tubo hasta el fondo del sujetador, se rompe el vacío, y la sangre empieza a entrar en el tubo. Cuando se termina la toma de sangre, puede sustituirse el tubo por otro o, si solo se necesita un tubo, se retira todo el conjunto. Este sistema es muy recomendable, elimina la necesidad de jeringas y se utilizan agujas y tubos desechables.

Existen catéteres que se implantan en una vena del antebrazo, generalmente la antecubital para evitar la punción continua (237). Estos catéteres almacenan cierta cantidad de sangre en su interior, que es un llamado "espacio muerto". Para evitar la mezcla de esta sangre con una nueva muestra, se recomienda lavar el tubo con solución salina (238) o permitir que en la nueva toma, la sangre drene por un tiempo suficiente para desplazar la sangre acumulada, aunque esto resulta en mayor incomodidad para el sujeto (236,239,240,241).

SALIVA.

La saliva es una mezcla de las secreciones glandulares en la cavidad oral. Estas glándulas incluyen las parótidas, submaxilares, sublinguales y varias glándulas mucosas. En los humanos, las glándulas parótidas y submaxilares producen, aproximadamente el 90 % del total de saliva y las otras glándulas aproximadamente 10 % de la saliva total. La velocidad de secreción salival varía con diferentes factores, uno de los principales es el ritmo circadiano, pH, luz, etc.

La saliva se colecta por la expectoración de un sujeto humano. Se obtiene después de que el sujeto reúne toda la saliva en la cavidad oral hasta que se forma una cantidad suficiente para ser vaciada.

La cavidad oral debe estar libre de toda sustancia antes de tomar una muestra, sobre todo comida, bebida y cigarro para evitar que éstos interfieran en el análisis ya que estas sustancias, y también los fármacos pueden enlazarse reversiblemente a la mucosa oral. Es posible realizar un lavado o gárgaras en la cavidad oral

por un periodo de tiempo (15-30 seg) seguido de la expectoración, que dejará libre la boca de muchas partículas extrañas. Esto debe realizarse unos 15 minutos antes de la colección de saliva para prevenir algún efecto estimulatorio.

La estimulación durante la colección de saliva asegura volúmenes adecuados pero puede cambiar los constituyentes endógenos (242). Se obtiene por medio mecánico, químico, gustatorio o farmacológico. La estimulación mecánica se lleva a cabo masticando una liga, parafilm o cera. La estimulación química se efectúa por la aplicación de ácido acético diluido sobre la lengua, azúcar o gotas de limón. La estimulación gustatoria se acompaña por la apreciación de aromas de frutas cítricas frescas. La estimulación farmacológica puede obtenerse con pilocarpina.

Cualquier técnica de estimulación interferirá con el análisis o enlazará fármacos.

En humanos, la secreción salival de todas las glándulas normalmente es de 0.05 ml/min. por glándula, aunque con la estimulación se incrementa hasta 0.5 ml/min. por glándula. El incremento en la secreción se acompaña por un incremento en el pH debido a la relación entre el flujo y el ión bicarbonato. Si la excreción salival de los fármacos es un proceso puramente pasivo, tales variaciones en el pH salival podrían afectar la cantidad de un fármaco ionizado para la resorción pasiva (236,239,240,241).

Para la colección de saliva en niños, se ha ideado una torunda que se introduce a la boca del niño, se permite al niño secretar saliva por un tiempo, se retira la torunda y la saliva se extrae de la torunda por medio de una jeringa (243).

BILIS.

Diariamente penetran en el duodeno de 500 a 1000 ml de bilis. El flujo biliar se aumenta por la presencia de dos sustancias que se han denominado coleréticas y colagogas. Los coleréticos son sustancias, como las sales y la secretina, que aumentan la secreción de la bilis por las células hepáticas. Los colagogos, por otro lado, aumentan el flujo biliar mediante la contracción de la

vesicula biliar y la relajacion del esfinter cistico. En esta categoria de sustancias se incluyen el sulfato de magnesio y la hormona colecistocinina. La colecistocinina es secretada por el duodeno en respuesta a la entrada de ácido, grasas, proteínas parcialmente digeridas y quizá también como respuesta a mecanismos nerviosos reflejos.

Dado que el flujo de la bilis en el duodeno es intermitente en ayunas, se precisa inducir el flujo biliar mediante un estimulante adecuado cuando se requiera el examen de la bilis. Aunque la secretina es un agente colerético potente, el aumento de la bilis producida por el hígado se almacena en la vesicula, si el conducto cístico está permeable. En presencia de una función vesicular normal, la secretina da lugar a una disminucion o incluso desaparición del flujo biliar al duodeno. Por otro lado, la pancreonina suele originar un abundante flujo de bilis como consecuencia de su contenido de colecistocinina. El sulfato de magnesio, aceite de oliva y colecistocinina purificada son útiles para estimular el flujo biliar. El sulfato de magnesio actúa como colágeno activo cuando se aplica tópicamente sobre la mucosa duodenal, pero no cuando se administra oralmente. El aceite de oliva probablemente es un colágeno más potente, pero tiene la desventaja de que interfiere los estudios de la bilis. Clínicamente se han utilizado preparados comerciales de colecistocinina, pero sin ventajas significativas sobre las otras sustancias que son más fácilmente disponibles.

TECNICA (LYON, 1919):

1. Se practica la intubación duodenal, y se comprueba la situación del tubo radioscópicamente.
2. Una vez aspirado el contenido residual del duodeno, se introduce lentamente a través de la sonda duodenal de 50 a 100 ml de una solución estéril de sulfato de magnesio saturada al 25 %.
3. Después de un minuto aproximadamente, se aspira el sulfato de magnesio y el contenido duodenal. Se recoge el líquido aspirado y se desecha hasta que aparece bilis amarilla en cierta cantidad; esto requiere generalmente que transcurran de unos 2 a 10 minutos.

4. Seguidamente se recogen, en recipientes separados, tres fracciones de bilis. La primera de ellas en aparecer, la bilis "A", es algo amarilla y acuosa. Después de 1 a 3 minutos, aparecerá bruscamente una bilis viscosa amarillo marrón, la bilis "B". Posteriormente la bilis vuelve a ser amarillo pálido y acuosa, lo cual anuncia la aparición de la bilis "C".

5. Si no aparece la bilis "B" después de 15 ó 20 minutos, debe practicarse una o dos veces la estimulación con sulfato de magnesio y la recogida total.

Generalmente, la bilis "A" totaliza una cantidad que varía entre 5 y 20 ml y que se origina en el coledoco. La bilis "B" es el resultado de la concentración de dicho líquido, y probablemente proviene únicamente de la vesícula en circunstancias normales, y puede recuperarse de 30 a 75 ml. Se supone que la fuente de la bilis "C" son los conductos hepáticos y las raicillas intrahepáticas.

INTUBACION DUODENAL.

Raskin y cols. (1958) han descrito un método rápido de intubación. Consiste en que después de un ayuno nocturno se administra por vía parenteral una dosis sedante de pentobarbital. Se hace pasar por la boca un tubo Diamond de doble luz hasta una distancia de 45 cm llevando el extremo aproximadamente hasta el cardíax. Entonces se coloca al sujeto sobre una camilla en posición de decúbito lateral, elevando la cabecera unos 38 cm. Se hace tragar el tubo lentamente otros 15 cm, lo que da lugar a que se sitúe a lo largo de la curvatura mayor. Se sienta el sujeto sobre el borde de la camilla con su cuerpo doblado hacia adelante, tanto como sea posible. Realizará el sujeto varias inspiraciones profundas que ayudarán a la penetración del tubo en el antro. Los movimientos peristálticos introducirán el tubo en el duodeno, si el sujeto permanece acostado en posición de decúbito lateral derecho con sus pies elevados durante 5 min. Por último, el sujeto yace sobre su espalda otros 5 min, mientras se avanza el tubo lentamente otros 10 o 15 cm. Se ajusta el tubo mediante visualización radioscópica, de tal manera que su extremo este colocado en la

mitad de la tercera porción del duodeno. Se puede mantener una situación adecuada del tubo, fijando con esparadrapo el tubo sobre la frente del paciente. La secreción se recoge mediante aspiración continua con una bomba de vacío u otros aparatos adecuados, con el fin de obtener una presión de 25 mm Hg (236,239,240,241,244,245,246).

ORINA.

La muestra de orina debe recogerse en un recipiente limpio y seco. Si no se puede evitar que la orina repose durante más de 1 o 2 horas después de ser evacuada, como sucede en la recogida de las muestras de orina de 24 horas, deberá añadirse un medio conservador o ser refrigerada.

Para una muestra de 24 horas, se instruye al sujeto para que vacíe su vejiga a las 8 de la mañana (se supone que será antes del desayuno), y se desecha esta orina. Se recogerá toda la orina subsiguiente, incluida la evacuada a las 8 de la mañana siguiente. Se mezcla bien antes de mandar una muestra para su análisis.

Si es probable que la muestra se contamine por exudado vaginal o hemorragia, deberá tomarse una muestra evacuada con limpieza.

Para la mayoría de los análisis de orina se prefiere una muestra bastante concentrada a una diluida. La concentración de los solutos varía a la largo de las horas de vigilia del sujeto, dependiendo de su ingesta de agua. Generalmente, la primera muestra de orina de la mañana, obtenida al levantarse, es la más concentrada, ya que el sujeto no ha bebido agua durante las horas de sueño.

En el caso del varón, el glande deberá exponerse adecuadamente, limpiarse cuidadosamente con una solución antiséptica suave y secarse. La orina en la mitad del chorro se recogerá en un recipiente limpio después de que se haya dejado escapar la parte inicial.

Instrúyase a la mujer para arrodillarse o ponerse de cuclillas sobre un orinal, o bien de pie a horcajadas sobre una cuña. Utilizando unos guantes estériles una persona auxiliar

(preferentemente una enfermera) separará ampliamente los labios menores para exponer el orificio uretral, manteniendo los labios separados a lo largo de toda la maniobra. Con trocitos de algodón estéril y jabonoso se limpian los dos lados del meato urinario y después se limpia éste. Enjuagar la zona limpiando con algodón estéril empapado en agua. Instruir a la paciente que orine con fuerza y permitir que la parte inicial del chorro de orina caiga en el orinal o en la taza del servicio, permaneciendo separados los labios. Tomar una muestra de la mitad del chorro en un recipiente limpio y no tocar ninguna parte del perineo con el recipiente (236,239,240,241).

HECES.

Un orinal bien limpio es un recipiente conveniente para recoger la muestra. En caso de carecer de él, puede servir un tarro de vidrio de tamaño adecuado y limpio. Ha de advertirse a los pacientes que no deben orinar en el mismo recipiente. Para trasladar las muestras de heces desde el recipiente de muestreo a la vasija de transporte se puede utilizar un depresor de lengua.

Dada la gran variación en los hábitos intestinales, el tiempo de tránsito intestinal y el volumen de las heces, debe ponerse especial atención a los métodos de medición del tiempo de muestreo en estos especímenes. El aparato gastrointestinal no puede vaciarse enteramente a voluntad, y por tanto, la cantidad de heces recogida en un periodo de 24 horas se correlaciona escasamente con la cantidad de comida ingerida en ese mismo periodo de tiempo (247). Con el fin de determinar la excreción fecal de una sustancia cualquiera en 24 horas, se deben recoger las heces durante un periodo de tiempo, al menos de tres días y los cálculos se harán en base a la muestra completa (236,239,240,241).

14 CONSERVACION, MANTENIMIENTO Y TRANSPORTACION DE LA MUESTRA DE FLUIDO BIOLÓGICO.

SANGRE.

Las muestras de sangre pueden analizarse directamente, o bien, puede permitirse la formación del coágulo y analizarse el sobrenadante líquido (suero) o, en su caso, añadir un anticoagulante a la sangre total para prevenir la coagulación y, después de centrifugación, analizar el sobrenadante líquido (plasma). Esto va a depender de la estabilidad del fármaco en cada tipo de espécimen (248).

La adición de anticoagulantes retarda la formación del coágulo pero debe asegurarse de que estos no interfieran o reaccionen con el medicamento como en el caso de la heparina que puede llegar a favorecer el enlace a proteínas de algunos fármacos (249,250,251). Los anticoagulantes no inhiben permanentemente la coagulación de la sangre.

El tiempo de coagulación en la preparación de suero debe ser precisado y controlado de manera consistente. Todas las muestras deben ser expuestas a la misma temperatura durante el mismo tiempo para conseguir una retracción del coágulo reproducible.

Las muestras colectadas deben ser centrifugadas de inmediato, bajo un periodo de tiempo constante, para prevenir una eventual coagulación.

La centrifugación de sangre tratada con anticoagulantes debe ser regulada cuidadosamente tanto en velocidad como en temperatura para no alterar los constituyentes endógenos de la sangre, como es el caso de los triglicéridos y el colesterol (252,253,254). Las velocidades bajas (menos de 1000 rpm) requieren mayor tiempo (más de 30 min.) para la separación adecuada del plasma y las células. Las velocidades altas (2000-3000 rpm) producen separaciones rápidas (10-15 min) pero generan calor por fricción, lo cual será una desventaja para fármacos y metabolitos termolábiles. Las centrifugas refrigeradas son una opción pero deben ser operadas a unos 10 grados centígrados para prevenir la posible precipitación

14 CONSERVACION, MANTENIMIENTO Y TRANSPORTACION DE LA MUESTRA DE FLUIDO BIOLÓGICO.

SANGRE.

Las muestras de sangre pueden analizarse directamente, o bien, puede permitirse la formación del coágulo y analizarse el sobrenadante líquido (suero) o, en su caso, añadir un anticoagulante a la sangre total para prevenir la coagulación y, después de centrifugación, analizar el sobrenadante líquido (plasma). Esto va a depender de la estabilidad del fármaco en cada tipo de espécimen (248).

La adición de anticoagulantes retarda la formación del coágulo pero debe asegurarse de que estos no interfieran o reaccionen con el medicamento como en el caso de la heparina que puede llegar a favorecer el enlace a proteínas de algunos fármacos (249,250,251). Los anticoagulantes no inhiben permanentemente la coagulación de la sangre.

El tiempo de coagulación en la preparación de suero debe ser precisado y controlado de manera consistente. Todas las muestras deben ser expuestas a la misma temperatura durante el mismo tiempo para conseguir una retracción del coágulo reproducible.

Las muestras colectadas deben ser centrifugadas de inmediato, bajo un periodo de tiempo constante, para prevenir una eventual coagulación.

La centrifugación de sangre tratada con anticoagulantes debe ser regulada cuidadosamente tanto en velocidad como en temperatura para no alterar los constituyentes endógenos de la sangre, como es el caso de los triglicéridos y el colesterol (252,253,254). Las velocidades bajas (menos de 1000 rpms) requieren mayor tiempo (más de 30 min.) para la separación adecuada del plasma y las células. Las velocidades altas (2000-3000 rpm) producen separaciones rápidas (10-15 min) pero generan calor por fricción, lo cual será una desventaja para fármacos y metabolitos termolábiles. Las centrifugas refrigeradas son una opción pero deben ser operadas a unos 10 grados centígrados para prevenir la posible precipitación

de globulina.

Frecuentemente, es necesario almacenar las muestras de sangre colectadas y tratadas, antes del análisis.

La sangre que se almacena tapada a temperatura ambiente, no sólo tiende a coagular sino que continúa su actividad enzimática (255,256). Por ejemplo; la actividad de la acetilcolinesterasa en sangre almacenada, hidroliza ésteres contenidos en fármacos como la cocaína y la diacetilmorfina (heroína). Tal ataque enzimático puede inhibirse con NAF acetilcolinesterasa, o ser retardada con baja temperatura, (por ejemplo, a 10 grados centígrados). El uso de temperaturas bajas tiene desventajas. El enfriar o congelar las muestras de sangre puede producir hemólisis, destrucción celular y desnaturalización de proteínas, cuando son descongeladas, lo que resulta en muestras de plasma ó suero que son diferentes a la sangre sin congelar. La coagulación se produce a menos que se prevenga con un anticoagulante y debe controlarse cuidadosamente la temperatura para asegurar una coagulación reproducible. Los fármacos que se distribuyen extensamente en los eritrocitos suelen dar valores elevados en suero o plasma durante el ensayo cuando estas muestras se calientan (257,258,259,260).

La sangre congelada puede usarse cuando se desea analizar la concentración del fármaco total y/o metabolitos. Esto no se lleva a cabo satisfactoriamente si la integridad celular se destruye. La desventaja es la dificultad de pipetear la muestra y la interferencia de los componentes celulares durante los ensayos.

La congelación de suero o plasma es más práctica que la sangre total. Sin embargo, puede ocurrir desnaturalización de proteínas en plasma o suero al descongelar la muestra debido a la reorientación de su estructura helicoidal y por ello producirse la precipitación de proteínas (261). Las proteínas desnaturalizadas del suero o plasma afectan el enlace del fármaco. Los ensayos de fármacos libres o enlazados son diferentes entre las muestras de suero o plasma congelado (262). Las fracciones proteicas de suero o plasma que precipitan después de congelar y descongelar son predominantemente globulinas y su precipitación puede variar la

concentración de material enlazado a estas globulinas cuando se analiza la solución sobrenadante.

La evaporación de muestras de sangre puede afectar el análisis de los fármacos y/o metabolitos volátiles, particularmente en muestras congeladas sin tapar y que son descongeladas rápidamente. La mayor pérdida de peso se da debido a la evaporación de muestras de suero almacenadas a temperatura ambiente en recipientes descubiertos.

Se ha reportado que la heparina inhibe la esterglicerolhidrolasa a altas concentraciones y la activa a bajas concentraciones, así que este anticoagulante no debe ser usado indiscriminadamente. Puede usarse la homocisteína para estabilizar sustancias que se oxidan rápidamente (263) o EDTA para dar estabilidad a los fármacos fotosensibles (264).

Uno de los estudios sobre la estabilidad durante el almacenaje de ácidos grasos no estériles (NEFA) en sangre o plasma demuestran claramente que (1) la sangre puede almacenarse por 2 horas a temperatura ambiente y por 48 horas a 4 grados centígrados sin cambios significativos de NEFA, y que (2) el plasma puede ser almacenado por 6 horas a temperatura ambiente y 48 horas a 4 grados centígrados, se centrifugan y se separan inmediatamente de la sangre total sin cambios significativos de NEFA. Estos descubrimientos pueden aplicarse a fármacos tipo ácido y también a otros fármacos neutros y básicos que no son susceptibles al ataque enzimático sanguíneo.

Los recipientes de vidrio contienen muchos grupos hidroxilo libres sobre su superficie que pueden formar puentes de hidrógeno con muchos fármacos y sus metabolitos. La silanización de estos grupos hidroxilo con reactivos químicos como el trimetilclorosilano y el hexadimetilclorosilano forman éteres silano no extraíbles de manera que no enlazan fármacos ni sus metabolitos. Las soluciones comerciales para silanización de material de vidrio no forman tales enlaces covalentes, por esto no son recomendables, ya que pueden interferir en los subsecuentes procedimientos de análisis.

Un fármaco altamente liposoluble puede tener una mayor

atracción por los grupos alquilo enlazados a los éteres silano que por la sangre, plasma o suero y por eso se prefiere la silanización con dimetilclorosilano.

Las paredes de los contenedores plásticos frecuentemente muestran enlaces de Van Der Waals con fármacos y metabolitos, y contienen antioxidantes y plastificantes que pueden interferir con la técnica analítica elegida (265,266). Ese caso también ocurre con los tubos de los catéteres empleados en las tomas de las muestras de sangre (267).

SALIVA.

La longitud de tiempo previo al análisis de muestras de saliva, así como las propiedades de estabilidad del fármaco analizado hacia los constituyentes de la saliva, determinarán el almacenaje necesario.

Ya que los fármacos pueden enlazarse a la superficie de los contenedores, debe efectuarse silanización sobre los recipientes de vidrio.

Los constituyentes endógenos de la saliva, así como las enzimas, destruyen o alteran ciertos fármacos o metabolitos. El ataque enzimático se inhibe refrigerando ó congelando inmediatamente después de la toma de muestra. Las muestras de saliva tienen que ser colectadas en aceites de parafina para prevenir el escape de dióxido de carbono y por ello cambios en el pH. Una muestra de saliva recién adquirida y fresca puede mantenerse dentro de una jeringa, y sacando el aire, la jeringa puede almacenarse, tapada, en refrigeración hasta el análisis.

La saliva, al igual que la sangre, puede almacenarse liofilizada. Esta técnica se usa sobre muestras de saliva intactas o con previa remoción de las proteínas.

La descongelación de las muestras de saliva congelada y la reconstitución de muestras liofilizadas producen material insoluble como calcio. Es posible que el precipitado puedan ser proteínas y los fármacos y/o sus metabolitos se pierdan de la muestra por enlace a proteínas.

La cavidad oral contiene bacterias que pueden alterar los fármacos en saliva y cambiar el pH durante el almacenamiento a temperatura ambiente (236).

BILIS.

La descongelación de la bilis, almacenada a temperaturas de baño de hielo o a -20 grados centígrados producirán copiosas cantidades de precipitado, el cual no se redisuelve con agitación. Este sólido es principalmente precipitado de colesterol, formado por debajo de la temperatura micelar crítica y es capaz de entrapar fármacos y/o sus metabolitos. Este problema se resuelve subdividiendo porciones de las muestras de bilis en la cantidad que se necesita para el análisis total. Esta porción, ya descongelada, se diluye con agua y se mezcla para suspender o resolubilizar el precipitado.

La liofilización de la bilis se emplea ventajosamente con fármacos o metabolitos que son lábiles al pH o que son atacados fácilmente por las enzimas.

La superficie de los contenedores pueden enlazar la bilis cuando contiene metabolitos polares y glucurónidos por lo que se hace necesaria la silanización de todos los recipientes de vidrio usados para el almacenamiento (236).

ORINA.

El incremento en el pH urinario debido al crecimiento bacteriano por la formación de amonio, se previene almacenando a temperaturas reducidas. La mayor desventaja de una rápida congelación de la orina es la precipitación de sustancias insolubles al descongelar, que generalmente son mezclas de sales inorgánicas y ácido úrico. La dilución con un volumen igual de agua antes de congelar previene tal precipitación.

Los conservadores retardan el crecimiento bacteriano en la orina. Resulta efectivo adicionar ácido bórico sólido. Una combinación de cloruro de sodio-polivinilpirrolidona mantiene la estabilidad de la suspensión de células bacterianas y ejerce una

acción bacteriostática. Estos preservativos pueden afectar el análisis. El ácido sulfámico (un agente bacteriostático) no interfiere con los ensayos de orina.

La orina se liofiliza fácilmente con los materiales volátiles convertidos en sales, pero deberá demostrarse la estabilidad del fármaco y/o sus metabolitos en su forma liofilizada (236).

HECES.

Se han reportado temperaturas de -20 a -70 grados centígrados como efectivas para el almacenaje de muestras fecales.

El peso de los especímenes fecales congelados tendrán variaciones en la cantidad de agua dependiendo de la cantidad de líquidos incluidos en la dieta.

Estas muestras se deodorizan y deshidratan por liofilización si los fármacos y/o metabolitos son altamente volátiles. También pueden formarse sales para prevenir la volatilización. Las muestras fecales liofilizadas son fácilmente pulverizadas, pesadas y almacenadas.

Los homogenatos de muestras fecales húmedos son obtenidos directamente por medio de un agitador comercial, con la adición de volúmenes medidos de agua.

Las muestras fecales se secan y/o esterilizan en una autoclave para evitar la producción de mal olor por las bacterias durante el almacenaje. Las heces calentadas en un horno a 123 grados centígrados por 24 horas, se pulverizan fácilmente en un mortero. Estos métodos deben ser usados con precaución ya que el calor piroliza los fármacos y sus metabolitos (236).

C A P I T U L O 2
ETAPA 2 . PROCEDIMIENTO DE RECEPCION DE MUESTRAS
DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

Las normas del CAP (College of American Pathologists) indican que "el laboratorio debe disponer de un libro de instrucciones completo y detallado que cubra, la disposición de las pruebas, precauciones que hay que tomar en procedimientos especiales, métodos correctos para la conservación de las muestras. Su correcta identificación, su conservación y almacenamiento estarán claramente expuestos por escrito para que puedan consultarse por los encargados de recibir las muestras. Todos los procedimientos deben ser de tal naturaleza que aseguren muestras satisfactorias (239).

SOLICITUDES.

Los procedimientos correctos de solicitud de muestras aseguran una identificación adecuada del sujeto sano voluntario y de la muestra.

Tanto la Joint Comision on Accreditation of Hospitals (JCAH) como los CAP Standards for Accreditation of Medical Laboratories reconocen el papel clave de las solicitudes. Las notas explicatorias de CAP Standard III exponen (269):

"Todas las solicitudes de muestras se realizan por escrito. Se utilizará un sello para establecer la fecha y hora en que se recibió la petición en el laboratorio...; estas peticiones e informes identificarán al sujeto sano voluntario con certeza. Los datos de identificación incluyen por lo menos, el nombre completo del sujeto sano voluntario, edad y sexo".

La JCAH también solicita el siguiente registro en el laboratorio:

"Se mantendrá un registro de muestras cada una de las cuales ha de ser numerado o identificado apropiadamente. Este registro debe contener por lo menos la información siguiente:

- Identificación del sujeto sano voluntario
- Nombre del médico que está siguiendo el estudio
- Fecha y hora en que fué recogida la muestra
- Fecha y hora de recepción de la muestra
- Fecha, hora y nombre del que examina la muestra

Causas de alguna muestra no satisfactoria''.

De manera ordinaria, las muestras de los fluidos biológicos son obtenidas en clínicas que están situadas fuera del área donde estas muestras serán analizadas. Un gran inconveniente de esta situación es que las personas que están encargadas de la administración del fármaco y la toma de las muestras generalmente ignoran los detalles que deben cuidarse para obtener muestras satisfactorias para el análisis (270).

Por esta razón es que se elaboran procedimientos específicos donde se manifiesta la manera en que se recogen las muestras, su manejo, su almacenamiento, el tiempo de vida media del fármaco en el fluido a temperatura ambiente, si debe ser congelado, refrigerado, centrifugado, si se requiere usar conservador, qué tipo de conservador, el intervalo de toma, en qué condiciones se rechaza una muestra, forma de identificación de las muestras, e incluso la cantidad a ser recogida (271,272).

Estos procedimientos deben ser conocidos también por el personal del laboratorio analítico conservando una copia para cualquier aclaración.

Para asegurar que estos procedimientos sean llevados a cabo adecuadamente, es recomendable tener un monitor químico (persona del laboratorio analítico que certifique los procedimientos en la clínica) el cual debe también tener su propia copia de los procedimientos a seguir (273).

Para obtener todas las muestras que son requeridas para un análisis y también para asegurar su calidad, se hará con tiempo suficiente una solicitud de muestras de los sujetos participantes en el estudio. La clínica puede pedir información adicional al laboratorio analítico si algún punto en los procedimientos no queda totalmente claro. De esta solicitud también depende que la selección del sujeto sano voluntario sea adecuada, ya que en ella se incluyen las características que debe reunir tal sujeto (274).

El traslado de las muestras desde la clínica al sitio de análisis se realizará de manera correcta y muy cuidadosa para

evitar rupturas, pérdidas o confusiones. Este proceso se sigue mediante un procedimiento que estará por escrito. De manera general se recomienda hacer el traslado de las muestras a través de cajas o gradillas de unicel que proporcionan un amortiguamiento adecuado para las muestras. También se tendrá en cuenta que tan largo será el recorrido para saber si las muestras son trasladadas a bajas temperaturas, congeladas, liofilizadas (275,276), protegidas de la luz (277), etc.

Una vez que las muestras llegan al laboratorio analítico, la persona que va a recibirlas se ocupará de hacerlo de una en una, verificando que la identificación es correcta, que las condiciones de conservación se han respetado, que el estado de las muestras es el adecuado, que el número y la cantidad de muestras sea el solicitado. Estos procedimientos también deben estar por escrito (278).

Para corroborar que el desembarco de las muestras es el indicado, puede tenerse un monitor clínico (persona de la clínica que vigile la recepción de las muestras en el laboratorio analítico) que verifique que son manejadas adecuadamente y quién también tendrá una copia del procedimiento escrito.

Una vez que se han verificado las muestras, y después de comprobar que las muestras están como se esperaban, se firma de recibido (279,280).

Por otro lado, el laboratorio analítico llevará un registro de las muestras ingresadas donde se especifique el número de muestras que se reciben, de qué manera están identificadas y en qué condiciones se reciben.

Una vez hecho esto, el laboratorio analítico continuará con las condiciones de conservación para las muestras (281) o realizará las técnicas de preparación de las muestras en caso de ser necesario.

CONTROL DE CALIDAD (289).

El control de calidad en un bioanálisis es necesario para verificar si los datos que se obtienen son correctos o si las

desviaciones encontradas se deben a errores en el análisis. También sirve para verificar si los analistas no están introduciendo variables que puedan llevar a resultados erráticos (282,283)

CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

El control de calidad interno ha sido definido en términos amplios como una guía de la imprecisión de un ensayo con el objeto de minimizar las variaciones intralaboratorio.

En el desarrollo inicial de un método, se obtiene una burda guía de la imprecisión que puede ser esperada, aunque generalmente el número de muestras analizadas y las veces en que se ensayan resultan ser una guía muy pobre. Una opción es analizar un grupo de muestras (mínimo a seis concentraciones diferentes) en seis ocasiones diferentes. Idealmente, las desviaciones estándar obtenidas serán relativas a cada concentración y reproducidas cada vez que el experimento se repita. En la realidad, los valores encontrados para un análisis en particular sólo pueden usarse para indicar que el método tienen una precisión aceptable. El control de calidad es para asegurar que la precisión se está logrando.

El primer paso para asegurar que la calidad de un método analítico resulta adecuada es establecer que cualquier estándar -ya sea para calibración o control de calidad- está hecho correctamente. Para esto se preparan soluciones stock del fármaco dentro del rango teórico de concentraciones a medir y se valida contra errores de pesada o de dilución. Para propósitos de control de calidad, estas soluciones stock validadas se adicionan a un pool de fluido biológico libre del fármaco, se dividen en volúmenes como los empleados normalmente en los análisis y se congelan para su uso posterior junto con las muestras problema. Los valores obtenidos de las soluciones stock se usan para decidir si el análisis de un lote de muestras en particular es aceptado o rechazado. Los criterios de aceptación se establecen sobre un intervalo de porcentajes de contenido del fármaco, que resulta más real que emplear las desviaciones estándar de los ensayos. Los valores encontrados para cada lote se inspeccionan para su aceptación o rechazo. Se analiza

una muestra de control de calidad a cada concentración por tanda de muestras problema. Los resultados de cualquier tanda de análisis se rechaza si tres o más resultados de control de calidad están fuera del 10% de los límites, o dos o más resultados del control de calidad están fuera del límite en un 20% .

Los resultados no serán rechazados pero si observaran medidas correctivas si dos valores sucesivos de la misma muestra de control de calidad están fuera del límite en un 20% o siete valores sucesivos del espécimen de control de calidad están por debajo, por encima o sobre el valor medio (272,284,285,286).

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.

En este proyecto participa cualquier laboratorio involucrado en el análisis de fármacos como un servicio de rutina o como parte de un proyecto de desarrollo. Se deberá unir un esquema de seguimiento externo junto con un esquema de control de calidad interno. Este programa puede ahorrar trabajo posterior resolviendo las discrepancias entre laboratorios que actúan separadamente (287).

A diferencia de los esquemas de control de calidad interno, los esquemas externos no pueden ser usados para decidir sobre la aceptación o rechazo de resultados ya que pasa un periodo de tiempo antes de que los resultados se conozcan. Los laboratorios participantes deberán ser entrenados de como seguir su propio esquema de control de calidad interno. Los reportes de los laboratorios participantes deberán incluir el número de resultados usados en los cálculos, la media, la desviación estándar, el valor verdadero en la preparación original y los resultados de los participantes (272,288).

CAPITULO 3
ETAPA III. ETAPA PREVIA AL ANALISIS.

CAPITULO 3
ETAPA III. ETAPA PREVIA AL ANALISIS.

3.1 DISEÑO DE METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DE FARMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

REVISTON BIBLIOGRAFICA.

La etapa de diseño comprende una revisión bibliográfica exhaustiva con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad e interacciones del analito, así como referencias para la cuantificación del mismo por un método analítico adecuado (291,292).

Dentro de esta misma etapa se pueden considerar, al menos dos alternativas para cumplir dicho objetivo. La primera es la adaptación, de manera parcial, de las condiciones analíticas reportadas en la literatura; la segunda, es la adaptación y reproducción de manera fidedigna de las condiciones analíticas empleadas o reportadas previamente por otros grupos de investigación u organismos regulatorios.

Se puede adaptar un método de manera total cuando en la literatura (Journal Chromatographic Science, Pharmaceutical Research, Biochromatography, Journal of Liquid Chromatographic, Journal of High Resolution Chromatography, etc.), se han encontrado las condiciones adecuadas para el análisis del analito o la resolución a un problema parecido al que se tenga en el laboratorio; también es posible que se sigan los métodos contenidos en los compendios oficiales (USP, BP, etc.).

El problema con los métodos oficiales y con muchos otros de la literatura, es que generalmente están diseñados para fármacos en matrices mucho menos complejas que las biológicas. En los métodos de análisis bioquímico se involucran dos etapas: (a) purificación y (b) cuantificación (ocasionalmente la cuantificación directa es posible) (293,294,295,296). Por tal razón, esta literatura sólo logra guiarnos en la resolución de algún problema en particular y su adaptación será parcial y tendrá que completarse con métodos elegidos según la naturaleza del compuesto y del material biológico. Para esto, es necesario conocer las diferentes técnicas

que se encuentran en la bibliografía y con las que se puede lograr la extracción, purificación, o separación del analito de la matriz biológica para su cuantificación por CLAR.

Quando se emplea la técnica de CLAR para cuantificación del fármaco se debe comenzar por definir el tipo de cromatografía (y por consiguiente el tipo de columna) que se va a utilizar (287) y puede ser: fase normal (298, 299, 300, 301), fase reversa (302, 303, 304, 305, 306), intercambio iónico (307, 308, 309, 310, 311, 312, 313), par ión (314, 315, 316, 317, 318, 319), resolución enantiomérica (320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334,), etc. (335, 336). Esto depende no sólo de las características fisicoquímicas del analito sino también de la naturaleza de la matriz biológica (337, 338, 339). Será necesario, asimismo, seleccionar el tipo de detección dependiendo de las propiedades del analito y la sensibilidad y selectividad que se requiera. En este contexto están el índice de refracción (340, 341, 342), fluorescencia, detección electroquímica (343, 344, 345, 346, 347, 348, 349) e incluso, la espectrometría de masas (350). La desventaja de estos tipos de detección es que no todos los compuestos exhiben las propiedades características para su empleo y se tiene que recurrir a la derivatización para lograr la detección. El tipo de detección más usado es el UV-Visible ya que la mayoría de los compuestos dan respuesta dentro de este intervalo del espectro y los límites de detección son bastante adecuados, de ng/ml para compuestos conjugados y aromáticos (ambos a longitudes de onda mayores de 230nm) y alifáticos (a longitudes de onda de 200-230nm). El detector UV-visible adaptado con arreglo de diodos es de gran utilidad para probar la pureza de los compuestos presentes en cierta muestra y para asegurar que un método tiene la especificidad necesaria para la cuantificación de un fármaco contenido en un fluido biológico (351, 352, 353, 354). En la práctica, las longitudes de onda por debajo de los 280nm son desfavorables por las interferencias que causan los compuestos endógenos (355). La detección entre 190-210nm, puede emplearse si la fase móvil es bien elegida. A estas longitudes de onda las

absortividades molares (ϵ) son relativamente altas. El máximo de absorbanca de un analito no es necesariamente la longitud de onda preferida para la detección ya que la relación señal a ruido (s/n) puede ser muy baja. En general, las interferencias disminuyen a longitudes de onda mayores, pero desafortunadamente, también la absorbanca del analito (356).

Las técnicas de purificación pueden incluir cualquier procedimiento que remueva selectivamente el compuesto de interés de otro material (357).

La primera etapa en el procesamiento de la muestra es la destrucción de la estructura matriz (358,359,360,361). Esto debe realizarse tan completamente como sea posible ya que el rendimiento en el proceso de aislamiento y recobro subsecuente depende considerablemente de esto (362,363,364,365).

RUPTURA DE LOS CONJUGADOS DEL FARMACO.

La determinación directa de los conjugados puede ser sumamente complicado (366,367) ya que son muy polares y esto ocasiona que su extracción se difuculte, (368,369). La posibilidad de formación de varios conjugados del compuesto original (370) o de un metabolito primario hace que resulte difícil interpretar el análisis (371,372), y sintetizar un estándar para los derivados es muy difícil. Además, si se considera la posibilidad de una determinación directa por medio de la cromatografía ión-par (373), es conveniente que los conjugados sean determinados por medida diferencial, esto es, determinar si los productos del rompimiento de un conjugado son menores que el compuesto no conjugado (374). En este caso, el rompimiento de los conugados del fármaco es un procedimiento necesario en la muestra. En el caso de conjugados lábiles se realiza por simple cambio de pH (375,376,377) o temperatura (incubación) (378,379) en la muestra antes de la etapa de limpieza; incluso puede usarse la diálisis y la ultrafiltración (380). Con conjugados estables, es necesario el uso de enzimas hidrolíticas (381,382,383). La enzima que será usada -ya sea la altamente específica β -glucuronidasa (384,385) o la pobremente

específica glucosidasa (386)- depende del tipo de conjugado y puede establecerse sólo por experimentación (387). Al igual que en cualquier reacción enzimática, el proceso de ruptura de conjugado de fármaco será dependiente de pH, la temperatura y tiempo. La mayoría de los procesos de rompimiento requiere de 24 horas de incubación a 37°C y pH 5.0, pero estas condiciones no son generalizadas (388).

PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA.

Prácticamente todas las técnicas de separación pueden ser consideradas para la limpieza de muestras:

- *precipitación
- *filtración y sedimentación
- *liofilizado
- *evaporación
- *extracción sólido-líquidos y líquido-líquido

Los procedimientos de limpieza, en principio, separan cuantitativamente los analitos de todo el material que no está siendo determinado. Son embargo, en muchos casos es necesario usar combinaciones de las técnicas enlistadas.

La más simple es la extracción líquido-líquido seguido de la evaporación del solvente a fin de concentrar el compuesto que va a ser determinado.

PROCEDIMIENTOS ESTANDAR DE LABORATORIO.

La precipitación, la filtración, la sedimentación y la liofilización son los principales procedimientos conocidos y empleados por la mayoría de los laboratorios. Sin detallarlos, a continuación se puntualizarán los problemas que conducen a una pérdida del principio en los procesos de limpieza:

PRECIPITACION.

Siempre que el analito sea un elemento en trazas dentro de la matriz, la precipitación de los constituyentes mayores de la

muestra resulta ser un gran problema ya que el analito se adsorbe sobre la superficie del precipitado y es ocluido en éste (389,390). Esta posibilidad se presenta en la desproteínización (391,392). Puede agregarse que, en muchos casos, el fenómeno de adsorción y el de oclusión, provocan muchas variaciones en los ensayos debido a que el analito no se recupera en forma reproducible.

Este problema puede solucionarse con el uso de un estándar interno de características similares a las del analito; ya que conociendo su concentración inicial y determinando su concentración final, es posible saber en qué proporción se está perdiendo el analito durante el tratamiento.

Blanchard ha estudiado la eficiencia de los diferentes agentes precipitantes de proteínas (393,394). La misma fase móvil puede actuar como precipitante, de aquí el daño que las proteínas en las muestras pueden causar en las columnas al ser inyectadas directamente sin limpieza previa (395,396).

FILTRACION Y SEDIMENTACION.

La filtración y la sedimentación (por gravedad o en una centrifuga) se asumen como técnicas equivalentes para la separación de líquidos y sólidos. En el análisis de trazas, sin embargo, la filtración se delega por la centrifugación (397,398) ya que la muestra no entra en contacto con el material que constituye el filtro que tiene una gran capacidad absorbente para el analito y esto causa problemas en la recuperación (exactitud) y la reproducibilidad (precisión). Esto también debe tenerse en cuenta cuando se hace uso de la ultrafiltración (399).

EVAPORACION.

La evaporación de los solventes es ampliamente usada y se considera que no causa problemas en la mayoría de los casos. Durante la evaporación se trabaja con nitrógeno o algún otro gas inerte siempre que se manejen analitos que sufren oxidación (400).

Mientras que la idea general para una evaporación cuidadosa es un punto de ebullición medio de los componentes a evaporar, algunos

evaporan bajo presión reducida y usando la fuerza centrífuga (398) a fin de prevenir las burbujas de vapor que en un principio caen del solvente. Otros usan baños de vapor bajo la superficie del solvente, esto no sólo previene la oxidación del analito sino que disminuye la temperatura de evaporación.

LIOfILIZACION.

Para compuestos termolábiles, la liofilización se prefiere sobre la evaporación de fases acuosas. Sin embargo, se tienen fuertes problemas cuando se usa para muestras con altas concentraciones de sales, como en el caso de la orina, ya que es prerequisite que la muestra permanezca por debajo del punto de fusión del analito durante todo el proceso. Una alta concentración de sales puede disminuir el punto de fusión tan drásticamente que la muestra comienza a fundirse inmediatamente sin que el punto óptimo para la liofilización sea alcanzado. En este caso, es conveniente diluir la muestra con una cantidad suficiente de agua destilada antes de someterla al proceso de liofilizado.

EXTRACCION.

A diferencia de muchos procedimientos de limpieza, la extracción es la más comúnmente usada. Siendo en principio relativamente simple (401,402) y rápida, da a la vez una alta purificación (403,404).

El procedimiento usual es la extracción líquido-líquido entre fases acuosas y no acuosas. Aunque los solventes usados no son miscibles en agua, debe tomarse en cuenta una posible miscibilidad ya que los compuestos polares pueden difundirse fácilmente a la fase orgánica además de en el agua disolvente. Esto no se resuelve por simple presaturación del solvente de extracción, por lo que el extracto se lava varias veces con una pequeña cantidad de fase acuosa pura.

El medio de extracción no se separa solo, éste puede introducir nuevos compuestos (impurezas del solvente) en la muestra analítica. Para análisis de rutina a nivel porcentual, esto

generalmente no tiene efecto, pero interfiere seriamente con análisis de trazas a niveles de ppm y ppb. Se debe de notar que las impurezas a este nivel normalmente no son enlistadas en la etiqueta de los solventes. Aún los solventes de grado analítico pueden necesitar purificación, p.ej. redestilación o tratamiento con adsorbentes. En este contexto, se debe recordar que el término "impureza" está en función del principio de detección empleado y presentan diferentes requerimientos de pureza para UV, fluorescencia y detección amperométrica (405,406,407).

El mezclado para la extracción se realiza por agitación y un número de opciones (por ejemplo, un agitador vórtex o agitación manual). La intensidad y la duración de la agitación influye en el rendimiento de la extracción, así que es necesario proveer un tiempo suficiente para la extracción (408). En ocasiones es preferible una agitación suave en vez del vortex para evitar la formación de emulsiones (409).

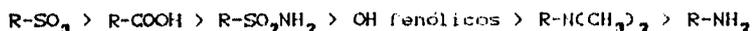
Este requerimiento puede dar lugar a volúmenes difíciles de manejar, especialmente cuando se trabaja con una gran cantidad de muestras. Junto con la gran cantidad de solvente, se aumenta la dificultad por el manejo de los residuos y el alargamiento del tiempo de evaporación. Todo esto puede, además, afectar la estabilidad de la muestra (410).

La elección de recipientes de vidrio también presenta dificultades sobre todo en el análisis de trazas donde los problemas de adsorción del analito a la superficie se incrementa. Se requiere entonces, reducir el trabajo de la muestra tanto como sea posible.

El rendimiento de extracción está directamente relacionado al coeficiente de partición del compuesto de interés entre las dos fases y se optimiza con el uso de una fase orgánica apropiada (411).

Los coeficientes de partición son, en muchos casos, dependientes del pH y muestran también gradientes inversos debido a la existencia de diferentes grupos funcionales en la misma molécula (412).

Es conveniente graficar el log K (coeficiente de partición) vs pH con el fin de elegir el pH más favorable para la extracción. Cuando esto no sea posible, se puede tomar en cuenta la acidez de los grupos funcionales y la influencia de otros sustituyentes en la molécula (413). A continuación se da una breve indicación del orden de acidez decreciente para los siguientes grupos funcionales:



Ya que un cambio de pH puede servir para separar compuestos estrechamente relacionados, por ejemplo un fármaco y su metabolito, es necesario conocer el intervalo de pH óptimo entre diferentes compuestos a fin de extraerlos completamente.

Los compuestos de polaridad alta o de carácter anfotérico se extraen con dificultad a cualquier pH.

Frecuentemente, se logra la extracción reduciendo el volumen de la fase acuosa o por liofilizado antes de la extracción. Otras posibles soluciones son por saturación mediante la adición de NaCl o Na_2SO_4 anhidro hasta que la fase acuosa desaparezca de la orgánica por un proceso conocido como "salting out" (414). Puede intentarse la extracción con un "barrido" de polaridad desde n-hexano a una mezcla de agua/etanol; o de agua a una mezcla etanol/n-hexano. La extracción líquido-líquido puede emplearse en línea con el sistema cromatográfico (415).

Otra técnica muy empleada es el uso de los agentes formadores de pares iónicos por medio de los cuales se forman complejos neutrales que pueden extraerse fácilmente:



En la tabla 3.1 se presenta un resumen de los procedimientos estándar de laboratorio, los problemas que presentan y los controles que se pueden emplear.

TABLA 3.1 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA. PROBLEMAS Y CONTROLES.

TIPO	Precipitación	Filtración	Liofilización	Evaporación	Extracción líquido-líquido	Extracción sólido-líquido
PROBLEMA	Oclusión del analito	Las trazas se adsorben en el flitro	Alta concentración de sales en la muestra	Oxidación de analitos	1. Impurezas del solvente introducidos en la muestra 2. Formación de emulsiones 3. Extracción de compuestos anfotéricos	1. Selección del empaque de la columna y los solventes de extracción 2. Variación de la superficie de la columna

PROCE- DIMIEN- TO CONTROL	Uso de estándar interno	Emplear la centrifuga- ción	Diluir la muestra antes del liofilizado	<ul style="list-style-type: none"> - Usar nitrógeno u otro gas inerte - Emplear baños de vapor - Emplear presión reducida - Emplear la centrifugación 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mejorar la calidad del solvente 2. Agitación manual suave. No vortex 3. Disminuir volumen de fase acuosa, liofilizar, saturar con sales o extraer con un barrido de solventes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar características del analito y la matriz biológica 2. Desproteínización y preconcentración
----------------------------------------------	----------------------------------------	--------------------------------------------	------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Quando se emplean los procedimientos estándar de laboratorio y no se logra una buena recuperación del fármaco es necesario probar otros procedimientos alternos que aunque sean menos tradicionales, pueden resultar en una mejor recuperación del fármaco.

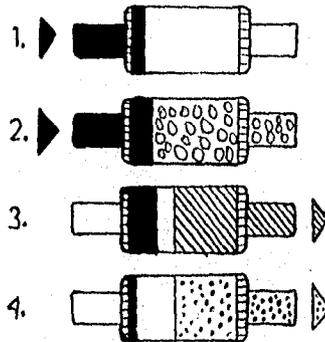
*extracción en fase sólida

*derivatización

*switching de columna

EXTRACCION EN FASE SOLIDA.

Otro modo de extraer solutos de muestras biológicas es mediante su adsorción selectiva sobre la superficie de partículas sólidas. Esta forma de pretratamiento de muestra se ha hecho muy popular en años recientes. El principio se visualiza en la figura 3.1.



1. Cargar la muestra.
2. Lavar el cartucho para eluir los compuestos no retenidos.
3. Usar solvente para eluir el primer compuesto de interés de la muestra.
4. Usar un solvente fuerte para eluir el segundo componente.

FIGURA 3.1 Extracción en fase sólida. Principio y procedimiento.

El fluido biológico se forza a través de una pequeña columna llena con partículas sólidas recubiertas las cuales pueden necesitar de un acondicionado previo. Los analitos contenidos en el fluido biológico muestran una gran afinidad por la superficie del sólido siendo fuertemente adsorbido sobre la superficie del empaque de la columna. La columna de extracción se lava posteriormente con un solvente de fuerza de elución suficiente para que los compuestos de interferencia sean eluidos de la columna pero no así el analito. Entonces el analito que se ha retenido se desadsorbe del sólido con un solvente de fuerza de elución adecuada y se colecta para su análisis posterior (416).

La selección del tipo de adsorbente es, en primera instancia, determinado por la naturaleza de los solutos y el fluido biológico (417). Una columna empacada con una superficie polar, como la sílica gel, será usada para adsorber medios polares y solutos polares disueltos en solventes no polares (418). Un empaque con superficie no polar, en este caso sílica gel alquil modificada, resulta adecuado para los problemas más comunes de adsorción de medios polares y solutos lipofílicos desde soluciones acuosas (419). Los empaques de intercambio iónico se usan para adsorber iones desde soluciones acuosas. Algunos de los diferentes tipos de empaques de columna se enlistan en la tabla 3.1. Para muestras biológicas se emplean principalmente los empaques no polares y los de intercambio iónico, aunque los empaques no polares comienzan a hacerse populares (420,421,422).

Las muestras biológicas contienen un gran número de compuestos endógenos que difieren ampliamente en su polaridad y los cuales muestran una afinidad variable por los empaques sólidos no polares (423,424). Esto es muy importante para seleccionar la composición de los solventes de lavado y desadsorción a fin de lograr que el compuesto más polar de la matriz se eluya y el compuesto más lipofílico permanezca sobre el empaque sólido. Es necesario que la diferencia en la fuerza de elución de los solventes de lavado y desadsorción sea lo más pequeña posible. De esta manera se puede colectar el analito junto solamente con algunos componentes de la

EMPAQUES POLARES

Silica Gel



Silica Gel Modificada (-CN;

o -diol; $-NO_2$; y $-NH_2$)

Dextranas modificadas

EMPAQUES NO POLARES

Polímeros porosos (XAD)

Carbón Poroso

Silica Gel Modificada (- C_2 - C_{18} ;

o -ciclohexil; -Fenil; -F; -CN)

Dextranas modificadas

INTERCAMBIADORES IONICOS

Resinas

Silica Gel Modificada

Dextranas modificadas

Grupos Acidos: Acido Sulfónico,

Acido carboxílico

Grupos Básicos: Aminas

secundarias,

Aminas

cuaternarias.

ESPECIALIZADAS

Silica Gel Modificada de Acido

Fenilborónico

Empaques para Inmunofinidad

TABLA 3.2 Lista de empaques de columna disponibles comercialmente y adecuadas para extracción en fase sólida.

matriz de polaridad similar (425,426).

Otro aspecto de la extracción en fase sólida que ha tenido poca atención, es el hecho de que la superficie de la fase sólida se modifica debido a la fuerza de adsorción de los compuestos presentes en la matriz biológica en una cantidad relativamente

grande. Por ejemplo, el plasma contiene aproximadamente 70 mg/ml de proteínas, las cuales muestran una fuerte adsorción sobre los empaques no polares en presencia de agua. La carga de proteínas para un empaque no polar puede ser tan alto como de 100 mg/g de empaque. Sin embargo, cuando se aplica 1 ml de plasma a una columna de extracción de fase sólida conteniendo 0.5 g de empaque, la superficie del empaque se satura con proteínas. La adsorción del analito y los compuestos de la matriz ocurre entonces sobre las proteínas adsorbidas como una especie de enlace a proteínas en vez de adsorberse en el empaque de la columna. Esta es una situación indeseable ya que las propiedades cromatográficas de la columna de extracción dependen, entonces, de la cantidad de proteínas presentes en la muestra y del tipo de empaque sólido usado. Esta puede ser una de las razones por la que algunos autores encuentran diferencias significativas en la recuperación entre las diferentes columnas disponibles comercialmente y también entre lotes de una misma marca (427). Por esto, aunque la selección de los solventes de lavado y desadsorción estén de acuerdo a las características cromatográficas del analito que se desea cuantificar y se emplee una columna analítica que contenga el mismo tipo de empaque que la columna de extracción, no es posible obtener una recuperación reproducible cuando la superficie se modifica por las proteínas ya que el enlace a las proteínas no puede ser controlado. Como opción se recurre a la remoción de las proteínas y la preconcentración de la muestra para lograr la reproducibilidad del procedimiento y disminuir la variación en la recuperación debido a la composición de la muestra.

La extracción en fase sólida también ha sido empleada en piel (428,429), tejido animal (430), músculo (431,432), hígado (431,433), y riñón (431,434,435) después de la homogenización. También se ha empleado directamente en orina (436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446), saliva (437), bilis (433,447), jugo gástrico (433) y heces (433).

Cuando se combina la extracción en fase sólida con CLAR hay otro aspecto que deberá considerarse y es la selección del tipo de

empaques en ambas columnas (de separación y analítica) (448,449). Estos empaques deben de ser tan diferentes como sea posible a fin de crear un sistema multidimensional y tener un poder de separación mucho mayor que con una sola columna (450). Al respecto, una de las grandes desventajas de la extracción en fase líquida es que combinada con CLAR carece de esta característica multidimensional. La selección de los empaques de columna para extracción en fase sólida puede extenderse con empaques que adsorben selectivamente un compuesto en particular o un grupo de compuestos de acuerdo a las características de polaridad que les confiere un determinado grupo funcional (451,454). Otra ventaja es la posible automatización on-line combinando CLAR con extracción en fase sólida (452).

Para constituyentes en trazas se ha desarrollado un método en pipeta Pasteur (453).

En muchos casos, el rendimiento de la extracción líquido-sólido, es superior a la de la extracción líquido-líquido (455,456), pero el número y la cantidad de constituyentes co-extraídos es también grande (457). Además, pueden necesitarse más etapas previas de limpieza que para la extracción líquido-líquido. La combinación de diferentes mecanismos de extracción, siempre que sea posible, son recomendables ya que resulta en extractos muy limpios, sin embargo, la optimización resulta más complicada que en extracciones simples.

En análisis de rutina, el uso de las columnas de extracción líquido-sólido muestran grandes ventajas prácticas como son la facilidad de preparación, un menor consumo de tiempo muy importante en compuestos fácilmente oxidables (458) y el empleo de cantidades de muestra más pequeñas (459).

FORMACION DE DERIVADOS.

La formación de derivados se utiliza cuando se necesita dar estabilidad a los fármacos en el caso de que estos resulten fácilmente degradables en el medio del fluido biológico, o si son volátiles o reactivos. También es útil cuando se necesita cambiar la polaridad de un compuesto para facilitar su extracción o su

separación cromatográfica o para extraerlo selectivamente mediante una reacción específica. Y más comúnmente para proveer de detectabilidad a los fármacos que no la tienen o si se desea incrementar la sensibilidad (460,461).

Los fármacos pueden ser neutros, ácidos o básicos. Formando derivados de alguno o todos los grupos funcionales en su molécula pueden logarse compuestos detectables (462) y con características cromatográficas. Ya que el detector UV-visible es el más comúnmente usado, la formación de derivados generalmente se enfoca a desarrollar compuestos que absorban en este intervalo del espectro. Los derivados fluorescentes se emplean para la detección de trazas cuando otros detectores no pueden emplearse.

Dado que la formación de derivados se ha usado en un gran número de compuestos de interés farmacéutico, vamos a clasificarlos de acuerdo a su grupo funcional como ácidos, alcaloides, aminas, antibióticos, barbitúricos y compuestos relacionados, compuestos hidroxil, esteroides y compuestos misceláneos. Esta clasificación facilitará la comprensión del proceso de derivatización.

Ácidos.

Este grupo se ha dividido en aminoácidos y otros ácidos carboxílicos. Debe notarse que los aminoácidos y los cetoácidos poseen otros grupos además del grupo carboxílico, los cuales permiten tener diferentes opciones para formar derivados.

Aminoácidos. Un procedimiento que se ha usado extensamente para el análisis de aminoácidos es la formación de derivados de feniltiohidantoínas. Estos derivados pueden separarse por alguna de las siguientes modalidades de CLAR: Intercambio iónico, adsorción y fase reversa.

La reacción con 2,4-dinitrofluorobenceno, se usa para el análisis de aminoácidos N-terminales mediante detección U.V.

El cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo) reacciona con el grupo amino para formar derivados altamente fluorescentes. El reemplazo del

grupo dimetilamino del cloruro de dansilo por un grupo di-n-butilamino da lugar a la formación de derivados menos polares que pueden extraerse fácilmente de la mezcla de reacción. Para obtener derivados fluorescentes puede usarse también la fluorescamina (4-fenilspirofuran-2(3H),1'-ftalenol-3,3'-diona) que reacciona con el grupo amino primario; así como el o-ftalaldehído en medio alcalino y en presencia de un agente reductor (463,464,465), sin embargo, la prolina y la hidroxiprolina no pueden detectarse mediante esta reacción. Otra opción es la reacción con piridoxal en medio alcalino y la reacción con malonato de dietiletoximetileno (466).

Las mezclas racémicas de aminoácidos se han resuelto como una mezcla diastereomérica después de la reacción con N-d-10-canforsulfonil-p-nitrobenzoato.

La ninhidrina se ha usado extensamente como un reactivo para el análisis colorimétrico de aminoácidos; este reactivo puede usarse para derivatización post columna (467). También se ha usado la fluorescamina en derivatización post columna para el análisis de oxitocina, lisinvasopresina y ornipresina. Igualmente se ha empleado la complejación metálica de aminoácidos post-columna (468).

Otros ácidos carboxílicos. Para su determinación se usa la formación de derivados con metilésteres separándolos en columnas de fase reversa usando un detector de índice de refracción. Para lograr absorción al UV se ha utilizado agentes de derivatización aromática por ejemplo, la formación de 2-naftasilésteres para ácidos grasos así como los fenasilésteres preparados en reacción con 2-bromoacetofenona y los bencilésteres preparados en reacción con 1-bencil-3-p-toliltriacina y o-ftalaldehído para la mexiletina (385). También se reporta la separación de bencilésteres preparados con O-p-nitrobencil-N,N'-diisopropilurea. Las coronas de éteres se emplean como catalizadores para producir derivados fenacilo de ácidos grasos. Así como el uso de la 3-bromometil-7-metoxi-1,4-benzoxazin-2-ona (470) y

9-antrildiazometano (469) para rendir derivados fluorescentes, y cloruro de dansilo para formar derivados del ácido aminocaproico (471), el uso del 1-pironildiazometano para ácidos dicarboxílicos (472), y el (s)-2-octanol para resolución óptica (473) al igual que etilcloroformato y amisidida (474).

La Vitamina B forma derivados con semicarbazida (475).

Las prostaglandinas contienen varios grupos funcionales además del grupo carboxílico que pueden manipularse de varias maneras para lograr las características cromatográficas que permiten su cuantificación.

Las prostaglandinas se separan por fase reversa después de su esterificación y conversión a *p*-nitrobenciloximas, *p*-bromofenacilésteres y *p*-nitrofenacilésteres por reacción del grupo carboxílico con bromuro de *p*-nitrofenacilo (476).

También se resuelven algunos ácidos isoprenoidales ópticamente activos por reacción con R- o S- α -metil-*p*-nitrobencilamina (477,478). En ácidos carboxílicos se emplea, para su resolución, la fluorescencia inducida por laser (479) así como el (-)-2-[4-(1-aminoetil)fenil]-6-metoxibezoxazol (APMB) para formar aminas diastereoméricas (480).

Las técnicas de derivatización post columna se basan en la neutralización del grupo carboxílico con la sal sódica del *o*-nitrofenol, así como la oxidación del grupo carboxílico con cerio (461).

Alcaloides.

Los alcaloides como la emetina, efedrina y morfina exhiben fluorescencia al reaccionar con cloruro de dansilo no así para la codeína y nicotina. De esta misma manera se determinan cannabinoides en orina humana. También se ha usado la hidrazina y la ninhidrina para analizar los senosidos A, B y C (481).

Los compuestos sustituidos de tetrahidroisoquinolinas se irradian con luz UV *in situ* en fluidos biológicos para lograr su oxidación hacia los derivados isoquinolina.

Aminas.

La formación de derivados aquí es para las aminas alifáticas, las cuales se han tratado con cloruro de dansilo para formar derivados fluorescentes (482,483,484) y también con 4-cloro-7-nitrobenzen-2,1,3-oxadiazol, o-ftalaldehído, fluorescamina e isobutilcloroformato (485,486,487,488).

Para las arilhidroxilaminas se tiene la formar de derivados con metilisocianato. Para diaminas y poliaminas bioquímicamente importantes se tiene, además, la reacción con cloruro de *p*-toluensulfonilo y *m*-toluensulfonilo (489). Para resolución de aminas se ha empleado la formación de derivados con *N*-succinimidil- α -metoxifenilacetato (490).

Para la derivatización post columna se tiene la reacción con etilendiamina (491) y reacciones redox con cerio (492,493).

Antibióticos.

La formación de ésteres de fenacilo permite la absorción al UV y la reacción con fluorescamina produce derivados fluorescentes para la ampicilina, kanamicina, neomicina, polimixina B, estreptomycin y cimetidina (494).

La oximetacina se hace reaccionar con o-ftalaldehído en derivatización pre-columna y ácido 3-mercaptopropiónico en reacción post-columna (495).

La dextrina se ha usado para la complejación de anfotericina y sulfametoxazol logrando aumentar su estabilidad y su solubilidad (496).

La vainillina y el 4-dimetilaminobenzaldehído se emplean para la derivatización post-columna para monensina, narasina y salinamicina (497).

Barbitúricos y Compuestos Relacionados.

Se usa el cloruro de dansilo, para la difenilhidantoína la oxidación con permanganato alcalino y 9-fluorometilcloroformato (498).

Compuestos Carbonilo.

Para grupos carbonilo diferentes a los cetoácidos y cetosteroides. La 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNP) es el reactivo más frecuentemente usado para la formación de derivados de aldehídos y cetonas. También se pueden marcar fluorogénicamente con dansilhidrazina (499).

Hidroxy Compuestos.

La formación de acetatos de catecolaminas las provee de las características cromatográficas deseadas. De manera similar la metilación de hidroxixantonas permite su separación eficiente.

Un gran incremento en la detección se logra por la formación de derivados nitrobenzoato de diversos alcoholes polihídricos (500).

La reacción de los carbohidratos con sulfato de etilendiamina produce un compuesto fluorescente. La reacción es adecuada para compuestos polihidroxil alifáticos, sin embargo los aldehídos interfieren. Para monosacáridos, disacáridos y trisacáridos se puede recurrir a la formación de 4-nitrobenzoatos; para compuestos hidroxy y polihidroxy a los derivados perbenzoylados y al uso del dietiltiocarbamato de sodio para formar un derivado del dihidrogalactiol.

La derivatización post columna requiere del tratamiento con calor y ácido fenolsulfónico (501) otro recurso es el análisis fluorométrico de carbohidratos sobre la reducción de cerio (IV) a cerio (III) y el purpald (4-amino-3-hidrazin-5-mercapto-1,2,4-triazol) (502).

Esteroides y Otras Hormonas.

La formación de acetatos de esteroides se usan para su separación. De manera similar, los metilsilil derivados se preparan para resolver epimeros de vitaminas.

Se ha empleado el 1-naftolilcloruro para la formación de derivados de digoxina en plasma y orina (503).

Los cetoesteroides se analizan por la formación de derivados

de la 2,4-dinitrofenilhidrazona. Las hidrazonas fluorescentes se forman por reacción con 5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonilhidrazina y difenil-1-1-pirenilfosfina (504).

Los benzoil derivados de los hidroxil esteroides se emplean para análisis U.V. (505).

La reacción del 1-etoxi-4-(dicloro-sim-triazinil)naftaleno se ha usado para los grupos hidroxilo de corticoesteroides, sin embargo, esta reacción no es válida para grupos hidroxilo alifáticos secundarios.

Los estrógenos forman derivados que absorben al UV con cloruro de azobencen-4-sulfonil. También se puede lograr la dansilación del grupo fenólico de los estrógenos.

Se ha empleado la reacción con t-butildimetilsilileter para derivar Vitamina A en plasma (506).

Niceláneos.

Para proveer de fluorescencia a las 2,4-diaminopirimidinas se han acompañado del tratamiento del eluato con una solución de bisulfato de amonio. La clorpromazina y muchos de sus metabolitos reaccionan con cloruro de dansilo para formar derivados fluorescentes. Las fenotiazinas pueden analizarse post columna por oxidación a productos fluorescentes.

Los glucósidos cardiacos reaccionan con el cloruro de p-nitrobenzoilo para formar polinitrobenzoatos.

El cloruro de bencilo se usa para formar derivados de cerebrósidos.

Las sapogeninas mayores del Agave se analizan por reacción con cloruro de benzoilo (507).

La cisplatina reacciona con dietilditiocarbamato para formar un compuesto fluorescente (508).

Para el análisis de enantiómeros de la warfarina resulta útil la reacción con 1-metilcloroformato (509).

Se ha empleado el peróxido de hidrógeno in-line (contenido en la fase móvil) para la determinación fluorométrica de indometacina (510).

La acroleína forma derivados con m-aminofenol en presencia de sulfato ferroso en solución acuosa de ácido sulfúrico (511).

En la tabla 3.3 se resumen los sustratos y los productos de la formación de derivados para compuestos de interés farmacéutico.

Derivatización Para La Detección Amperométrica.

Es afortunado que la mayoría de los reactivos comunes para la derivatización UV cuenten con el cromóforo nitrofenil que permite lograr una alta absorptividad molar. Este mismo grupo es importante para la detección electroquímica a través de reacciones de reducción. A continuación se da una lista de los reactivos que se usan para la formación de derivados de ciertos compuestos dependiendo del grupo funcional disponible (512,513).

Reactivo (abreviación)	Sustrato
DNBC	ROH, R ₁ R ₂ NH
SNPA	R ₁ R ₂ NH
DNFB	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{RCHCOOH}, \text{R}_1\text{R}_2\text{NH} \end{array}$
DNBS	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{RCHCOOH}, \text{R}_1\text{R}_2\text{NH} \end{array}$
PNBDI	RCOOH
PNBB	RCOOH
DNPH	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1\text{CR}_2, \text{RCHO} \end{array}$

El uso de estos reactivos dependerá de algunas consideraciones

TABLA 3.3. FORMACION DE DERIVADOS

GRUPO	SÚSTANCIA	PRODUCTO	MODALIDAD CLAR O DETECCION SUGERIDA
ACIDOS CARBOXILICOS	Aminoácidos	Derivados de fenilhidantoínas	Intercambio iónico, fase reversa, adsorción
	Aminoácidos terminales	Derivado de 2,4-dinitrofluoro benceno	Detección U.V.
	Grupo amino	- Derivados de cloruro de dansilo - Derivados de fluorescamina y o-ftalaldehído, piridoxal y malonato de dietiletoximetileno	
	Mezclas racémicas de aminoácidos	Derivado de N-d-10-canforsulfo-nil-p-nitrobenzoato	
	Reacción post-columna de aminoácidos	- Derivados de ninhidrina y fluorescamina - Complejos metálicos	
	Acidos grasos	- Derivados de metilésteres - 2-naftasilésteres - bencilésteres - derivados fenacilo - derivados de cloruro de dansilo	- Fase reversa con índice de refracción - Detección U.V. y de fluorescencia

	Prosta- glandinas	- p-nitrobenciloximas - p-bromofenacilésteres - p-nitrofenacilésteres	Fese reversa
	Acidos iso- prenoidales	Resolución óptica	
	Acidos carboxílicos	- aminas diastereoméricas - derivados oxidados	- Detección de fluorescencia - Reacción post-columna
ALCALOIDES	- Emetina, efedrina, morfina - Canabinoides en orina	Derivados de cloruro de dansilo	Detección de fluorescencia
	Senósidos A, B y C	Derivados de hidrazina y ninhidrina	Detección de fluorescencia
	Tetrahydro- isoquinolinas	Derivados isoquinolina	
AMINAS	Aminas alifáticas	Derivados de cloruro de dansilo	Detección de fluorescencia
	Arlhidroxil- aminas	Derivados de metilisocianato	
	Diaminas y poliaminas	Derivados de cloruro de p-toluensulfonilo y m-toluensulfonilo	
	Resolución de aminas	Derivados de N-succinimidil- metoxifenilacetato	
	Reacción post- columna	- Derivados de etilendiamina - Compuestos redox con cerio	

ANTIBIOTICOS	Ampicilina, kanamicina, neomicina, polimicina B, estreptomina cimetidina	- Esteres de fenacilo - Derivados de fluorescamina	- Detección U.V. - Detección de fluorescencia
	Oximetacina	- Derivados de o-ftalaldehído en reacción pre-columna - Derivado del ácido 3-mercaptopropiónico en reacción post-columna	
	Anfoteracina y sulfametoxazol	Complejos de dextrina	
	Monensina, narasina, salimicina	Derivados post-columna de vainillina y 4-dimetilamonibenzaldehído	
BARBITURICOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS	Barbitúricos	Derivados de cloruro de dansilo	Detección de fluorescencia
	Difenil hidantoína	-Oxidación con permanganato de potasio - Derivados de 9-fluorometilcloroformato	
COMPUESTOS CARBONILO	Aldehídos y cetonas	-Derivados de 2,4-dinitrofenilhidrazina - Derivados de dansilhidrazina	Detección de fluorescencia
HIDROXI COMPUESTOS	Catecolaminas	Acetatos de catecolaminas	
	Hidroxi- xantonas	Metilados de hidroxixantonas	

	Alcoholes polihídricos	Derivados de nitrobenzoato	
	Carbohidratos polihidroxil alifáticos	Derivados de sulfonato de etilendiamina (interferencia de aldehídos)	
	Monosacáridos, disacáridos, trisacáridos	Derivados de 4-nitrobenzoatos	
	Compuestos hidrox y polihidrox	- Derivados perbenzoilados - Derivados dihidrogallactiol	
	Carbohidratos	- Derivados post-columna del ácido fenolsulfónico - Reducción con cerio - Derivados de purpald	- Detección U.V. - Detección electroquímica
ESTEROIDES Y OTRAS HORMONAS	Mezclas racémicas de esteroides	Acetatos de esteroides	
	Mezclas racémicas de vitaminas	Metilsilil derivados	
	Digoxina	Derivado de 1-naftolilcloruro	
	Cetoesteroides	- Derivados de 2,4-fenilhidrazona - Hidrazonas fluorescentes	- Detección U.V. - Detección de fluorescencia
	Hidroxi esteroides	Benzoil derivados	Detección U.V.

ESTRUCTURA DE LA SUSTANCIA
 ESTE ES UN SISTEMA

	Estrógenos	Derivados de cloruro de azobencen-4-sulfonil	Detección U.V.
	Grupo fenólico de estrógenos	Dansilación	Detección de fluorescencia
	Vitamina A	Derivado de t-butilmetilsililéter	
MISCELANEOS	2,4-diamino piridinas	Derivado del eluato con bisulfato de amonio	Detección de fluorescencia
	Clorpromazina y sus metabolitos	Derivados de cloruro de dansilo	Detección de fluorescencia
	Fenotiazinas	Derivados oxidados	Detección de fluorescencia
	Glucósidos cardíacos	Polinitrobenzoatos	
	Cerebrósidos	Derivados de cloruro de bencilo	
	Sapogeninas	Derivados de cloruro de benzoilo	
	Cisplatina	Derivados de dietiltiocarbamato	Detección de fluorescencia
	Enantiómeros de warfarina	Derivado de 1-metilcloroformato	
	Indometacina	Derivado in-line de peróxido de hidrógeno	Detección de fluorescencia
	Acroleína	Derivado de m-aminofenol	

como: si el compuesto de interés puede ser removido individualmente de la mezcla de reacción, si los productos son hidrofóbicos y no pueden ser eluidos o no son compatibles con la fase móvil (S14), y si los K' (coeficiente de partición) son suficientemente diferentes para lograr la separación.

Ciertas moléculas de interés farmacéutico no son electroactivas. Sin embargo, pueden ser oxidadas por enzimas clasificadas como oxidorreductasas (S15). Esta clase de enzimas oxidan el sustrato con transferencia de electrones a una molécula aceptora como es la adenin nicotinamida dinucleótido (NAD). La forma reducida de este cofactor ha mostrado ser fácilmente oxidado en la superficie del electrodo de vidrio y carbón. Consecuentemente, uno puede cuantificar indirectamente la cantidad original de compuesto no electroactivo por la oxidación del cofactor reducido producido por la reacción enzimática (S16).

Consideraciones Generales en la Derivatización Química.

Ya que se trata de reacciones químicas, se intenta tener el mayor rendimiento, por lo que es necesario cuidar la reactividad y la pureza de los reactivos (S17). Obtener ambas características es difícil ya que los compuestos de alta reactividad tienden a reaccionar con materiales extraños y descomponerse.

Las evaporaciones repetidas pueden concentrar las trazas de impurezas. Debe recordarse que los solventes de 'grado espectro' no son necesariamente los más puros ya que pueden contener cantidades significativas de sustancias que no se detectan en el espectro.

Los reactivos usados en exceso, de manera general se remueven antes del análisis. Los reactivos volátiles pueden removerse simplemente por evaporación pero teniendo en mente que puede ocurrir una pérdida de los derivados volátiles. Puede también emplearse la extracción del reactivo en exceso, previendo que el derivado sea estable a las condiciones de extracción. Para derivados solubles en fase orgánica puede lograrse la formación de un derivado extraíble en fase acuosa con un exceso de otro sustrato

difuncional. Por ejemplo, en un método en particular de formación de derivados para ácidos carboxílicos, el exceso de pentafluorobencilbromuro se remueve por reacción con un aminofenol. Los productos que se forman con el reactivo y el aminofenol que se encuentra en exceso se separan por extracción en ácido acuoso.

Aunque a todos los detectores les afecta en mayor o menor grado la composición de la fase móvil, para la detección electroquímica es un factor fundamental. Deberá considerarse la fuerza iónica, el pH y la composición del solvente de la fase móvil. La fuerza iónica debe ser de preferencia alta. El pH afecta las características electroquímicas de muchos compuestos orgánicos. Las oxidaciones o reducciones pueden favorecerse a determinado pH, sin embargo, este cambio de pH puede afectar la fase estacionaria empleada en CLAR con detección electroquímica, por lo que la única solución será un cambio de fase móvil post columna (S18).

SWITCHING DE COLUMNA.

El switching de columna o cromatografía de líquidos multidimensional usa dos o más columnas para la separación de los componentes de una muestra. En el caso de fluidos biológicos se puede lograr la limpieza de la muestra con inyección directa (S19). Las proteínas y muchos otros componentes que no interesan pasan a través de la columna de extracción hasta la línea de desechos permitiendo sólo el paso del compuesto de interés hacia la columna analítica. Las columnas son conectadas por una válvula de cambio que controla el flujo del solvente. Las dos columnas y la fase móvil se varían favoreciéndose más la resolución y la especificidad. En el laboratorio se emplea el switching de columna principalmente para la extracción y el análisis de fármacos en fluidos biológicos. Estos métodos son altamente automatizables y reducen el tiempo requerido para la preparación de la muestra (S20).

Un esquema típico del switching de columna se muestra en la figura 3.2. Dos bombas liberan diferentes fases móviles sobre dos columnas: una columna de extracción o precolumna y la columna

analítica. El flujo puede tomar una de dos rutas, la salida y la línea de la corrida, bajo el control de la posición de la válvula.

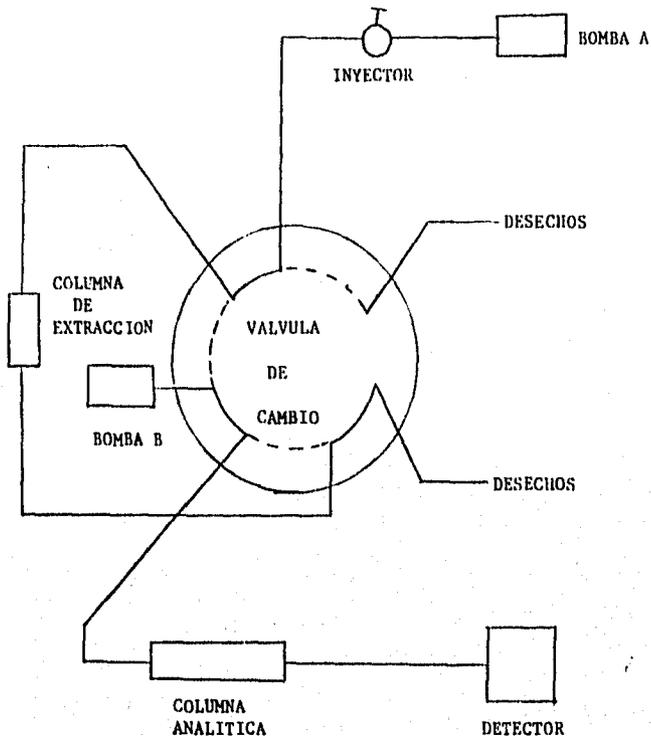


FIGURA. 3.2 Esquema que muestra las partes básicas que componen un switching de columna.

La rotación de la válvula está dirigida por presión de aire con control de tiempo.

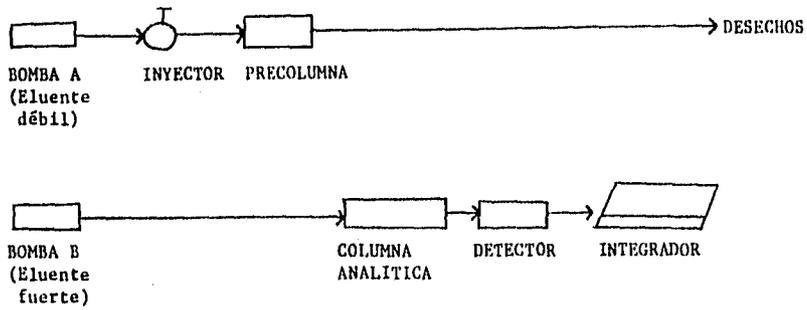
La figura 3.3 es una ilustración simplificada que muestra las rutas del flujo de fase móvil en las dos posiciones de la válvula. Durante el modo de inyección, la muestra entra en el sistema en una fase móvil débil y pasa directamente a la precolumna. La precolumna retiene los compuestos de interés momentáneamente permitiendo que los componentes que no interesan pasen por la línea hacia los desechos (521,522). Entretanto, una fase móvil fuerte (generalmente conteniendo un incremento en el porcentaje de la parte orgánica) pasa a través de la columna analítica y por un detector. Después de un tiempo breve, la válvula se cambia automáticamente. Esto tiene el poder de colocar la precolumna en serie con la columna analítica como se ilustra en el modo de elución de la figura 3.4. En este momento, los compuestos de interés son eluidos por la fase móvil sobre una columna analítica para su resolución y cuantificación (523). Después de un tiempo suficiente para eluir los compuestos de interés, la válvula regresa automáticamente a la posición inicial de "inyección" (524).

Esta forma de cromatografía multidimensional se realiza frecuentemente fuera de línea colectando las fracciones eluidas manual o automáticamente en un colector de fracciones. Las muestras colectadas pueden concentrarse o inyectarse directamente sobre una segunda columna CLAR. Las técnicas sobre línea son generalmente preferibles, especialmente si la intención es automatizar tanto la limpieza de la muestra como las operaciones de análisis.

Se definen cuatro técnicas básicas para la transferencia de fracciones de muestra:

- a) transferencia directa, en la cual, la salida de la columna 1 se introduce directamente en la columna 2, solamente durante el tiempo de elución de la fracción del analito;
- b) transferencia indirecta, en la cual la fracción del analito permanece sobre la columna 1 y se eluye a la columna 2 con una fase móvil fuerte;

MODO DE INYECCION



MODO DE ELUCION

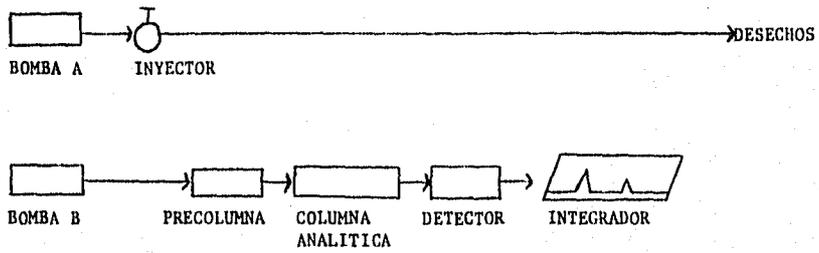


FIGURA 3.3 Esquema que ilustra los modos de inyección y elución en el switching de columna.

c) transferencia reversa, la cual es similar a la transferencia indirecta excepto que la fracción del analito de interés es transferido a la columna 2;

d) transferencia por circuito, en la cual la fracción del analito de interés va de la columna 1 al circuito donde se dirige a la columna 2 en la cual se dosifica por un segundo sistema de bombeo (525).

TECNICAS MISCELANEAS.

Estas técnicas han sido pobremente explotadas y sólo en años recientes se han podido desarrollar aunque su uso esté muy poco difundido, sólo la primera ha tenido buena aceptación, por lo que más investigadores la han usado y su desarrollo ha ido en aumento.

EXTRACCION POR FLUIDO SUPERCRITICO. Se emplean fluidos supercríticos como el dióxido de carbono para la extracción de las muestras (526,527), u otro, dependiendo de la naturaleza del compuesto a extraer (528,529).

El fluido se encuentra en una fuente. Se emplea también una bomba (ya sea recíproca o de inyección), una columna de extracción que puede ser un simple tubo de acero inoxidable (530,531,532), y una vasija de colección del analito (533).

Las extracciones pueden ser realizadas en forma estática, dinámica o recirculante. En el modo estático, la celda de extracción se presuriza con el fluido supercrítico y se permite que se equilibre antes de que el analito se remueva para su colección. En el modo dinámico, el fluido supercrítico pasa a través de la celda y el analito se colecta continuamente. En el modo recirculante, el mismo fluido se bombea a través de la muestra, después de un tiempo, esta se bombea al recipiente de colección (534).

En la actualidad la extracción por fluido supercrítico se ha llegado a utilizar en combinación con otros tipos de técnicas de limpieza (535,536) como extracción en fase sólida, CLAR (537) o derivatización (538), e incluso se ha acoplado a un detector (539).

La principal ventaja se ha encontrado en su uso para compuestos termolábiles (540,541).

Al variar la presión y la temperatura se mejora la eficiencia del sistema (543,543), aparte de la eficiencia propia de la columna (544). Esta eficiencia puede alterarse por saturación de la columna debido a la cantidad de muestra, el tiempo de extracción, la polaridad de la muestra y del solvente empleado (545,546). Además, la composición del solvente puede afectar la presión a diferentes temperaturas (547).

La desventaja de esta técnica es el riesgo de usar gases comprimidos (548).

CROMATOGRAFIA MISCELAR. Los surfactantes que se emplean como agentes formadores de emulsión en fase reversa, se utilizan en gran concentración y forman miscelas favoreciendo la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en medio acuoso, aunque también puede tener carácter hidrofílico (549). Los surfactantes pueden reemplazar los modificadores orgánicos en la fase móvil (550,551). A mayor concentración, menor tiempo de retención en el analito (552). La selectividad se modifica controlando la concentración del surfactante (553). Puede hacerse la inyección de la muestra directamente, sin necesidad de limpieza previa (554,555,556).

SAPONIFICACION. Es un método para eliminar lípidos neutrales pero el analito debe ser estable en base acuosa. Posterior a la saponificación debe realizarse una extracción con solvente orgánico.

3.2 DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DE FARMACOS EN FLUIDOS BIOLOGICOS.

Tomando como referencia que se va a realizar una adaptación parcial del método analítico, en primera instancia, la etapa de desarrollo deberá cubrir al menos los siguientes puntos:

- 1.- Condiciones analíticas preliminares.
 - a) Optimización.
 - b) Tipo de detección.
- 2.- Eficiencia de la extracción, digestión y desarrollo de la reacción.
 - a) Elección del disolvente de extracción y digestión.
 - b) Optimización de la digestión y desarrollo de la reacción o formación del cromóforo.
 - c) Método de agitación.
 - d) Tipo de evaporación.
 - e) pH.
 - f) Optimización del tiempo de agitación y sonicación.
- 3.- Selección de la sustancia patrón de referencia interna o estándar interno (557).

De manera general, la etapa de desarrollo es la etapa de optimización de las condiciones del diseño.

Es difícil distinguir entre la etapa de desarrollo y la etapa de diseño ya que en muchas ocasiones ambas se realizan a la par o son intercaladas. A veces, estando en la etapa de desarrollo se debe regresar a la etapa de diseño y a la revisión bibliográfica para ver si las características del analito pueden ayudar a resolver algún problema durante la optimización del método o retomar estas características para elegir una nueva técnica de análisis si la que se está empleando no está resultando eficiente. Muchas otras veces, a la vez que se diseña se va ensayando y así desarrollando el método analítico. Este proceso se visualiza esquemáticamente en la figura 3.4.

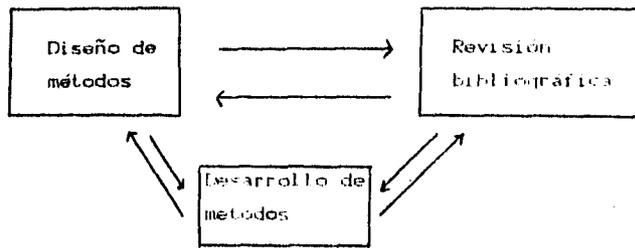


FIGURA 3.4 Esquema que muestra el proceso de diseño y desarrollo de métodos analíticos.

3.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DE FARMACOS EN FLUIDOS BIOLOGICOS.

La validación de los métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son: linealidad, reproducibilidad, exactitud, precisión, entre otros, obteniéndose información sobre la confiabilidad del método analítico. Por otra parte, los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son establecidos por la Secretaría de Salud del país (México), F.D.A. y F.I.P., por parte de organismos internacionales, los cuales han publicado una serie de normas y especificaciones legales que respaldan al método analítico, y, tomando esta referencia, cada laboratorio llevará a cabo una validación del método analítico de acuerdo a sus necesidades.

Al término de la etapa de validación se debe reunir la documentación siguiente:

- * Procedimiento de Validación.
- * Criterios de Aceptabilidad.
- * Reporte de Validación.

Por otra parte, para lograr un mejor entendimiento de la validación de los métodos analíticos, es conveniente seguir un esquema de conceptualización paso a paso; es decir, seguir los siguientes puntos:

- * Definición.
- * Procedimiento de Validación.
- * Parámetros estadísticos.
- * Criterios de Aceptación.

Los métodos deberán cumplir con los siguientes criterios:

- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión.
- Reproducibilidad.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.

Especificidad

Tolerancia (S58).

Además es indispensable conocer la estabilidad del fármaco y/o su o sus metabolitos tanto en fluidos biológicos como en el disolvente y/o fase móvil en donde se hará la cuantificación de la sustancia de interés.

1. - LINEALIDAD DEL SISTEMA (S59,560).

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

En base a los datos de concentración del fármaco reportados en la literatura, seleccionar entre 7 y 10 concentraciones para determinar la linealidad del sistema.

Pesar una cantidad del fármaco y preparar una solución patrón en el disolvente de elección, a partir de la cual se obtendrán por diluciones las concentraciones seleccionadas para generar la curva estándar. De preferencia utilizar el estándar interno a una sola concentración para todos los puntos de la curva estándar y adicionarlo desde el inicio del procedimiento. Preparar suficiente cantidad, distribuirla en alícuotas y congelarlas, para hacer la cuantificación del fármaco diariamente y por duplicado a cada nivel de concentraciones, durante el desarrollo y validación del método analítico. Hacer la determinación inicial de linealidad, analizando cada uno de los niveles de concentración seleccionados por triplicado.

Determinar la linealidad del sistema obteniendo la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación (S60).

2. - LINEALIDAD DEL METODO (S59,560).

Seleccionar 7 concentraciones, de preferencia iguales a los niveles ya estudiados para la linealidad del sistema. Se recomienda partir de la misma solución patrón, adicionada al plasma, suero o

sangre total. Distribuir en alícuotas y congelar suficientes muestras para realizar la cuantificación por duplicado por lo menos durante 5 días.

Determinar la linealidad del método tratando cada muestra de acuerdo al procedimiento analítico propuesto. Interpolar los resultados en la curva estándar.

Obtener las curvas promedio por día, tanto de la curva estándar como de los problemas y determinar los siguientes parámetros:

a) Parámetros de regresión lineal:

Intercepto

Pendiente

Coefficiente de determinación

b) Media aritmética

c) Porcentaje recuperado (resultados absolutos).

d) Coeficiente de variación por nivel de concentración y por todo el intervalo.

CRITERIOS DE ACEPTACION (559).

1. Hacer una prueba de hipótesis para la pendiente

$H_0: m = \gamma$ donde $\gamma = 1$

$H_1: m \neq \gamma$

Calcular la "t" experimental

$$t = \frac{(m - \gamma) (SX) \sqrt{n - 1}}{S_{y/x}}$$

Relación crítica bilateral con un nivel de significancia

$\gamma = 0.05$ para la pendiente

2. Hacer prueba de hipótesis para ordenada al origen

$H_0: b = \beta$ donde $\beta = \text{cero}$

$H_1: b \neq \beta$

Calcular la T experimental

x
x
x
x
x
x
x

$$t = \frac{b - p}{\frac{S_y}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \cdot SC_{er}}}}$$

Región crítica bilateral con un nivel de significancia

x
x
x
x

$\alpha = 0.05$ para la ordenada al origen

$t_{\alpha} < t_{calc} < t_{0.975}$

0

Comparar el valor de t calculado con el de las tablas.

Si $t_{calc} < t_{tablas}$ la hipótesis de nulidad no se rechaza.

x
x

3. $R > 0.98$
4. $R > 0.99$
5. $I, R < 10.21$
6. E.S.R. < -0.30
7. C.U R/C $< 3.0 \%$
8. PR = 0.98 - 1.02

Construir la tabla de análisis de la varianza (ANAVEVA)

x
x
x
x
x

1. Calcular la suma de cuadrados regresión (SCR) y la suma de cuadrados del error de regresión (SCer)

$$SCR = m \sum xy + b \sum y - \frac{(\sum y)^2}{r \cdot c}$$

Donde

- r = Réplicas por concentración
- c = Número de concentraciones

x
x

$$SC_{er} = \sum y^2 - m \sum xy - b \sum y$$

2. Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa)

$$\begin{aligned}
 * & \quad \quad \quad ? \quad \quad ? \\
 * & \quad SCep = \sum y^2 - (\sum y)^2 \\
 * & \quad \quad \quad \text{-----} \\
 * & \quad \quad \quad n
 \end{aligned}$$

$$SCfa = SCer - SCep$$

3. Construir la tabla del análisis de la varianza (CANAVEVA) con base a la siguiente tabla:

4. Tabla de Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medía de cuadrados	F
Regresión	1	SCr	SCr	SCr/MCer
Error de Regresión	n-2	SCer	SCer/gler	
Falta de Ajuste	(n-2)-t*(r-1)	SCfa	SCfa/glfa	MCfa/MCer
Error Puro	t*(r-1)	SCep	SCep/glep	

4. Determinar en la tabla de la distribución de 'F' los valores para 'F' (gler, gler; 0.95) y 'F' (glfa, gllep; 0.95)

$$F(gler, gler; 0.99) =$$

$$F(glfa, gllep; 0.95) =$$

5. Establecer la decisión con base a la siguiente regla:

$$\text{Si } Fr > \acute{o} = F(gler, gler; 0.99) \text{ y}$$

$$Ffa < F(glfa, gllep; 0.99)$$

El modelo lineal es correcto para escribir la relación entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y)

$$\text{Si } Fr > \acute{o} = F(gler, gler; 0.99) \text{ y}$$

$$Ffa > \acute{o} = F(glfa, gllep; 0.95)$$

Al modelo lineal se le debe adicionar un componente no lineal para describir la relación de la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y).

Si $F_r < C(q_r, gler; 0.99)$ y

$F_a > d = F(g_lafa, glep; 0.95)$

Un modelo no lineal es correcto para describir la relación de la cantidad adicionada (X) y la recuperada (Y)

3.-EXACTITUD (559,560).

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el cociente de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Pueden emplearse los resultados de porcentaje recuperado de la linealidad, pero siempre calculados en base a la cantidad adicionada.

Si no se utilizan los resultados de la linealidad, hacer 10 recuperaciones adicionando al blanco del fluido por analizar con cantidades conocida del analito y analizar las muestras de manera independiente por el mismo analista y en el mismo equipo. Registrar la respuesta.

CRITERIOS DE ACEPTACION (559).

Hacer prueba de hipótesis para la media

*

-

*

$H_0 : X = \mu$ donde $\mu = 100\%$ adicionado

*

-

*

$H_1 : X \neq \mu$

Nivel de significancia (α) = 0.050

Calcular la 'T' experimental

$$t_{exp} = X - \mu / (DE / \sqrt{n})$$

Buscar el valor de T teórico en las tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha = 0.050$ (mismo valor que IC).

Comparar el valor de T experimental con el de T de tablas.

Si $t_{0.025} < t_{cal} < t_{0.975}$ no se rechaza H_0 y el método se puede

considerar exacto con un $\alpha = 0.050$.

2. El valor del coeficiente de variación % debe ser de acuerdo al método. Para métodos cromatográficos el coeficiente de variación aceptado es de máximo 2 %.

4. -PRECISION (559).

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

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

a) Repetibilidad (559). Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (Analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b) Reproducibilidad (559). Es la precisión expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Analizar al menos seis muestras de un mismo lote utilizando el método descrito. Registrar y calcular la respuesta obtenida.

CRITERIOS DE ACEPTACION (559).

Proceder de acuerdo al punto de exactitud.

B. - REPRODUCIBILIDAD (559, 560).

Se deberá determinar por dos analistas durante dos días a dos concentraciones distintas y por triplicado.

Todas las muestras para el estudio deberán ser preparadas el mismo día por un analista y congelarse hasta el día del análisis. Los analistas deberán preparar individualmente las curvas estándar, las cuales estarán formadas cuando menos por cinco concentraciones

que serán iguales a los niveles ya considerados anteriormente.

Obtener las curvas promedio por día y determinar por analista los siguientes parámetros:

a) Parámetros de regresión lineal:

Intercepto

Pendiente

Coefficiente de determinación

b) Porcentaje recuperado, (resultados absolutos)

c) Media aritmética

d) Coeficiente de variación por nivel de concentración y por todo el intervalo.

CRITERIOS DE ACEPTACION (559).

Regla de Decisión:

$F_{cal} > \text{ó} = F_{tab}$, H_0 se rechaza

1. α_i ; H_0 = No debe modificarse el porcentaje de recuperación cuando el método analítico lo realizan diferentes analistas.

H_a = el porcentaje de recobro se debe modificar cuando el método analítico lo realizan diferentes analistas.

2. β_j (1) ; H_0 = No debe modificarse el porcentaje cuando el método analítico es realizado por los analistas en días diferentes.

6. - LIMITE DE DETECCION (559,560).

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

Hacer diluciones seriadas de la sustancia patrón de referencia hasta obtener una respuesta de dos veces por encima del nivel del ruido del sistema que por criterio universal se considera como el límite de detección.

Calcular el nivel de ruido de la siguiente manera:

$$x \text{ Límite de detección} = Z \frac{s}{\sqrt{N}}$$
 donde N es la altura del ruido

7. - LIMITE DE CUANTIFICACION (559,560).

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que

puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operaciones establecidas.

En diluciones sucesivas de la sustancia patrón de referencia determinar la cantidad mínima cuantificable, siendo esta, la cantidad mínima que cumpla con los siguientes criterios (560):

La mínima cantidad que presente un coeficiente de variación menor o igual al 15 %, siempre y cuando la determinación se lleve a cabo cuando menos por duplicado y por lo menos durante tres días.

La mínima cantidad que por su promedio de porcentaje recuperado esté comprendida entre el valor real \pm dos veces la desviación estándar.

8. -ESPECIFICIDAD (559,560).

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

La manera más adecuada de conocer la especificidad de un método es obtener los metabolitos e inyectarlos junto con la sustancia de interés con el objeto de asegurarse que no interfieren en el análisis. Esto no siempre será posible, por lo que es necesario buscar en la literatura un método que esté reportado como específico y trabajarlo de la misma manera.

El primer paso es demostrar que los elementos normales del plasma no interfieren con el análisis por lo que es necesario aplicar el método a un placebo de plasma, sangre, suero u orina y comprobar que no existen interferencias.

Si no es posible concluir que el método es específico, será necesario analizar la muestra utilizando otro sistema, otro método de detección u otra técnica analítica, (por ejemplo, cromatografía de gases).

El estándar interno deberá de ser el adecuado para que no interfiera con los metabolitos y de preferencia una sustancia relacionada químicamente con el fármaco de interés.

Si no se cuenta con suficiente información sobre los metabolitos, es recomendable trabajar con dos estándares internos

con diferente tiempo de retención, con objeto de tomar una decisión de cuál es el más adecuado.

Deberá llevarse a cabo una prueba con objeto de comprobar si el anticoagulante de los tubos no interfiere con el análisis.

Sería conveniente probar el método de análisis, adicionando a las muestras de plasma que contienen el compuesto de interés, otros fármacos utilizados comunmente, como analgésicos, antibióticos, etc.

Es necesario comprobar que el plasma adquirido para el desarrollo del método analítico, no contenga fármacos que puedan interferir con los resultados.

9. - ESTABILIDAD (559,560).

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se debe probar la estabilidad de la sustancia a analizar en la fase móvil o en el disolvente en la cual se va a cuantificar a intervalos razonables de tiempo a temperatura ambiente y mantenidas en refrigeración y/o congelación, y si es necesario, a temperaturas de menos 20 grados centígrados o inferiores, con objeto de determinar por cuanto tiempo y en qué condiciones deben mantenerse mientras se analizan. Este estudio se hará a intervalos razonables, dependiendo del tiempo que se necesite para el análisis de las muestras del estudio.

También es necesario hacer el estudio de estabilidad en intervalos cortos de tiempo, 8 a 24 horas, para conocer si las muestras se pueden mantener sin descomposición durante la manipulación para su análisis (561).

10. - TOLERANCIA (559,560).

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones

normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

Es necesario comprobar qué tan tolerante es el método a pequeñas variaciones que pueden ocurrir en los parámetros analíticos. Se recomiendan como ejemplo las siguientes pruebas:

Fase móvil.- Cambiar las proporciones del o los solventes orgánicos. Si están en proporciones menores al 10 %, llevar a cabo pruebas con +/- 50 % de la cantidad de solvente. Si están en proporción mayor al 50 %, hacer pruebas con +/- 10 %. Si la fase móvil es una mezcla compleja, manejar combinaciones diferentes de cada uno de los componentes (562).

Columnas.- Determinar con periodicidad la eficiencia de la columna cromatográfica durante el desarrollo y validación del método analítico, de acuerdo a un procedimiento previamente establecido. Comparar los resultados obtenidos sobre la misma muestra utilizando columnas cuya eficiencia difieran en 30 %.

Temperaturas.- Si el método analítico requiere de calentamiento de la columna, probar con +/- 10 grados centígrados de la temperatura recomendada.

CALCULOS.

Calcular factor de capacidad (k'), selectividad (α), resolución y simetría (F).

Calcular la eficiencia de la columna.

CRITERIOS DE ACEPTACION (559).

Factor de capacidad (k'): 1 a 10

Factor de selectividad (α): 1 a 2

Factor de simetría (F): 0.80 a 1.2

Factor de resolución (R): 1.5 a 5.

CAPITULO 4
ETAPA 4. ETAPA DE ANALISIS.

Cuando va a realizarse el análisis, pueden distinguirse dos etapas. La primera se trata de una etapa preparativa y la segunda es la etapa de análisis propiamente dicha. En la figura 4.1 se visualizan estas dos etapas (563).

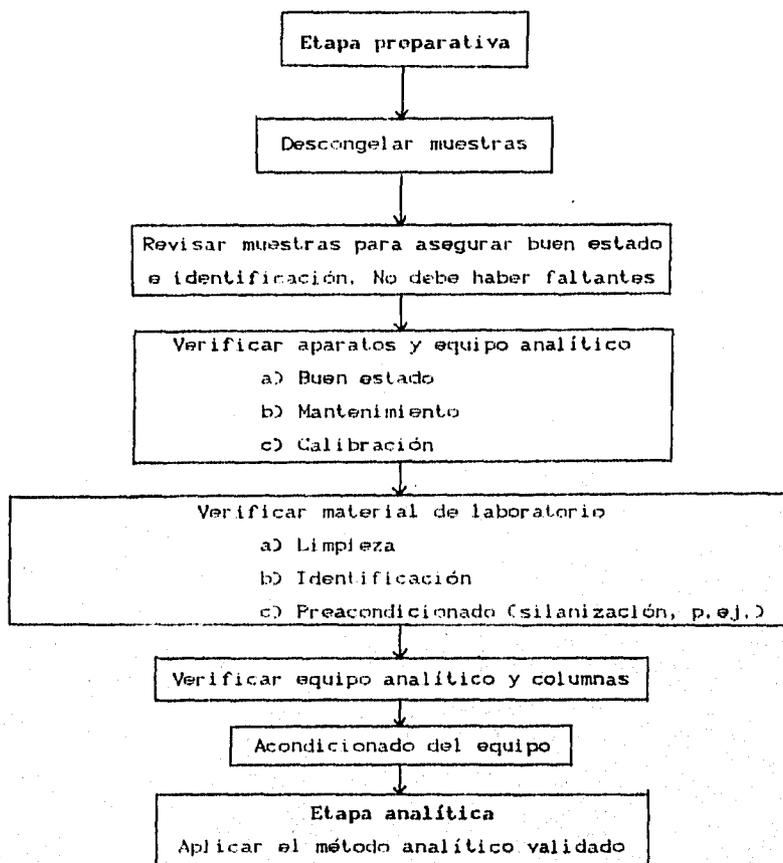


FIGURA 4.1 Esquema de las etapas que se involucran en la aplicación de un método analítico.

Estos procedimientos están basados en lo que son las GLP's que abarcan recomendaciones para los cuidados que deben tenerse durante los días de análisis. En estos días, no se permitirá el paso a 'ninguna' persona ajena al laboratorio para evitar contaminaciones, pérdidas o confusiones de muestras y que no ocurran accidentes por no seguir las medidas de seguridad marcadas. Se incluyen los accidentes provocados sobre el equipo o las muestras debido a la 'curiosidad' (564,565,566).

Además de los procedimientos generales que deben existir en todo el laboratorio analítico para cumplir con los procedimientos adecuados de laboratorio, es necesario contar cuando menos con los siguientes procedimientos estándar de operación (567,568):

- *Manejo de estándares.
 - *Limpieza, mantenimiento y uso de cada una de las partes del cromatógrafo.
 - *Determinación de las condiciones de las columnas cromatográficas.
 - *Lavado del material empleado en estudios de fármacos en fluidos biológicos.
 - *Control de plasma, sangre, suero, orina, etc. utilizado para la validación del método.
 - *Transporte adecuado de las muestras biológicas.
 - *Manejo y conservación de las muestras en el laboratorio.
 - *Preparación y control de los reactivos utilizados en los estudios.
 - *Recepción, inspección y registro de muestras biológicas.
 - *Análisis de las muestras (uso de blancos, muestras control, muestras doble ciego, orden de los análisis, etc.).
 - *Control de las muestras de retención.
 - *Personal autorizado para llevar a cabo diferentes funciones.
 - *Uso de las libretas de informe.
 - *Procedimientos para situaciones no previstas.
 - *Reanálisis.
 - *Informe de datos.
- Una vez determinadas todas las condiciones bajo las cuales se

va a trabajar en el laboratorio y de haber repartido funciones al personal que va a trabajar, puede comenzarse el análisis (569,570).

La prueba determinante para cualquier método viene cuando éste es aplicado a muestras reales. De ningún método se puede decir que ha sido desarrollado y evaluado hasta que no ha sido aplicado. Esto quiere decir que el criterio de aceptación se logra cuando el método funciona para el propósito para el cual ha sido desarrollado. A este nivel se comienza a cuestionar la tolerancia del método y este puede ser un factor determinante para su aceptación. Se puede desarrollar un método específico con un límite de detección bajo, pero si las manipulaciones que tienen lugar son de gran dificultad para el analista, esto puede crear una fuerte resistencia para aceptarlo como un método analítico de rutina. Dado que, para un estudio en fluidos biológicos se maneja un gran número de muestras, la robustez del método es considerado de gran importancia en el desarrollo del método analítico.

Finalmente, el método debe documentarse ampliamente. Ya que muchas decisiones importantes se hacen sobre los resultados del análisis y sobre este registro se basa el desarrollo y la evaluación de mismo. De esta manera, se requieren dos clases de documentación. En un documento, se darán los detalles prácticos del método final de manera que el laboratorio pueda llevar a cabo el análisis de manera rutinaria. El segundo documento, que puede complementar al primero en detalle, debe ser el reporte definitivo del método, en el cual debe estar explícita toda la investigación que se llevó a cabo para el desarrollo del método que aclare cualquier duda que se tenga sobre el método.

En la siguiente tabla se muestra un ejemplo de como puede realizarse un reporte:

REPORTE DE METODO ANALITICO.

Introducción y declaración general del problema incluyendo la sensibilidad esperada.

Descripción detallada del propósito del método.

Desarrollo del método.

Condiciones de extracción

Estabilidad del fármaco en los solventes

Selección del sistema cromatográfico

Selección del sistema de detección

Evaluación del método.

Recuperación durante el método

Precisión

Exactitud

Especificidad

Sensitividad

Aplicación (289).

CAPITULO 5
ETAPA 5. ADQUISICION Y EVALUACION DE DATOS CROMATOGRAFICOS.

Existen dos medidas cuantitativas usadas en las curvas: 1) alturas del pico y 2) áreas del pico. Para cuantificación es más preciso trabajar con áreas del pico. Las alturas de pico son útiles para la cuantificación cuando los tiempos de retención no son reproducibles o cuando los picos no resuelven adecuadamente (RS = resolución < 1.5)

La medida de las áreas del pico, se hacen por diversos caminos: 1) tiempo de alturas y anchura a la altitud media; 2) triangulación; 3) cortar y pesar; 4) planimetría; 5) integración DISC; 6) integración digital; 7) integración computarizada.

Aunque puede recurrirse a cualquiera de estas opciones, a la fecha es muy accesible la integración digital y la computarizada, que reducen en mucho el error y facilitan el manejo de los datos, por lo que en esta sección únicamente se considerarán estas dos opciones que en realidad son la conclusión del desarrollo de las iniciales (571,572,573).

Un integrador digital es un accesorio electrónico usado para determinar el área bajo el pico cromatográfico. El corazón de un integrador digital es un convertidor de voltaje-frecuencia (V-F) que genera una velocidad de pulso de salida proporcional a la señal de entrada. Durante el desarrollo de un pico, las pulsaciones del convertidor V-F son llevadas a un contador digital que acumula las pulsaciones por intervalos como t_1 a t_2 (como se muestra en la figura 5.10). Los números, que tienen de cinco a siete dígitos, son producidos con una precisión de aproximadamente $\pm 0.5\%$. Muchos integradores digitales modernos tienen compensadores para el ruido de la línea base; sin embargo, los primeros modelos sólo son capaces de manejar curvas similares como las que se muestran en la figura 5.1.

Los integradores computarizados incluyen la capacidad del integrador digital pero además son capaces de ajustar el ruido de la línea base. Los programas se almacenan en estas unidades para procesar los cromatogramas bajo una variedad de condiciones diferentes. El integrador computarizado moderno se programa para calcular concentraciones o composiciones en porcentaje y, en

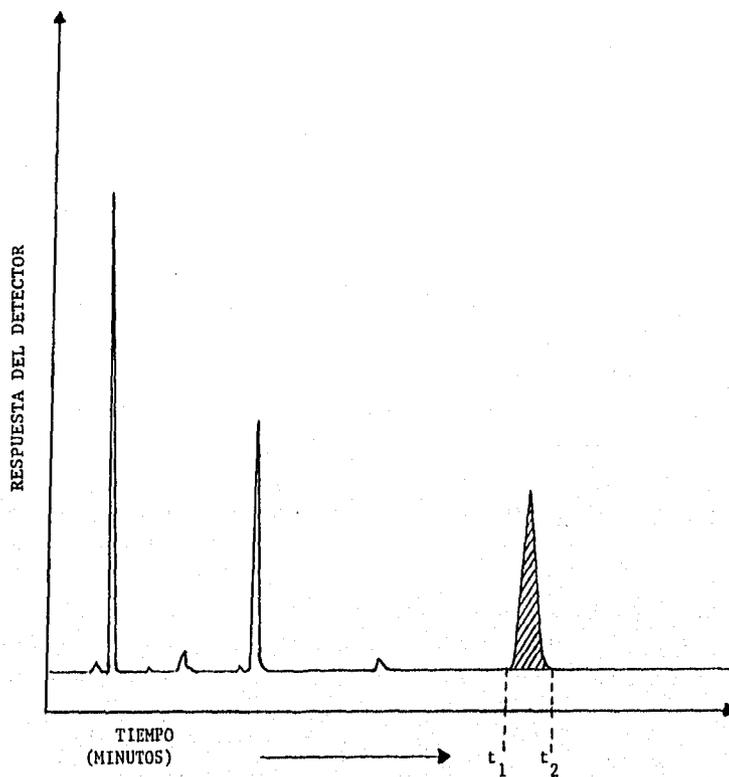


FIGURA 5.1. Cromatograma diferencial logrado por los más modernos recursos cromatográficos. El área sombreada es proporcional a la masa total eluida en el tiempo del intervalo (t_1-t_2).

cálculo de concentraciones o composiciones en porcentaje y, en algunos casos, se manejan picos pobremente resueltos mediante el manejo de los programas con que cuentan (574,575,576,577,578). Muchos integradores computarizados contienen un graficador que procesa datos que aparecen sobre el reporte del cromatograma (ver figura 5.2). El integrador computarizado puede proveer valores de precisión de +/- 0.5% o mejores (573,579,580,581,582).

Una vez que se ha decidido si emplear las alturas o áreas de pico, el analista debe contar con un método de calibración adecuado.

Es necesario recordar que la exactitud se lleva a cabo a través de medidas precisas y calibración. Así,

$$\text{Precisión} + \text{Calibración} = \text{Exactitud.}$$

Debido a las pérdidas en la recuperación del fármaco y la variación inherente a la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos, siempre se requiere la construcción de curvas de calibración a partir de los ensayos de estándares en el medio biológico de prueba. Esto se refiere a que no se acepta el desarrollo de una curva estándar (respuesta vs. concentración de fármaco) de un sistema "limpio" como un buffer o agua, y usarla después para interpolar las respuestas obtenidas por un fármaco contenido en una muestra biológica como plasma u orina (583).

En el análisis biofarmacéutico se usan tres métodos de calibración: (1) el método del estándar externo; (2) el método del estándar interno y (3) el método de adición de estándar.

METODO DE ESTANDAR EXTERNO (3).

El término estándar externo es sinónimo de fármaco o metabolito solo. Después de que se desarrolla la curva estándar y esta muestra ser reproducible sobre un intervalo de relevancia experimental o terapéutica, entonces puede establecerse un protocolo para análisis de rutina.

En un mismo día, se preparan cuatro o más estándares de concentración decreciente del fármaco contenido en un "pool" de

BRISTOL MYERS-SQUIBB Nacionalpan
 Laboratorio de Control Químico
 Reporte de Análisis HPLC
 Equipo: 717_486

Muestra: EK595 2HE3 30C
 Proyecto: AMPI
 Adquirida: 17/01/96 02:04
 Procesada: 17/01/96 10:37

INFORMACION GENERAL

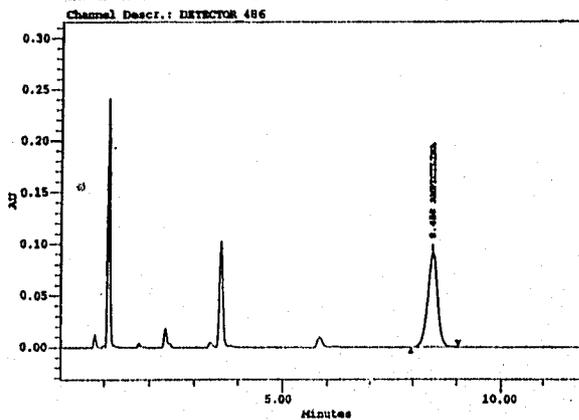
Tipo de muestra: Unknown Estandar Secundario de Ampicilina Anhidra
 Nombre: EK595 2HE3 30C Lote: PYSAA-080295 Potencia: 996 mcg/mg
 Pesada No: 1 Potencia: 996 mcg/mg
 Vial: 31 Caducidad: Febrero 1996
 Inyección: 1
 Volumen: 25.00 Fase Movil: Dodecil Sulfato de Sodio/Acetonitrilo/Agua
 Dilución: 50.00000 Diluyente: Acetonitrilo/Agua
 Peso: 0.64990
 Producto: Pentrexyl Micolitico 500/50
 No Analisis:

Usuario: YAMIN_OURAN

crmatograma_ampicilina

LibRevision v1.00

Date Printed: 18:43:34 on January 17, 1996



RESULTADOS

#	Nombre	Tiempo (min)	Area (uV*sec)	mg/g	Eficiencia	Coleo
1	AMPICILINA	8.458	1443935	201.553	6668	0.955

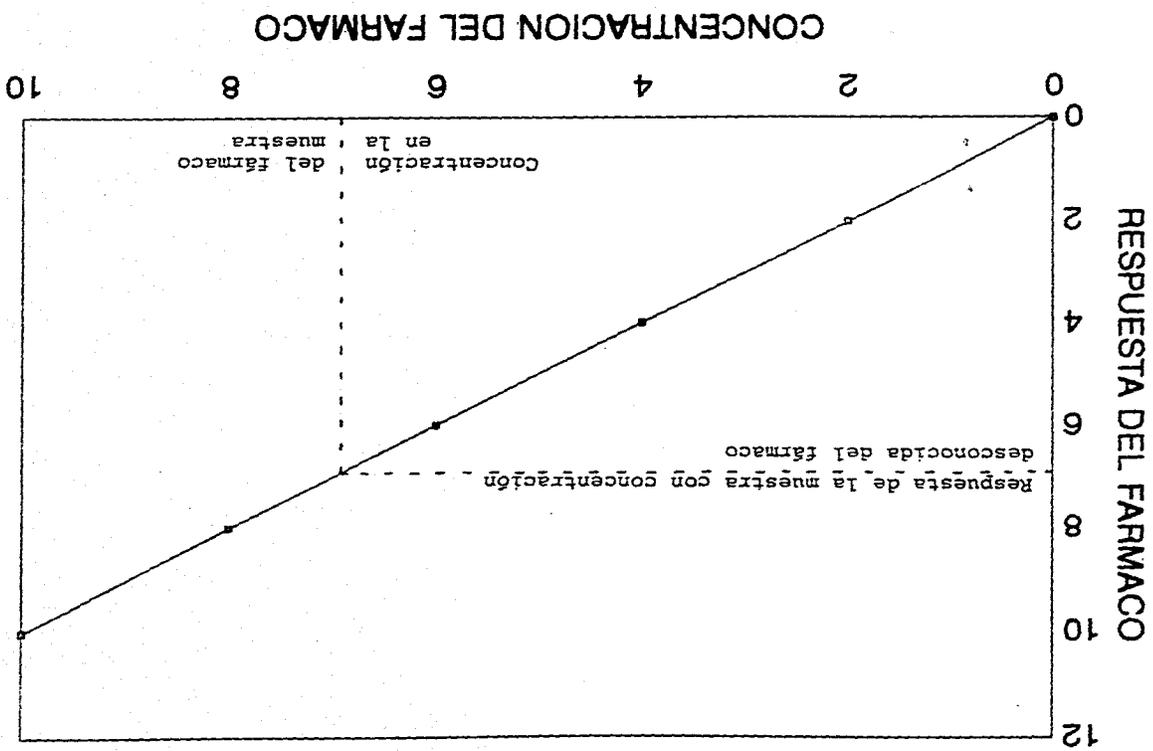
FIGURA 5.2. Ejemplo de un tipo de cromatograma obtenido por un integrador computarizado.

empleado para las muestras. Después del análisis se grafican las alturas o áreas medidas de los estándares contra la concentración del fármaco en la matriz biológica (Fig 5.30). La línea debe pasar a través del origen si no hay interferencias o pérdidas del fármaco durante el desarrollo cromatográfico. Cuando la curva no logra pasar por cero en el origen, se tendrán errores en las concentraciones interpoladas. Además, se debe obtener un coeficiente de correlación de 0.990 o mejor, si se espera obtener una precisión aceptable ($< 10\%$) en los ensayos subsiguientes (584).

Existe una seria dificultad en relación con el método del estándar externo y es que cada etapa en el ensayo debe estar cuidadosamente controlada. Si no es así, pueden introducirse errores por alteraciones en el manejo de varias muestras. Debido a esto, el método del estándar externo resulta en una pobre precisión en comparación con el método del estándar interno.

Idealmente, el analista debe desarrollar ensayos que tengan una reproducibilidad absoluta del 90% en la recuperación del fármaco o metabolito. Este porcentaje resulta difícil de obtener debido a diversos factores como son: la fuerza de enlace del fármaco a proteínas o a la pérdida por adsorción sobre la superficie del vidrio. Cuando se desarrolla el ensayo, se debe determinar la magnitud de pérdida del fármaco (estándar externo) que ocurre durante el procedimiento previo. Es importante descubrir qué pérdidas son reproducibles y cuáles varían a diferentes concentraciones del fármaco. Esto se logra mediante análisis hechos por sextuplicado en diferentes puntos de un intervalo de concentraciones lo suficientemente amplio para cubrir las variaciones de concentración del fármaco en el fluido biológico y se comparan los datos obtenidos con los de una curva estándar preparada con concentraciones decrecientes del fármaco disuelto en el solvente o solventes usados en el sistema cromatográfico. Las recuperaciones absolutas pueden estar en un rango de 50 a 100% (50% es el nivel más bajo aceptable), pero, este valor debe permanecer siempre en los reportes publicados.

FIG. 5.3 CURVA ESTANDAR IDEAL PARA UN FARMACO EN FLUIDO BIOLÓGICO



METODO DE ESTANDAR INTERNO (3).

Debido a los problemas asociados al método de estándar externo, se ha desarrollado un método llamado de estándar interno.

Un compuesto empleado como estándar interno debe tener las siguientes características: (1) no encontrarse en la muestra biológica de interés; (2) tener propiedades fisicoquímicas similares al compuesto que se desea cuantificar incluyendo el tiempo de retención y resolver de todos los demás picos del cromatograma; (3) se adiciona a las soluciones del estándar y muestras a una concentración aproximadamente igual a la del fármaco analizado; (4) debe ser de alta pureza y preferiblemente de fácil disponibilidad (885).

Un estándar interno se usa porque permite lograr exactitud y precisión en el ensayo.

En la práctica, el estándar interno se adiciona en una concentración establecida a estándares y muestras. Se analizan los estándares, se determinan las relaciones de respuesta (alturas o áreas de pico) del fármaco/estándar interno y se grafican contra concentración del fármaco en el fluido biológico.

Al adicionar el estándar interno a la muestra biológica, las variaciones en las cantidades de los extractos sometidos durante el procedimiento a la evaporación o suministrados para el análisis cromatográfico no afectan la exactitud y la precisión ya que se usan las relaciones (fármaco/estándar interno) en todas las determinaciones en vez de las alturas o áreas absolutas. Por medio de este método se eliminan también los errores en la inyección al cromatógrafo lograndose mayor reproducibilidad (886).

METODO DE ADICION DE ESTANDAR (3).

Aunque menos frecuentemente usado, los métodos de adición de estándar tiene alguna utilidad en los procedimientos cuantitativos de CLAR, especialmente para analizar compuestos en el límite de cuantificación de un ensayo o cercano a él.

En el método clásico de adición de estándar se agregan a tres o cuatro porciones de una muestra dada, concentraciones crecientes

del estándar externo (fármaco a ser analizado) (3). Después del análisis cromatográfico, se miden las alturas o áreas del pico del compuesto y se grafican contra la concentración de estándar adicionado. Una curva típica de adición estándar se muestra en la figura 5.4.

Un segundo método de adición de estándar sólo requiere dos análisis de una muestra (3). Este también posee gran exactitud y precisión porque incorpora el uso de un estándar interno. Primeramente, la muestra se inyecta al cromatógrafo después de la adición de una concentración conocida de estándar interno y se obtiene un cromatograma como el que se marca como 'A' en la figura 5.5. Después del primer análisis cromatográfico, se adiciona una concentración de fármaco conocido a la muestra y se inyecta nuevamente al cromatógrafo obteniéndose un cromatograma como el señalado en 'B' en la figura 5.5.

Las respuestas relativas, que es la relación entre el área del fármaco analizado (ya sea en A o en B) y el área del estándar interno (IS) adicionado a dicho fármaco se calculan como se indica a continuación:

$$RCA \text{ ó } RB = \frac{\text{Area del fármaco en el cromatograma A ó B}}{\text{Area del IS en el cromatograma A ó B}}$$

Un RCDIF se determina como se indica:

$$RCDIF = RCB - RCA$$

La concentración del fármaco en la muestra original se determina como se indica:

$$\text{Conc(desc)} = \frac{(\text{Conc de IS adicionado}) (RA)}{RCDIF}$$

Donde:

RCA) = respuesta relativa del fármaco en el cromatograma A

RCB) = respuesta relativa del fármaco en el cromatograma B

RCDIF) = resultado de la diferencia de las respuestas relativas de B menos A.

CONC(DESC.) = concentración inicial desconocida del fármaco.

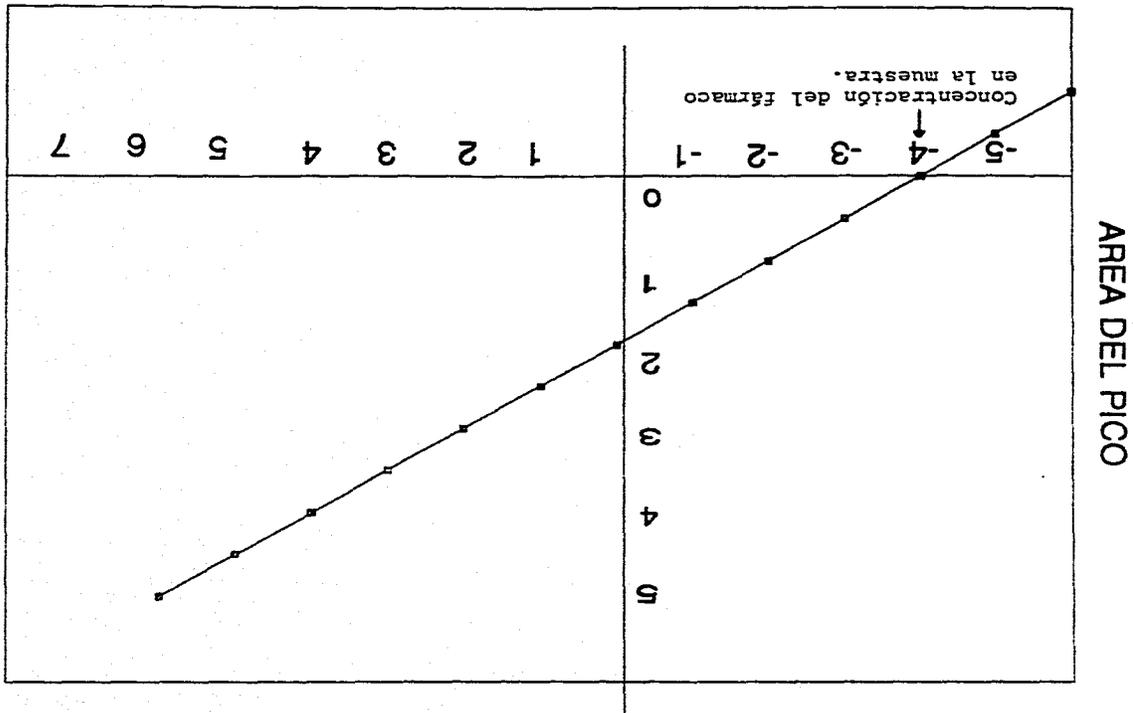


FIG. 5.4 GRAFICA HIPOTETICA OBTENIDA MEDIANTE UN METODO DE ADICION DE ESTANDAR

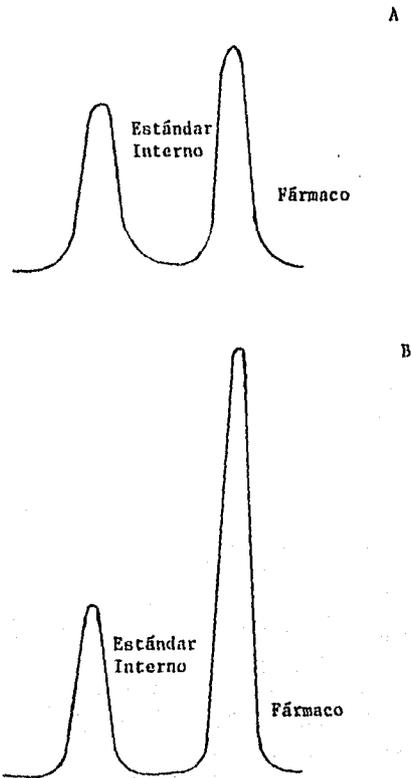


FIGURA 5.5. Cromatogramas obtenidos usando un método de adición de estándar interno. El primer cromatograma muestra la corrida después de la adición del estándar interno pero no del fármaco (A). El cromatograma obtenido después de la adición de una concentración conocida de fármaco (B).

Hay que considerar dos aspectos importantes en el segundo método de adición estándar. Primero, debe tomarse en cuenta cualquier cambio de volumen en la muestra después de la adición de una cantidad de fármaco. Segundo, como esta determinación se basa en un punto no puede poseer una precisión y exactitud mejores que los métodos de estándar interno que utilizan estándares múltiples (587,588,589).

USO DE COMPUTADORAS PARA EL MANEJO DE DATOS.

En la actualidad muchos laboratorios prefieren realizar el procesamiento de los datos mediante una computadora (590,592,598). Los software son de gran utilidad sobre todo cuando se maneja una gran cantidad de datos. Sin embargo, el uso de un software también requiere de validación (591).

Existen métodos de simulación por computadora que reducen tiempo en los estudios. Esto es una gran ventaja debido a la dependencia del tiempo en la cinética. También reduce tiempo en el caso de estudios que sólo requieren una dosis del fármaco que se administran en intervalos de tiempo muy cercanos el uno del otro. El perfil total de tiempo-concentración se analiza por regresión no lineal y los parámetros para la velocidad y extensión de la absorción se estiman como parte del modelo fijado. Estos modelos también predicen la precisión y exactitud que tendrán los estudios para cualquier orden de cinética, tanto en estudios de biodisponibilidad absoluta como relativa. La cantidad de muestras no afectan la precisión (593,594).

El programa Monte Carlo también prevee la robustez del modelo fijado a un estudio (595). La duración de la absorción, el intervalo de tiempo entre dosis, la dosis y la duración del muestreo son variables de gran importancia para la precisión de los estimados. El método generalmente da un bajo estimado cuando se tiene una baja absorción (596,597).

Las computadoras en el laboratorio, de manera general, se utilizan como calculadoras, y no para cálculos específicos. Por esto es que debe programarse la computadora con las fórmulas

adecuadas que faciliten el cálculo específico de los datos obtenidos.

CAPITULO 6
DESTINO FINAL DE LOS RESULTADOS

6.1 BIODISPONIBILIDAD (599,600).

La distinción entre biodisponibilidad y biodisponibilidad relativa es importante. Cualquier estudio que evalúe la cantidad relativa de un fármaco administrado que llega a la circulación general y la velocidad a la cual esto ocurre se considera un estudio de biodisponibilidad. Por lo tanto, esta categoría incluye estudios en los cuales un fármaco se administra oralmente y la extensión de la absorción se compara con los resultados de la administración intravenosa (la cual provee el 100 % de biodisponibilidad). Los estudios de biodisponibilidad abarcan la determinación de la biodisponibilidad relativa de un fármaco activo en dos o más formulaciones, sin considerar la cantidad absorbida que se le reconoce a cada formulación.

La biodisponibilidad de un fármaco está controlada por tres factores principales: (1) la velocidad y extensión con la que se libera el fármaco de la forma de dosificación, (2) su subsecuente absorción de la forma en solución, (3) la biotransformación durante el proceso de absorción.

En todas las determinaciones de biodisponibilidad, se realiza una medición de la concentración del fármaco en varios fluidos corporales, por ejemplo, sangre, plasma y orina. Las concentraciones en plasma seguida de la administración oral de un fármaco asume cuatro fases secuenciales:

1. absorción $>$ eliminación
2. absorción \approx eliminación
3. absorción $<$ eliminación
4. absorción = 0; eliminación $>$ 0

La forma exacta de la curva de la concentración en plasma dependerá de la velocidad relativa de absorción y eliminación. Esto implica que las curvas de concentración plasmática será tan diversas como las diferentes vías de administración (fig. 6.1). La vía intravenosa y en ocasiones la intramuscular dan de inmediato un pico agudo debido a la rápida o casi instantánea absorción, sin embargo, las vías oral, subcutánea, rectal y otras pueden mostrar

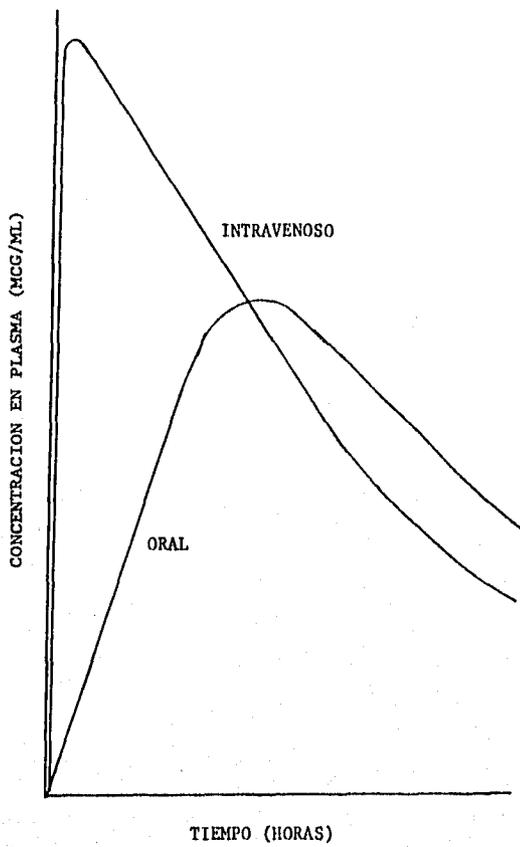


FIGURA 6.1. Perfiles de concentración en plasma donde se muestra el efecto de las diferentes rutas de administración.

picos retardados debido a una baja velocidad de absorción. Debe notarse que la velocidad de eliminación se considera constante ya que esta depende principalmente de la naturaleza específica del fármaco como ingrediente activo. Así, la "fase 2" o los picos, está determinada solamente por las velocidades de absorción.

La estimación de la biodisponibilidad a partir de curvas de concentración de plasma requiere de un amplio entendimiento de la naturaleza de tales curvas. Por ejemplo, un pico alto o agudo no necesariamente significa una mayor absorción que en un pico pequeño o retrasado. La absorción total de un fármaco es proporcional no sólo a las concentraciones de plasma que se logran, sino también a la extensión de tiempo que esas concentraciones se mantienen en la sangre o plasma. Un parámetro que caracteriza este aspecto es el área bajo la curva de concentración vs tiempo. La mayor contribución al área bajo la curva para una formulación que se absorbe rápidamente es debida a la altura del pico de concentración; a diferencia de una formulación que se absorbe lentamente el área es debida principalmente a la concentración sostenida o prolongada en plasma. Debe notarse que el área bajo la curva de concentración vs tiempo (AUC) es sólo proporcional a la cantidad total de fármaco absorbido y no puede ser empleado para determinar la cantidad de fármaco administrado comparado con un estándar de concentración conocida, para eso, la extensión de la absorción se mide por cualquier otro método o se asume que es el 100 % en el caso de la administración intravenosa.

Se cuentan con muchos métodos para medir AUC. A continuación se describen tres de estos.

LA REGLA DEL TRAPEZOIDE (599).

Este es el método más simple y consta de dividir la curva de concentración de plasma vs tiempo en varios trapezoides (fig. 6.2), calcular las áreas de los trapezoides individuales y adicionar estas áreas en forma acumulativa:

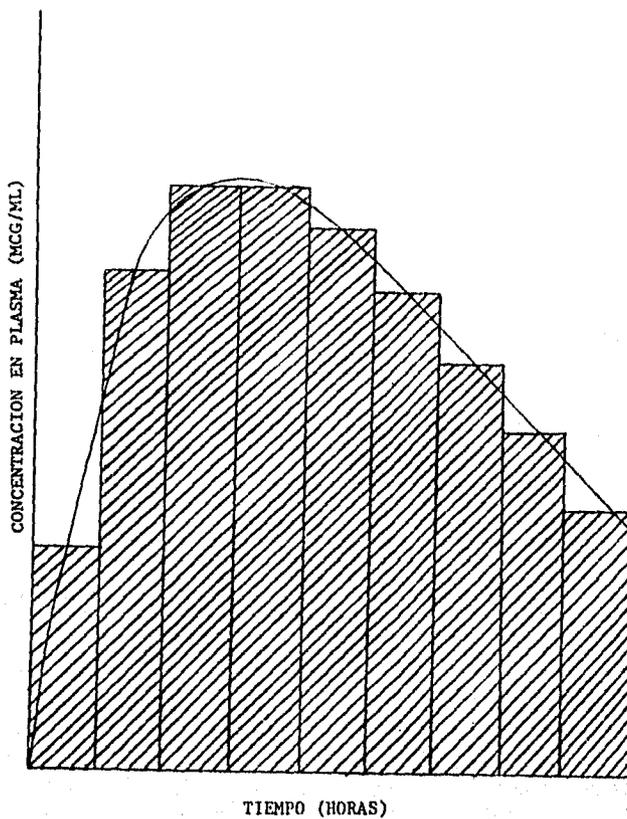


FIGURA 6.2. Aplicación de la regla del trapecoide en el cálculo del área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo. El área sombreada representa el área calculada.

$$\begin{aligned}
 & \times \quad AUC_t = (C_0 + C_1) \frac{(t_1 + t_0)}{2} + (C_1 + C_2) \frac{(t_2 - t_1)}{2} \\
 & \times \\
 & \times \quad + \dots + (C_{n-1} + C_n) \frac{(t_n - t_{n-1})}{2} \\
 & \times \\
 & \times
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \times \quad n \\
 & \times \quad AUC_t = \sum_{i=1}^n \frac{(C_{i-1} + C_i)}{2} \\
 & \times \\
 & \times
 \end{aligned}$$

Las unidades para la AUC son: concentración x tiempo, por ejemplo, $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ o $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{litro}$.

Como regla general, entre mayor sea el número de segmentos o trapezoides formados, mayor será la exactitud. En otras palabras, entre más cerrado sea el intervalo entre cada lectura que se toma de la concentración en plasma, más exacto será el resultado. Un resultado exacto se obtendrá sólo cuando el número de trapezoides es infinito. Si los valores de la concentración en plasma están muy alejados uno de otro, puede construirse una curva suave, dividiéndola en un gran número de trapezoides.

El AUC es proporcional a la dosis absorbida sólo cuando los cálculos se extienden al punto donde la concentración de plasma tienden a cero. Esto algunas veces no es posible, en tal caso la comparación puede hacerse a un tiempo dado o la concentración en plasma puede extenderse a la forma de la curva que se muestra en la figura 8.3. Cualquiera de estas aplicaciones adicionan un error sobre la estimación de la biodisponibilidad.

METODO DE LA INTEGRACION (599).

La velocidad del cambio de concentración en plasma (C) se describe como:

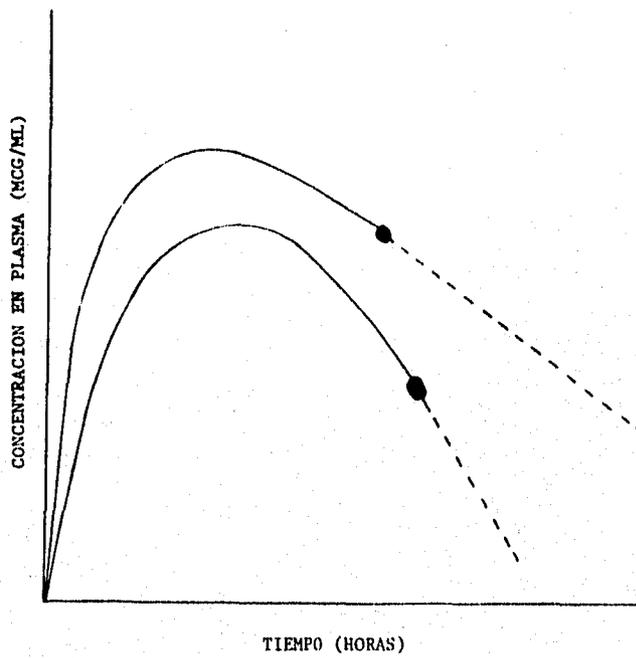


FIGURA 6.3. Extrapolaciones de los perfiles de concentración en plasma de acuerdo a la forma de las curvas.

$$dC/dt = \text{velocidad de absorción} - \text{velocidad de absorción}$$

$$= k_a X_a - K_e X$$

donde k_a y K_e son las constantes de velocidad de absorción y de eliminación y X_a y X son las cantidades de fármaco en el tracto gastrointestinal y el cuerpo respectivamente. Una integración de esta ecuación entre los límites de tiempo para los cuales el fármaco permanece en el cuerpo según se refleja por la concentración en plasma se expresa a continuación:

$$* \quad C = A \left(e^{-kt} - e^{-ka t} \right)$$

y el área total bajo la curva (AUC) para la cual se define la integración entre el tiempo cero y el infinito:

$$* \quad AUC = A \left(\frac{1}{K} - \frac{1}{k_a} \right)$$

MÉTODOS FÍSICOS (599).

Pueden utilizarse una variedad de métodos físicos como el recortar las gráficas y pesarlas, o utilizando un planímetro.

Con la ayuda que actualmente brinda la computación para la realización de los cálculos, los métodos físicos han entrado en desuso. Además, el error de las determinaciones analíticas se incrementan con el error humano. Sin embargo, la determinación de la biodisponibilidad por estos métodos es muy simple.

6.2 BIOEQUIVALENCIA (599,600).

Los investigadores biofarmacéuticos deberían diseñar estudios en humanos, conducir experimentos "in vitro" o en animales de laboratorio, de tal manera que el análisis de los resultados obtenidos indicara cual fue la fuente de variación y se pudiera afirmar, a un nivel de confianza dado, si cada fuente de variación fue significativa o no.

El análisis de varianza (ANOVA) es un procedimiento estadístico para descomponer la variación total de un juego de observaciones de un experimento en componentes asociados con fuentes de variación controlables (definidos) tales como:

1. Por el tratamiento,
2. por los individuos (o grupos de individuos) y fuentes de variación no controlables (por ejemplo, error o error experimental).

Por tratamiento se entiende cualquier diferencia entre las unidades experimentales (individuos) que se han introducido deliberadamente para observar su efecto.

Dichos tratamientos pueden ser dosis distintas de un fármaco todas ellas dadas en la misma forma farmacéutica por la misma vía de administración, o diferentes formas farmacéuticas de un fármaco, con la misma dosis y, todas ellas, por la misma ruta de administración, o diferentes "niveles" de un factor único (por ejemplo, la fuerza utilizada para la compresión de un mismo granulado).

Se utiliza el análisis de varianza para evaluar la diferencia entre medias de varias poblaciones que se suponen distribuidas normalmente. La hipótesis que se prueba, comúnmente especifica que las medias son iguales; α representa un nivel de significancia pre-asignado para rechazar esta premisa de igualdad.

Se dice que existe un error de tipo I (o error α), cuando la hipótesis probada, siendo verdadera, se rechaza.

Si la hipótesis de que las medias son iguales es falsa y al probarla se aceptase como verdadera, ocurrirá, entonces, un error de tipo II (o error β).

La significancia estadística, tal como se le obtiene en ANOVA, es función de la diferencia verdadera entre las formulaciones y de la precisión de la prueba. Esta última resulta, a su vez, afectada por el número de individuos utilizados en el estudio y por la "variabilidad" de los datos. Por ejemplo, podría encontrarse que dos áreas de 18 y 17 son significativas con una probabilidad menor al 0.001 y que esta diferencia de 2 unidades-área no fuese importante clínicamente. Por otro lado, podría utilizarse un grupo menor de individuos, probarse dos productos y obtener la misma respuesta, que resultaría no significativa con una probabilidad mayor al 0.05 y concluir que no hay diferencia entre las formulaciones estudiadas; sin embargo, la "variabilidad" puede ser muy grande y, el aceptar la anterior como la respuesta "correcta", sería autoengañarse. Una alternativa a la prueba de hipótesis es el uso de intervalos de confianza.

Si B_r es la biodisponibilidad del producto referencia y B_n es la biodisponibilidad de un producto nuevo, mediante prueba de hipótesis puede concluirse que $B_r = B_n$ o que $B_r \neq B_n$, pero el enfoque de intervalos de confianza puede determinar la magnitud de la diferencia [$B_r - B_n$] y determinar si dicha diferencia es lo suficientemente pequeña para ser aceptable. Aunque el enfoque de intervalos de confianza utiliza los mismos números y cálculos que en las pruebas clásicas de hipótesis, proporciona otra forma para seleccionar los niveles α y β . El especialista clínico o farmacólogo puede especificar que la biodisponibilidad de un nuevo producto en relación a un producto de referencia debe estar dentro de un cierto margen y que esto debe conocerse con un nivel de confianza dado.

1.3. FARMACOCINETICA (599,600).

El principal problema que se tiene para proporcionar una interpretación significativa de la respuesta biológica de un individuo cuando se le administra una dosis dada del fármaco, es la inaccesibilidad al sitio de acción para determinar la concentración del fármaco en el mismo. Con el objeto de solucionar este problema, se ha desarrollado la técnica del *análisis de compartimentos*; éste es un intento de definir cuantitativamente qué le ocurre al fármaco en función del tiempo, desde el momento en que es administrado hasta que ya no se encuentra en el cuerpo.

Los componentes esenciales de un esquema de compartimentos incluyen la transferencia del fármaco del sitio de absorción a la sangre y los pasos involucrados en la distribución y eliminación del fármaco en el cuerpo, tal como se indica en la figura 6.4.

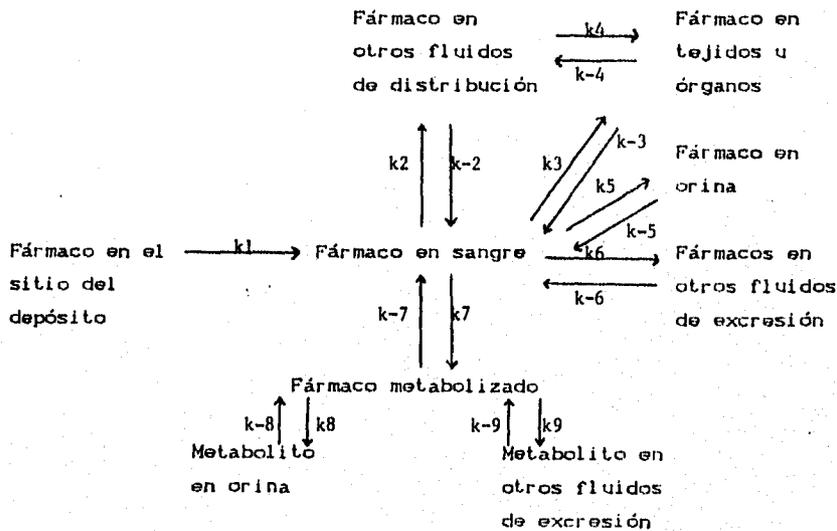


FIGURA 6.4. Esquema de compartimentos que muestra la transferencia del fármaco en el organismo.

El conocimiento de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (sistema L.A.D.M.E.) hace que se concluya que, con un sistema tan simple como el que se ha presentado, no se pueden explicar todas las situaciones. El efecto del primer paso (degradación del fármaco unido a proteína, su metabolismo por la flora bacteriana, su retención en el moco intestinal o en las membranas biológicas y su metabolismo en el primer paso por el hígado en la absorción oral), hace que la fracción de dosis absorbida no sea igual a 1; ya en la sangre, el fármaco se distribuye rápidamente entre el plasma y los eritrocitos. En el plasma, muchos fármacos se unen extensamente a proteínas (usualmente albúmina), alcanzándose el equilibrio rápidamente; esto afecta necesariamente la distribución extravascular, pues el fármaco libre es el que se difunde a los tejidos.

La distribución es la transferencia del fármaco de la sangre a los fluidos extravasculares (por ejemplo, el líquido intersticial) y a los tejidos; este proceso generalmente es rápido y se asocia, con frecuencia, a constantes de velocidad relativamente grandes; aún más, es un proceso reversible. De esta manera, el fármaco que se encuentra en el plasma está en equilibrio (dinámico) con el que se encuentra en los eritrocitos, con el que está en otros fluidos y el de los tejidos; por esta razón, la concentración en plasma refleja los cambios en los niveles del fármaco en otros tejidos incluyendo los sitios donde el fármaco ejerza su acción farmacológica (899).

La transferencia del fármaco de la sangre a la orina y a otros compartimientos acumulativos (saliva, sudor y bilis, p.e), se denomina excreción. El metabolismo es la transformación bioquímica o enzimática del fármaco en los tejidos, el plasma e hígado, a productos metabólicos generalmente inactivos. Usualmente, estos procesos son irreversibles; el conjunto de estos pasos se denomina eliminación del fármaco, siendo este proceso el responsable de la desaparición del fármaco en el organismo. Las constantes asociadas con la eliminación del fármaco son, frecuentemente, mucho menores que las constantes de velocidad asociadas al proceso de

distribución. De esta manera, el fármaco alcanza el equilibrio en la distribución antes de que cualquier fracción significativa de la dosis sea eliminada del cuerpo. En este caso, el cuerpo aparenta tener las características de un sólo compartimiento; en otras palabras, la distribución no es evidente. Eso describe el modelo abierto de un compartimiento (MAUC) el cual presenta los esquemas más simples; en la figura 6.5., se representa el caso para la administración de una dosis (bolo) intravenosa.

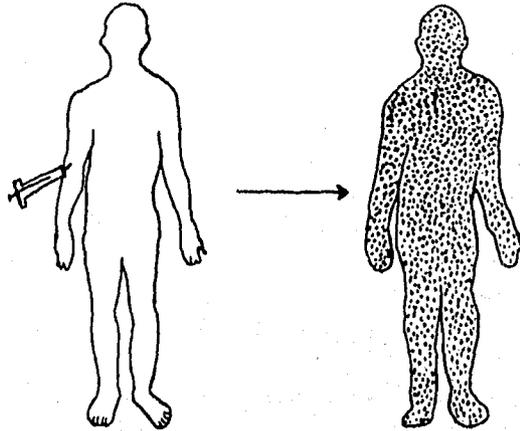


FIGURA 6.5. Representación de una administración de dosis intravenosa.

El cuerpo puede considerarse como un arreglo de compartimientos separados, cada uno de los cuales contiene una fracción de la dosis administrada. La transferencia del fármaco de un compartimiento a otro, se asocia con una constante de velocidad específica (k) para cada transferencia en particular; la magnitud de la constante de velocidad determina qué tan rápido ocurrirá

dicha transferencia (599). K es la llamada constante de transferencia total y es simplemente la suma de todas las constantes (268):

$$K = k_e + k_m + k_p + \dots$$

La propiedad aditiva de las constantes de velocidad es de gran importancia ya que permite el cálculo de constantes desconocidas y la fracción total de los fármacos removidos desde el cuerpo por una vía específica. Por ejemplo, la fracción total de fármaco metabolizado se expresa por:

$$F_m = k_m / K$$

Intimamente relacionada con la constante de velocidad de eliminación se encuentra la vida media biológica, periodo de semieliminación o tiempo medio de eliminación,

$$t_{1/2} = 0.693 / K$$

Un compartimiento no necesariamente es una entidad anatómica, sino que se define como un "recipiente" cinéticamente distinguible en términos del perfil gráfico de la concentración del fármaco contra el tiempo. En otras palabras, es posible conocer la cantidad del fármaco en un compartimiento en función del tiempo sin que realmente se sepa donde está ese compartimiento físicamente situado.

Por ejemplo, se considera a la sangre como compartimiento central; la otra opción la constituyen los tejidos y los órganos a los cuales se distribuyen el fármaco con una rapidez prácticamente instantánea. Este compartimiento se comporta como un todo homogéneo.

Un compartimiento identificable físicamente es la orina; se le denomina compartimiento acumulativo, puesto que el fármaco ya no se reintegra al llamado cuerpo farmacocinético (el conjunto de compartimientos directrices, o sea, los que impulsan al fármaco a otros compartimientos).

En los humanos, los estudios farmacocinéticos generalmente se limitan a muestras de sangre y orina; los parámetros obtenidos de los modelos matemáticos se acoplan con el conocimiento de la dosis administrada y otra información recabada en estudios separados,

como lo es la unión a proteínas.

La transferencia de un compartimiento a otro, puede asociarse a una o más constantes de velocidad, lo que significa que se ha modificado en algún grado el sistema.

Generalmente la velocidad de transferencia del fármaco de un compartimiento a otro, sigue una cinética de primer orden, pues depende del gradiente de concentración del mismo entre los compartimientos. Las excepciones se encuentran en aquellos casos donde intervienen sistemas cuya capacidad sea limitada; por ejemplo, en el metabolismo, el sistema enzimático puede saturarse cuando se excede cierta concentración del fármaco y el proceso sigue una cinética de orden cero; el mismo caso se presenta en la secreción tubular activa a nivel del glomérulo renal (599).

La constante específica de velocidad para los procesos de primer orden, son las constantes de proporcionalidad de transferencia y la concentración del fármaco en el compartimiento de procedencia, si se asume que el proceso sólo ocurre en una dirección, la ley de la velocidad puede escribirse:

$$dC / dt = - k C$$

donde dC/dt es la velocidad de transferencia, C es la concentración del fármaco en el compartimiento a partir del cual se lleva a cabo la transferencia (por ejemplo, el plasma) y k es la constante de velocidad asociada con el proceso. El signo negativo indica que hay pérdida del fármaco en el plasma. Cuando se hace referencia a la velocidad con la que aparece el fármaco en el otro compartimiento, entonces el signo es positivo; por ejemplo, la velocidad con la que aparece el fármaco en la orina se describe:

$$dA_{or} / dt = + K_r A_c$$

donde dA_{or}/dt es la velocidad de aparición del fármaco en orina, K_r es la constante de velocidad de excreción renal y A_c es la cantidad de fármaco en el compartimiento central.

Los esquemas que se propongan deben caracterizarse por utilizar el menor número de compartimientos que sean compatibles con el curso temporal de los datos experimentales. Por esta razón, debe probarse el modelo matemático obtenido para, así, obtener el

mejor ajuste (599).

VOLUMEN DE DISTRIBUCION APARENTE (268).

El concepto de volumen de distribución establece un parámetro matemático que relaciona la cantidad de fármaco en el cuerpo con la concentración plasmática. Se define habitualmente como el volumen de líquido del cuerpo en el cual el fármaco aparentemente se disuelve.

Después de una inyección intravenosa, el fármaco se distribuye y se equilibra con todos los tejidos. Una vez que se logra el equilibrio esta relación no cambia, de modo que el volumen de distribución, V_d , puede obtenerse de la relación:

$$V_d = \text{Conc. fco. en cuerpo} / \text{conc. plasmática}$$

En la práctica, el volumen de distribución aparente de un fármaco suele calcularse administrando una inyección intravenosa de éste; luego se determina la concentración plasmática a diferentes tiempos después de la inyección y la serie de concentraciones se representa gráficamente en función del tiempo en papel semilogarítmico o bien se elabora un gráfico de coordenadas cartesianas que exprese la concentración plasmática en logaritmo. La extrapolación de la recta obtenida hasta tiempo inicial nos proporciona la concentración inicial (C_0). Finalmente, basta dividir la dosis administrada por el valor C_0 de la extrapolación:

$$V_d = \text{Dosis} / C_0$$

El volumen de distribución no tiene significado fisiológico directo y no se refiere al volumen real de algún compartimento. Si el fármaco se une a los tejidos o se localiza en los compartimentos profundos (huesos, lípidos), el volumen de distribución adquiere un valor elevado que sobrepasa el volumen real del organismo.

Si el volumen de distribución se divide por el peso corporal del individuo adulto, de estatura y peso normales, se obtiene el coeficiente de distribución, Δ' :

$$\Delta' = V_d / \text{peso corporal}$$

DEPURACION (260).

El concepto de depuración o aclaramiento ("clearance") implica esencialmente el proceso de eliminación renal de una sustancia. Sin embargo, este concepto se ha extendido para describir la eliminación por o desde órganos como el hígado y otros de menor importancia como el estómago, pulmones, etc.

La depuración de un órgano se define como el volumen del medio de perfusión que es purificado de un fármaco por ese órgano en la unidad de tiempo.

La depuración es una propiedad aditiva: su valor total es la suma de la depuración de cada uno de los órganos eliminadores.

La mayoría de los fármacos o sus metabolitos se eliminan a través de riñón. La depuración renal se refiere al volumen de plasma que es depurado del fármaco en la unidad de tiempo por el riñón.

La depuración renal (Clr) puede obtenerse a partir de datos de excreción renal, ya que:

$$\text{Clr} = \frac{dE/dt}{C}$$

donde dE/dt es la velocidad de excreción renal del fármaco y C la concentración plasmática medida en la mitad del intervalo de tiempo en que se obtienen las muestras de orina. En un gráfico de dE/dt en función de C , la depuración renal está determinada por la pendiente de la recta obtenida. Otra manera de calcular la depuración renal consiste en determinar la cantidad por el área total bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo:

$$\text{Clr} = E_{\infty} / \int_0^{\infty} C dt$$

También la depuración hepática es importante en farmacocinética. El hígado es el principal órgano eliminador de fármacos. Situado entre el tracto gastrointestinal y la circulación general, recibe la mayor parte de la sangre que proviene de dicho tracto y, por lo tanto, los fármacos absorbidos allí pasarán

primero por el hígado. Por la gran capacidad metabolizante de este órgano, puede reducirse la disponibilidad de fármacos administrados por vía oral, es decir, la fracción de la dosis oral que llega intacta a la circulación sistémica. Esta eliminación hepática presistémica de un fármaco es lo que se llama "efecto del primer paso" y es particularmente importante en los fármacos que son extraídos en alto grado por el hígado.

Una expresión ampliamente utilizada en la actualidad es la de "relación de extracción hepática" o "porcentaje de extracción hepática", que es el porcentaje de fármaco irreversiblemente metabolizado a cada paso por el hígado:

$$\text{Relación de extracción hepática} = \frac{\text{Depuración metabólica media}}{\text{Flujo sanguíneo hepático}}$$

$$\text{Depuración metabólica media} = f_m K V_d / \lambda$$

donde f_m = fracción de la dosis metabolizada, y

λ = constante que expresa la relación entre la concentración sanguínea y plasmática

La eliminación hepática puede estar limitada por el flujo sanguíneo y por la capacidad intrínseca del órgano para eliminar fármacos y por la unión a proteínas.

La depuración total de un fármaco es el resultado de la eliminación de éste por todos los mecanismos eliminatorios del organismo: excreción renal, hepática, pulmonar, metabólico, etc., y, por lo tanto, está relacionado con la constante de velocidad de eliminación total, la cual, como se ha señalado antes, es la suma de todas las constantes de velocidad de eliminación individuales de los mecanismos que se encargan de esta función.

La ecuación que relaciona la depuración total con la constante de velocidad de eliminación total es:

$$\text{Cl}_r = K V_d$$

También puede expresarse la depuración total en función de la vida media biológica o tiempo medio de semieliminación:

$$Cl_r = 0.693 V_d / t_{1/2}$$

CINETICAS DE PRIMER ORDEN (599).

Gran número de fármacos se administran oralmente o por otras rutas por las cuales la absorción no es instantánea y sigue una cinética de primer orden:

$$dX/dt = k_a X_a - KX$$

donde k_a es la constante de velocidad de absorción y X_a es la cantidad de fármaco remanente en el sitio de absorción, por ejemplo, el estómago o el intestino. Esta ecuación puede ser integrada de la siguiente forma:

$$X = \frac{k_a F X_0}{(k_a - K)} \left(e^{-Kt} - e^{-k_a t} \right)$$

$$\text{ó} \quad C = \frac{k_a F X_0}{(k_a - K) V} \left(e^{-Kt} - e^{-k_a t} \right)$$

donde F es la fracción de dosis administrada X_0 , que se absorbe después de la administración oral o por otra ruta.

En algunos casos, la constante de velocidad de absorción, k_a , es mayor que la constante de eliminación, K . Como la cantidad de fármaco remanente en el sitio de absorción disminuye, la velocidad de absorción disminuye también y la concentración en plasma se describe únicamente por la constante de eliminación del fármaco:

$$C' = \frac{k_a F X_0}{(k_a - K) V} e^{-Kt}$$

Estas ecuaciones se refieren a la fase post-absortiva. La constante de velocidad de absorción, k_a , se determina mediante una técnica llamada Método de los Residuos:

$$C = A e^{-Kt} - A e^{-k_a t}$$

donde

$$A = \frac{kaFX_0}{(ka - K)V}$$

El tiempo en el que el máximo de la concentración plasmática ocurre puede ser determinado fácilmente ya que en este tiempo:

$$kaX_a = KX$$

ó

$$dC/dt = 0$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{kaFX_0}{(ka - K)V} e^{-kat} - \frac{kaKFX_0}{(ka - K)V} e^{-kt}$$

donde t_p = al tiempo en el cual $C = C_{m\acute{a}x}$. Esta ecuación puede resumirse en:

$$t_p = \frac{2.303}{(ka - K)} \log \frac{ka}{K}$$

$C_{m\acute{a}x}$ puede obtenerse sustituyendo t_p en la siguiente ecuación:

$$C = \frac{kaFX_0}{(ka - K)V} (e^{-kt} - e^{-kat})$$

Existen casos donde la constante de velocidad de absorción es de valor semejante a la constante de velocidad de eliminación. En este caso, la concentración plasmática se define como:

$$C = \frac{k'FX_0}{V} t e^{-k't}$$

donde k' es la constante de velocidad de eliminación o de absorción. El tiempo en el cual ocurre la máxima absorción plasmática es:

$$t_p = 1/k'$$

y

$$C_{m\acute{a}x} = 0.37FX_0 / V$$

El término FX_0/V representa C_0 después de la administración intravenosa de una dosis igual a X_0 .

CONCLUSIONES

El proceso en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos exige muchas etapas que deben ser cuidadosamente diseñadas y seguidas en detalle para evitar el fracaso de un bioanálisis.

Lo que más dificulta llevar a cabo un estudio biofarmacéutico, es no contar con pasos asignados que garanticen el éxito del análisis.

La diversidad de los fármacos que se desea estudiar, sus variados efectos y sus diferentes propiedades físicas y químicas, hacen literalmente imposible precisar una guía para todos los casos ya que es necesario diseñar un estudio específico para cada caso en particular.

Es posible hablar de pasos o etapas secuenciales para llevar a cabo un análisis, desde como obtener una muestra, hasta llegar a interpretar los resultados que se derivan de los análisis, a pesar de no contar con una guía para todos los estudios.

Se ha podido ver que es importante seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio para evitar introducir mayor error en el análisis debido al manejo de las muestras y al desarrollo del análisis a la cuantificación en sí.

Los métodos que existen para realizar un estudio biofarmacéutico son muy diversos. Para seleccionar alguno se toman en cuenta las propiedades del analito y elegir la más adecuada dependerá de las características del analito y de la matriz biológica.

No existe una técnica que sea mejor que otra, la eficiencia siempre estará ligada a las propiedades del analito y de la matriz biológica. Sin embargo, es útil conocer la mayoría de estas

técnicas para seleccionar la más adecuada y no perder el tiempo tratando de implementar una técnica muy sofisticada si se puede resolver un problema mediante una técnica sencilla.

Siempre debe tenerse en mente lograr los mejores rendimientos usando la menor cantidad de pasos que consuman el menor tiempo posible, ya que de nada sirve el mejor método desarrollado si no resulta práctico en el laboratorio durante un análisis de rutina.

Es importante el manejo que se realiza de los resultados obtenidos, ya que un análisis de datos mal elaborado puede llevar a conclusiones equivocadas sobre la farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia de un fármaco. Puede pensarse también en un reanálisis o en modificar el diseño del experimento sin ser necesario.

Por todo esto, es conveniente remarcar que cada paso que lleve a la obtención de resultados analíticos a partir de un fármaco en una muestra biológica deberá de ser seguido cuidadosa y detalladamente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Hirtz, J. (1986) *Importance of Analytical Methods in Pharmacokinetics and Drug Metabolism Studies*. *Biopharm. Drug Disp.* (7):315-326.
- (2) Rowland, M. (1986) *Pharmacokinetics: Concepts, insights and Applications*. *Acta Pharma. Suec.* 23(3):173-190.
- (3) Smith and Stewart. (1981) *Textbook of biopharmaceutic analysis*. Lea and Febiger, EUA, 3-6. 3-6.
- (4) Parke, D. V. (1990) *Drug metabolism in the design and safety evaluation of new drugs*. *Acta Pharm. Nord.* 2(4):260-263.
- (5) Montojo, C. (1986) *Monitorización de fármacos: importancia del error analítico*. *Acta de Eficiencia Farmacológica en Humanos*. X(4):257-262.
- (6) Valentine, J.L. *Prenalytical methodology for drug analysis in biological fluids*. Jhon Wiley and Sons, E.U.A., 1980.1980.
- (7) Grahnén, A. (1984) *Pharmacokinetic strategies of drug control in Sweden. Principal aspects with special emphasis on bioavailability*. *Acta Pharma. Nord.* 21(4):256.
- (8) Ritschel, W.A. *Handbook of basic pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications, E.U.A. 3a. ed., 22 pp.
- (9) Alache, J.M. et.al. (1983) *Biofarmacia. El Manual Moderno*, México, 1983.
- (10) Fauelle, F. et.al.(1991) *Diclofenac, Paracetamol y Vidarabina removal during plasma exchange in polyarteritis nodosa patients*. *Biofarm. Drug Disp.* 12(6):411-424.
- (11) Testa, B. (1991) *Conformational factors in drug metabolism and disposition*. *Acta Pharm. Nord.* 3(2):122.
- (12) Watson, N. and Wyld, P.J. (1992) *The importance of general practitioner information in selection of volunteers for clinical trials*. *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):197-199.
- (13) Levy, G. (1980) *Clinical implications of interindividual differences in plasma protein binding of drugs*. *Acta Pharm. Nord.* 17(2):92-94.
- (14) Bevan E.G., et.al. (1993) *Patient's attitudes to participation in clinical trials*. *Br. J. Clin. Pharmac.* 35(2):204-207.
- (15) Holt, D.W. (1991) *The effect of age on the pharmacokinetics*

of pentisomide, *Biopharm. Drug Disp.* 12(8):627-631.

- (16) Borgå, O. (1980) *Protein binding and therapeutic drug monitoring*, *Acta Pharm. Suec.* 17(2):89.
- (17) Francesconi, M. (1981) *Evidence of age-dependent activity increase of poly(C)-avid serum ribonuclease in man*, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19:17-20.
- (18) Yakawa, E. et.al. (1992) *Influence of age and comedication on steady-state carbamazepine serum level-dose ratios in Japanese paediatric patients*, *J. Clin. Pharmacy Therap.* 1:65-70.
- (19) Blandini, F. (1992) *Free plasma catecholamine levels in healthy subjects: a basal and dynamic study. The influence of age*, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52:57-63.
- (20) Bradbury, H. et.al. (1992) *The clearance of warfarin and its enantiomers in the elderly*, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34(1):154p-155p.
- (21) Pritchard, J.F. (1992) *Age and gender effects on ondansetron pharmacokinetics: Evaluations of healthy aged volunteers*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(1):51-55.
- (22) Colangelo, P.M. et.al. (1992) *Age and propranolol stereoselective disposition in humans*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(4):489-494.
- (23) Colangelo, P.M. (1992). *Age and β -adenergic receptor sensitivity to S(-)- and R,S(+)-propranolol in humans*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(4):549-554.
- (24) Zaman, Z. et.al. (1993) *Simultaneous determination of vitamins A and E carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects*, *Clin. Chem.* 39(10):2229-2234.
- (25) López-Anaya, A. et.al. (1993) *Effect of age on distribution of zidovudine (azidothymidine) into the cerebrospinal fluid of Macaca nemestrina*, *Pharm. Research* . 10(9):1338-1340.
- (26) Kraus, D.M. (1993) *Alterations in theophylline metabolism during the first year of life*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(4):351-359.

- (27) Izquierdo, M.A. (1993) *Comparative study of the population pharmacokinetics of gentamicin and amikacin in newborn patients.* J. Clin. Pharmacol. 18(6):411-414.
- (28) Gariepy, L.P., et.al. (1993) *Influence of aging on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxycycline.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(3):340-347.
- (29) Gaudry, S.E. et.al. (1993) *Gender and age as factors in the inhibition of renal clearance of amantadine by quinine and quinidine.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(1):23-27.
- (30) Camps, M. et.al. (1993) *Effect of age and cinnarizine treatment on brain dopamine receptors.* Pharm. 46(1):9-12.
- (31) Desager, J.P. et.al (1993) *A pharmacokinetic evaluation of the second-generation H₁-receptor antagonist cefirizine in very young children.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(4):431-435.
- (32) Sasaki, M. et.al. (1993) *The effects of age and gender on the stereoselective pharmacokinetics of verapamil.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(3):278-285.
- (33) Sale, M. et.al. (1993) *Zidovudine response relationship in early human immunodeficiency virus infection.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(5):556-566.
- (34) Russell, T.L. et.al. (1993) *Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, northamerican men and women.* Pharm. Research 10(2):187-196.
- (35) Hartley, R. et.al. (1993) *Morphine glucuronidation in premature neonates.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):314-317.
- (36) Cloyd, J.C. et.al. (1993) *Valproic acid pharmacokinetics in children. IV. Effects of age and antiepileptic drugs on protein binding and intrinsic clearance.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(1):22-29.
- (37) Vesell, E.S. et.al. (1993) *Reproducibility of antipyrine half-lives in elderly subjects.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(2):150-157.
- (38) Kowajima, I. et.al. (1993) *Effects of α , β -blocker, arotinolol chloride, on 24-h blood pressure-difference between elderly and younger hypertensive patients.* J. Clin. Pharmacol.

- 18(4):275-280.
- (39) Luke A. and Schoeller D.A. (1992) *Basal metabolic rate, fat-free mass and body cell mass during energy restriction.* *Metabolism* 41(2):450-456.
- (40) Chay, P.C.W. (1992). *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic relationships of morphine in neonates.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(3):334-342.
- (41) Guven H. et.al. (1993) *Age-related digoxin-alprazolam interaction.* *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 54(1):42-44.
- (42) Silagy, Ch.A. (1993) *Adverse effects of low-dose aspirin in a healthy elderly population.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(1):84-89.
- (43) Hirate, J. et.al. (1991) *Age-dependent changes in first-pass metabolism of acetaminophen in rats.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(2):119-126.
- (44) Misra, Ch.H. et. al. (1981) *Influence of age on the effects of chronic fluphenazine on receptor binding in rat brain.* *Eur. J. Pharm.* 76(4):317-324.
- (45) Brett, M.A. et.al. (1992) *Investigation of the single and repeat dose oral Pharmacokinetics of denbufylline in healthy young and elderly subjects.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):235p.
- (46) Viani, A. et.al. (1992) *The effect of ageing on plasma albumin and plasma protein binding of diazepam, salicylic acid and digitoxin in healthy subjects and patients with renal impairment.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(3):299-304.
- (47) Bhargava, H.N. et.al. (1993) *Time course of the distribution of morphine in brain regions, spinal cord and serum following intravenous injection to rats of differing ages.* *Pharm.* 47(1):13-23.
- (48) Roskos, L.K. and Boudinot F.D. (1990) *Effects of dose and sex on the pharmacokinetics of piroxicam in the rat.* *Biopharm. Drug Disp.* 11(3):215-228.
- (49) Lin, J.H. et. al. (1992) *Effects of dose, sex and age on the disposition of alendronate a potent osteolytic bisphosphonate.* *Drug Metab. Disp.* 2(5):473-478.

- (50) Husting, M.J. et.al. (1993) *Effects of age, race, sex, and smoking on prothrombin fragment 1.2 in a healthy population.* Clin. Chem. 39(4):683-685.
- (51) Haffner, S.M. et.al. (1992) *Relationship of serum hormone-binding globulin to lipid, lipoprotein, glucose and insulin concentrations in postmenopausal women.* J. Pharm. Pharmacol. 41(2):278-284.
- (52) Colburn, W.A. (1981) *A preliminary report on the pharmacokinetics of saccharin in man: single oral dose administration.* J. Clin. Pharmacol. 21:147-151.
- (53) Heikkilä, A. et.al. (1992) *The pharmacokinetics of mecillinam and pivmecillinam in pregnant and non-pregnant women.* Br. J. Clin. Pharmacol. 33(6):629-634.
- (54) Allard, S. et.al. (1993) *Intravenous ciprofloxacin disposition in obesity.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(4):368-373.
- (55) Høtten, G. et.al. (1992) *Co-variation of alanine aminotransferase levels with relative weight in blood donors.* J. Clin. Lab. Invest. 52:51-56.
- (56) Wisén, O. and Johansson, C. (1992) *Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion and absorption following a liquid test meal.* Metabolism 41(2):390-395.
- (57) Strömberg, Ch. et.al. (1992) *Exercise alters the pharmacokinetics of midazolam.* Clin. Pharmacol. Ther. 51(4):527-532.
- (58) Giugliano, D. et.al. (1992) *Physiological elevations of plasma b-endorphin alter glucose metabolism in obese, but not normal-weight subjects.* Metabolism 41(2):184-190.
- (59) Salazar, D.E. (1992) *Obesity as a risk factor in drug-induced organ injury: Toxicokinetic of gentamicin in the obese overfed rat.* Drug Metab. Disp. 2(5):402-408.
- (60) Caraco, Y. et.al. (1992) *Significant weight reduction in obese subjects enhances carbamazepine elimination.* Clin. Pharmacol. Ther. 51(4):501-506.
- (61) Berens, K.L. et.al. (1990) *Influence of lovastatin on the pharmacokinetics, toxicity and immunologic response of*

- cyclosporine in the obese Zucker rat. *Biopharm. Drug Disp.* 11(3):197-206.
- (62) Sellers, E.M. et. al. (1980) *Fatty acids as a source of variations in drug binding.* *Acta Pharm Suec.* 17(2):88-89.
- (63) Aranko, K. et.al. (1992) *Clinically important interaction between erythromycin and midazolam.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):217p-218p.
- (64) Gilbert, S.J.A. (1992) *The pharmacodynamics of brofaromine, alone and in combination with alcohol in young healthy volunteers.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):245p.
- (65) Heimark, L.D. (1992) *The mechanism of the interaction between amodarone and warfarin in humans.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(4):398-407.
- (66) Rainsford, K.D. (1992) *Effects of misoprostol on the pharmacokinetics of indometacin in human volunteers.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 55a(4):415-421.
- (67) Wagner, M.L. et.al. (1993) *Effect of felbamate on carbamazepine and its major metabolites* *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(5):536-543.
- (68) Donnelly, R. et.al. (1992) *Dynamic and kinetic interactions of nifedipine and doxazosin in normal volunteers.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(5):558p.
- (69) Somogyi, A.A. et.al. (1992) *Stereoselective inhibition of pindolol renal clearance by cimetidine in humans.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(4):379-387.
- (70) Olkkola, K.T. et.al. (1993) *A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(3):298-305.
- (71) Honig, P.K. et.al. (1993) *The effect of fluconazole on the steady-state pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine in humans.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(6):630-636.
- (72) Godley, P.J. et.al. (1991) *Effects of ethanol and a Δ -tetrahydrocannabinol on phencyclidine disposition in drugs.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(3):189-200.

- (73) Metcalf, P.A. et.al. (1993) *Albuminuria in people at least 40 years old: effect of alcohol consumption, regular exercise, and cigarette smoking.* Clin. Chem. 39(9):1793-1797.
- (74) Frei, B. et.al. (1991) *Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid.* J. Biochem. 277(1):133-138.
- (75) Baak, L.C. et.al. (1992) *Does smoking influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H₂-receptor antagonist famotidine?* Br. J. Clin. Pharmac. 33(2):193-196.
- (76) Benowitz, N.L. et.al. (1993) *Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(3):316-323.
- (77) Smits, P. et.al. (1993) *The cardiovascular interaction between caffeine and nicotine in humans.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(2):194-204.
- (78) Fitzsimons, T.J. et.al. (1991) *A study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nifedipine in combination with atenolol.* Biopharm. Drug Disp. 12(1):81-94.
- (79) Choi, Y.M. (1991) *Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatment on the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of bumetanide in rats.* Biopharm. Drug Disp. 12(4):311-324.
- (80) Clement, J.G. et.al. (1990) *Pharmacokinetics of the acetylcholinesterase oxime reactivator Hi-6 in Rhesus monkeys (Macaca mulatta): Effect of atropine, diazepam and ethoxyflurane anesthesia.* Biopharm. Drug Disp. 11(3):227-232.
- (81) Martin W. et.al. (1990) *Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man.* Biopharm. Drug Disp. 11(3):265-278.
- (82) Du Souich et.al. (1990) *Effects of cefaloxamine on the serum protein binding of sulfisoxazole.* Biopharm Drug Disp. 11(4):371-380.
- (83) Eschallier, A. et.al. (1981) *Influence of naloxone and methysergide on the analgesic effect of clomipramine in rats.*

Eur. J. Pharm. 74(1):1-7.

- (84) Stambough, J.E. (1981) *Meperidine and clorpromazine a toxic combination*. J. Clin. Pharmacol. 21:140-146.
- (85) Lee, B.L. et.al. (1992) *Teophylline toxicity after propafenone treatment: Evidence for drug interaction*. Clin. Pharmacol. Ther. 51(4):353-354.
- (86) Lacourcière, Y. et.al. (1993) *Comparison of quinapril and atenolol as single drugs or in combination with hydrochlorothiazide in moderate to severe hypertensive, using automated ambulatory monitoring*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(2):121-127.
- (87) Bhargava, H.N. et.al. (1993) *Effects of naltrexone on pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously administered morphine in the rat*. Pharm. 46(2):66-74.
- (88) Du Souich, P. et.al. (1990) *Influence of food on the bioavailability of diltiazem and two of its metabolites following the administration of conventional tablets and slow release capsules*. Biopharm. Drug Disp. 11(2):137-148.
- (89) Ingwersen, S.H. et.al. (1993) *Food intake increases the relative oral bioavailability of vanoxerine*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):308-310.
- (90) Martínez, M.N. (1990) *Effect of dietary fat content on the bioavailability as a sustained release quinidine gluconate tablet*. Biopharm. Drug Disp. 11(1):17-30.
- (91) Riley S.A. et.al. (1992) *Effects of a non-absorbable osmotic load on drug absorption in healthy volunteers*. Br. J. Clin. Pharmac. 34(1):40-46.
- (92) Neuvonen, P.J. and Kivistö, K.T. (1992) *Milk and yoghurt do not impair the absorption of afloxacin*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(3):346-348.
- (93) Summerbell, J. et.al. (1992) *The influence of supplemented diet on blood esterases in the frail elderly*. Br. J. Clin. Pharmac. 34(1):159p.
- (94) Fuhr, U. et.al. (1993) *Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal naringenin on CYP1A2 dependent*

- metabolism of caffeine in man. *Br. J. Clin. Pharmac.* 35(4):431-436.
- (95) Bailey, D.G. et.al. (1993) Grapefruit juice-felodipine interaction: Mechanism, predictability and effect of naringin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(6):637-642.
- (96) Park, G.R. (1991) Studies of drug metabolism in the anhepatic patient. *Acta Pharm. Nord.* 3(1):105.
- (97) Beaune, P. (1991) Cytochromes P-450 in extrahepatic tissues. *Acta Pharm. Nord.* 3(2):105-106.
- (98) Karsen, Claus et.al. (1991) Stability of ketoprofen-dextran ester products in homogenates of various segments of the pig G. I. tract. *Acta Pharm. Nord.* 3(1):41-44.
- (99) MacKay, J. et.al. (1992) Investigations onto the mechanism for the improved oral systemic bioavailability of cefuroxime from cefuroxime axetil when taken after food. *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):226p-227p.
- (100) Riley, S.A. et.al. (1992) The influence of gastrointestinal transit on drug absorption in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmac.* 34(1):32-39.
- (101) Anderson, S. (1987) Cytochromes P-450 in biosynthesis of bile acids and metabolism of vitamin D₃. Studies on cytochrome P-450 isozymes in rat liver microsomes. *Acta Pharm Suec.* 24(1)37.
- (102) Tozer, T.N. (1991) Extrahepatic sulfoconjugation of salicylamine in dog. *Acta Pharm Nord.* 3(2):108.
- (103) Polache, A. et.al. (1991) Partially competitive inhibition of intestinal baclofen absorption by β -alanine, a nonessential dietary aminoacid. *Biopharm Drug Disp.* 12(9):647-660.
- (104) Degen, P.H. et.al. (1993) Influence of food on the disposition of the monoamineoxidase -A inhibitor brofaromine in healthy volunteers. *Biopharm. Drug Disp.* 14(3):209-215.
- (105) Williams, D.B. (1990) Absorption of doxycycline from a controlled release pellet formulation: the influence of food on bioavailability *Biophar. Drug Disp.* 11(2):93-106.
- (106) Pasqualy, R. et.al. (1991) Effects of chronic administration

- ofephedrine during very-low calories diets on energy expenditure, protein metabolism and hormone levels in obese subjects.* Clin. Sci. 82(1):85-92.
- (107) Ashton, M. (1989) *Pharmacokinetics of chloramphenicol and salicylic acid in states of malnutrition.* Acta Pharm Nord. 1(6):373.
- (108) Jung, D. et.al. (1990) *Absorption and disposition kinetics of chorotiazide in protein calorie malnutrition.* Biopharm. Drug Disp. 11(1):53-60.
- (109) Larés-Asseff, I. et.al. (1992) *Pharmacokinetics of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children.* Clin. Pharmacol. Ther. 51(1):12-17.
- (110) Mura C. et.al. (1993) *Molecular heterogeneity of the XbaI defined 44kb allele of the CYP2D locus within the Caucasian population.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(2):161-165.
- (111) Bluhm, R.E. et.al. (1993) *Genetically determined drug-metabolizing activity and desipramine associated cardiotoxicity: a case report.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(1):89-95.
- (112) Kroetz, D.L. et.al. (1993) *Measurement of in vivo microsomal epoxide hydrolase activity in white subjects.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(3):306-315.
- (113) Jones, C.D. et.al. (1993) *Thiopurine methyltransferase activity in a sample population of black subjects in Florida.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(3):348-353.
- (114) Lee, E.J.D. et.al. (1993) *Thiopurine s-methyltransferase activity in Chinese population.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(1):28-33.
- (115) Mc.Leod, H.L. (1994) *Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects.* Clin. Pharmacol. Ther. 55(1):15-20.
- (116) Hallak, H.O. et.al. (1993) *High clearance of (s)-warfarin in a warfarin-resistant subjects.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):327-330.
- (117) Ashan, C.H. et.al. (1993) *The influences of dose and ethnic*

- origins on the pharmacokinetics of nifedipine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(3):329-336.
- (118) Zhou, H.H. et.al. (1993) Ethnic differences in response to morphine *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(5):507-513.
- (119) Derr, R.F. (1993) Stimulation studies on ethanol metabolism in different human population with a physiological pharmacokinetic model. *J. Pharm. Sci.* 82(7):677-682.
- (120) Coyle, J.D. et.al. (1991) Acecainide pharmacokinetics in normal subjects of known acetylator phenotype. *Biopharm Drug Disp.* 12(8):599-612.
- (121) Alván, G. et.al. (1980) Genetic components in plasma protein binding and determinants of propranolol binding. *Acta Pharm. Suec.* 17(2):82.
- (122) Ashan, C.H. et.al. (1992) The influence of dose and ethnic origins on the pharmacokinetics of nifedipine after oral administration as capsules. *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(2):193-196.
- (123) Dhal, M-L. et.al. (1992) Analysis of the *CYP2D6* gene in relation to debrisoquin and desipramine hydroxylation in a Swedish population. *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(1):12-17.
- (124) Klametsdal, B. et.al. (1992) Interethnic difference in thiopurine methyltransferase activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(1):24-31.
- (125) Bertilsson, L. et.al. (1992) Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and *s*-mephenytoin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(4):388-397.
- (126) Johnson, J.A. et.al. (1992) Racial differences in propranolol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol. Ther.* 51(4):495-500.
- (127) Zhou, H-H. (1992) Differing effect of atropine of heart rate in Chinese and white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(2):120-124.124.
- (128) Sohn, D-R. (1992) Incidence of *s*-mephenytoin hydroxylation deficiency in a Korean population and the interphenotypic differences in diazepam pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol.*

- Ther. 52(2):160-169.
- (129) Bevan, E.G. et.al. (1992) *Effect of renal function on the pharmacokinetics and pharmacodynamics oftrandolapril*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(2):237p.
- (130) Kamali, F. et.al. (1992) *Paracetamol conjugations in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(5):552p.
- (131) Prescott, L.F. et.al. (1993) *The concentration-dependent disposition of intravenous p-aminohipurate renal function*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(1):20-29.
- (132) Kamali, F. et.al. (1993) *Paracetamol elimination in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(1):58-61.
- (133) Taylor, M.L. et.al. (1993) *The differential effect of aspirin on human platelet activation in aspirin-sensitive asthmatics and normal subjects*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):227-234.
- (134) Mattila, M.J. et.al. (1993) *Diazepam effects on the performance of healthy subjects are not enhanced by treatment with the antihistamine ebastine*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):272-277.
- (135) Osborne, R. et.al. (1993) *The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure*. Clin. Pharmacol. Ther. 54(2):158-167.
- (136) Robin, D.W. et.al. (1993) *Triazolam in cirrhosis: Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clin. Pharmacol. Ther. 54(6):630-637.
- (137) Wisser, H. (1981) *Circadian changes of clinical chemical and endocrinological parameters*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:323-338.
- (138) Hla, K. et.al. (1992) *Influence of time of administration on verapamil pharmacokinetics*. Clin. Pharmacol. Ther. 51(4):366-270.
- (139) Fisher, L. et.al. (1992) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylprednisolone when administered at 8 a.m. & p.m.* Clin. Pharmacol. Ther. 51(6):677-688.

- (140) Fogari, R. et.al. (1993) *Evening vs. morning isradipine sustained release in essential hypertension: a double-blind study with 24 h. ambulatory monitoring.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(1):51-54.
- (141) Peniston-Bird J.F. et.al. (1993) *HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection.* Clin. Chem. 39(11):2242-2247.
- (142) Witte, K. et.al. (1993) *Cardiovascular effects, pharmacokinetics, and converting enzyme inhibition of enalapril after morning versus evening administration.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(2):177-186.
- (143) Bailey, D.G. et.al. (1993) *Effect of grapefruit juice and naringin on nisoldipine pharmacokinetics.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(6):589-594.
- (144) Piafsky, K.M. et.al. (1980) *Clinical significance of drug binding to orosomucoid.* Acta Pharm. Suec. 17(2):99.
- (145) Lunde, P.K.M. (1980) *Displacement of drug from orosomucoid.* Acta Pharm. Suec. 17(2):101-101.
- (146) Blanchard, J. et.al. (1992) *Variability of the serum protein binding of theophylline in patients with asthma and cystic fibrosis.* Br. J. Clin. Pharmac. 33(6):653-656.
- (147) Costa, F. et.al. (1993) *Dose related effect of moxislyte on maximal urethral closing pressure in patients with spinal cord injuries.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(3):443-449.
- (148) Lee, B.L. et.al. (1993) *Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immunodeficiency syndrome.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(5):829-835.
- (149) Piscitelli, S.C. et.al. (1993) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with small cell lung cancer.* Clin. Pharmacol. Ther. 53(5):822-829.
- (150) Schwartz, S. et.al. (1993) *Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide in patients with cirrhosis.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(1):90-97.
- (151) Weinberger, M.M. (1992). *Drug clearance in patients with cystic fibrosis.* Clin. Pharmacol. Ther. 52(1):106.

- (152) Bevan, E.G. et.al. (1993) *Effect of renal function on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of trandolapril*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(2):128-135.
- (153) Seideman, P. et.al. (1993) *The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(4):409-412.
- (154) Therasse, D.G. et.al. (1993) *Effects of renal dysfunction on the pharmacokinetics of loracarbef*. Clin. Pharmacol. Ther. 54(3):311-316.
- (155) Blouin, R. et.al. (1993) *The effects of liver and renal disease on stereoselective serum binding of flurbiprofen*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(1):62-64.
- (156) Desager, J.P. et.al. (1993) *Protein binding and invertectin estimations in patients with onchocerciasis*. Clin. Pharmacol. Ther. 53(4):426-430.
- (157) Loi, C-M. et.al. (1993) *The effect of locainide on theophylline metabolism*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(4):437-440.
- (158) Thiollet, M. et.al. (1992) *The pharmacokinetics of perindopril in patients with liver cirrhosis*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(3):326-328.
- (159) Bammel, a. et.al. (1992) *Digitoxin metabolites in liver cirrhosis*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(5):550p-551p.
- (160) Moore, K. (1992) *A study to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the calcium antagonist lacidipine in patients with impaired hepatic function*. Br. J. Clin. Pharmac. 33(5):580p.
- (161) Blake, J.C. et.al. (1993) *The pharmacokinetics of intravenous ondasetron in patients with hepatic impairment*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(4):441-443.
- (162) Karbwang, J. et.al. (1993) *The pharmacokinetics of quinine in patients with hepatitis*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(4):444-446.
- (163) Kim, Y-G. et.al. (1993) *Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure*. Clin. Pharmacol. Ther. 54(6):612-620.
- (164) Hall, S.T. et.al. (1992) *Evaluation of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the calcium antagonist lacidipine in*

- patients with impaired renal function. *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(5):559p.
- (165) Milne, R.W. et.al. (1992) *The influence of renal function on the renal clearance of morphine and its glucuronide metabolites in intensive-care patients.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 34(1):53-59.
- (166) Jhonson, C.A. (1992) *Single dose pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam in patients with renal disease.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(1):32-41.
- (167) Troy, S.M. (1992) *The effect of renal disease of tolrestat pharmacokinetics.* *Clin Pharmac. Ther.* 51(3):271-277.
- (168) Tawashi, M. (1991) *Pharmacokinetics of oral diltiazem and five of its metabolites in patients with chronic renal failure.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(2):95-104.
- (169) Tawashi, M. (1991) *Pharmacokinetics of oral diltiazem and five of its metabolites in healthy volunteers.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(2):105-112.
- (170) Lanao, J.M. et.al. (1991) *Distribution kinetics of netilmicin in human blister fluid. Effect of renal impairment.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(2):149-162.
- (171) Gibaldi, M. (1984) *Biopharmaceutics and clinical Pharmacokinetics.* Lea and Febiger. E.U.A. 330pp.
- (172) Hickey, A. J. et.al. (1991) *Injection site dependence of the appearance of sulfobromophthalein and phenolphthalein in bile.* *Biopharm. Drug Disp.* 12(8):633-636.
- (173) Murdoch, R.D. et.al. (1993) *Plasma concentrations and urinary excretion of histamine after inhalation and subcutaneous injection of histamine.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 35(2):171-177.
- (174) Ohtawa, M. et.al. (1993) *Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in human.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 35(3):290-297.
- (175) Caldwell, J. (1991) *Comparative roles of hepatic and extrahepatic tissues in determining the stereochemical course of drug disposition.* *Acta Pharm. Nord.* 3(2):123.

- (176) Bertilsson, L. and Dahl, H.-L. (1991) *Stereoselective organ-specific disposition of drugs in man*. *Acta Pharm. Nord.* 3(2):124.
- (177) Woodworth, J.R. et.al. (1991) *Isomazole disposition in man as a function of dose and route of administration*. *Biopharm. Drug Disp.* 12(9):673-686.
- (178) Tang-Liu, et.al. (1993) *Disposition of SK&F L-190144 in rats and monkeys after oral, intravenous or ocular administration*. *Biopharm. Drug. Disp.* 14(4):313-324.
- (179) Curry, S.H. et.al. (1993) *Plasma concentrations and hemodynamic effects of intravenous, sublingual, and aerosolized nitroglycerin in patients undergoing cardiac catheterization*. *Biopharm. Drug Disp.* 14(2):107-118.
- (180) Kiriyama, A. et.al. (1993) *Pharmacokinetics study of a tripeptide HIV-r protease inhibitor, KNI-174 in rats after intravenous and intraduodenal administrations*. *Biopharm. Drug Disp.* 14(3):199-207.
- (181) Chow H.-H. and Lalka, D. (1993) *Pharmacokinetics of D-propranolol following oral, intraarterial and intraportal administration: contrasting effects of oral glucose pretreatment*. *Biopharm. Drug Disp.* 14(3):217-231.
- (182) Babul, N. et.al. (1993) *Disposition of morphine and its glucuronide metabolites after oral and rectal administration: Evidence of route specificity*. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(3):286-292.
- (183) Renwick, A.G. (1991) *Metabolism in the intestinal tract*. *Acta Pharm. Nord.* 3(2):106-107.
- (184) Pang, K.S. (1991) *In vivo and in vitro techniques for the study of drug metabolism in the GI-tract*. *Acta Pharm. Nord.* 3(2):104-124.
- (185) Gibaldi, M. (1974) *Introducción a la biofarmacia*. Acribia. España. 106pp.
- (186) Dressman, J.B. et.al. (1993) *Gastrointestinal parameters that influence oral medications*. *J. Pharm. Sci.* 82(9):857-872.
- (187) Rubinstein, A. (1990) *Microbially controlled drug delivery to*

- the colon. *Biophar. Drug Disp.* 11(6):465-475.
- (188) Miyazaki, S. (1981) *Effect of bile flow on indometacin absorption in rats.* *Acta Pharm. Suec.* 18(3):135-138.
- (189) Kurosawa, N. et.al. (1993) *Serum concentration and cardiovascular effects of salbutamol after oral and rectal administration in healthy volunteers.* *J. Clin. Pharmacol.* 18(3):103-108.
- (190) Litter, M. (1983) *Farmacologia.* El Ateneo. Argentina. 6a. ed.
- (191) Philpot, R. et.al. (1991) *Oxidative metabolism in the lung.* *Acta Pharm. Nord.* 3(2):109.
- (192) Ryrfeldt, A. (1991) *Heterogeneity of enzyme distribution in the lung: Consequences for xenobiotic metabolism?* *Acta Pharm. Nord.* 3(2):109-110.
- (193) Koup, J.R. (1990) *A single and multiple dose pharmacokinetics and metabolism study of meclofenamate sodium.* *Biopharm. Drug Disp.* 11(1):1-16.
- (194) Chappay, O.N. et.al. (1993) *Colchicine disposition in human leukocytes after single and multiple oral administration.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 54(4):360-367.
- (195) Oliary, J. et.al. (1992) *Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers after single and repeated doses in man.* *Biopharm. Drug Disp.* 13(5):337-344.
- (196) Nakatsu, K. et.al. (1992) *Plasma disposition and hemodynamic effects of a single oral dose of isosorbide dinitrate in human males and females.* *Biopharm. Drug Disp.* 13(5):357-368.
- (197) MacFadyen, R.J. et.al. (1993) *Differential effects of ACE inhibiting drugs: Evidence for concentration-, dose-, and agent-dependent responses.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 53(6):622-629.
- (198) Zimmerman, C.L. (1990) *The disposition of cytosine arabinoside and its metabolite after single doses to rabbits.* *Biophar. Drug Disp.* 11(2):121-130.
- (199) Horvat, A.M. et.al. (1990) *Multiple-dose propranolol administration does not influence the single dose pharmacokinetics of quinapril and its active metabolite*

- (quinaprilat). Biophar. Drug Disp. 11(3):1991-196.
- (200) Zia-Amirhosseini, P. et.al. (1994) *Enhanced covalent binding of tolmetin to proteins in human after multiple dosing.* Clin. Pharmacol. Ther. 55(1):21-27.
- (201) Van Steveninck, A.L. et.al. (1993) *CNS-related performance and haemodynamics of metoprolol-eros and propranolol after single and 3 days dosing in healthy volunteers.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(2):114-120.
- (202) Shyu, W.Ch. et.al. (1993) *Multiple-dose phase I study of transnasal butorphanol.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(1):34-41.
- (203) Duornik, D. et.al. (1981) *Comparative bioavailability of propranolol: Twice-Daily versus four times daily administration.* J. Clin. Pharmacol. 21:472-478.
- (204) Storm, G. et.al. (1991) *A combined single and multiple dose pharmacokinetic study of oral isosorbide-5-mononitrate in healthy volunteers.* Biophar. Drug Disp. 12(9):661-672.
- (205) Bianchetti, G. (1991) *Bioavailability of diltiazem as a function of the administered dose.* Biopharm. Drug Disp. 12(6):391-401.
- (206) Hooper, N.D. (1991) *Single oral dose pharmacokinetics and comparative bioavailability of danazol in humans.* Biopharm. Drug Disp. 12(8):577-582.
- (207) Homes, L.G. (1991) *Pharmacokinetic comparison of a combination tablet of enalapril and hydrochlorothiazide with enalapril and hydrochlorothiazide tablets administered together and separately.* Biopharm. Drug Disp. 11(5):447-455.
- (208) Borgström, L. and Kägedal, B. (1990) *Dose dependent pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral dosing to man.* Biopharm. Drug Disp. 11(2):131-136.
- (209) Dávila, D. and Kolačny-babič (1991) *Pharmacokinetics of azithromycin after single oral dosing of experimental animals.* Biopharm. Drug Disp. 12(7):505-514.
- (210) Williams, R.L. et.al. (1990) *Absorption and disposition of a new low-dose combination formulation of hydrochlorothiazide and triamterene.* Biopharm Drug Disp. 11(3):233-244.

- (211) Hirata, J. et.al. (1990) *First-pass metabolism of acetaminophen in rats after low and high doses.* Biopharm. Drug Disp. 11(3):245-252.
- (212) DeVries, M.H. et.al. (1993) *Pharmacokinetics of fluvoxamine maleate after increasing single oral doses in healthy subjects.* Biopharm. Drug Disp. 14(4):291-296.
- (213) Hinrichsen, H. et.al. (1993) *Dose dependence heart rate reducing effect of nizatidine a histamine H₂-receptor antagonist.* Br. J. Clin. Pharmacol. 35(5):461-466.
- (214) Regazzi, M.B. et.al. (1993) *Disposition of high-dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation.* Clin. Pharmacol. Ther. 54(1):45-52.
- (215) Gabard, B. and Mascher, H. (1991) *Endogenous plasma N-acetylcysteine and single dose oral bioavailability from two different formulations as determined by a new analytical method.* Biopharm. Drug Disp. 12(5):343-353.
- (216) Curry, S.H. et.al. (1991) *Disposition and pharmacodynamics of dichloroacetate (DCA) and oxalate following oral DCA doses.* Biopharm. Drug Disp. 12(5):375-390.
- (217) Van Bommel, E.M.G. (1991) *Kinetics of acetaminophen after single- and multiple-dose oral administration as a gradient matrix system to healthy male subjects.* Biopharm. Drug Disp. 12(5):355-366.
- (218) Thakker, K.M. et.al. (1992) *Effect of food and relative bioavailability following single doses of diclofenac 150 mg hydrogel bead (HBG) capsules in healthy humans.* Biopharm. Drug Disp. 13(5):327-335.
- (219) Wood-Baker, R. et.al. (1993) *The time course of action of three differing doses of noberastine, a novel H₁-receptor antagonist, on histamine-induced skin wheals and the relationship to plasma drug concentrations in normal human volunteers.* Br. J. Clin. Pharmac. 35(2):166-170.
- (220) Van Harten, J. et.al. (1991) *Bioavailability of fluvoxamine given with and without food.* Biopharm. Drug Disp. 12(8):577-582.

- (221) Macheras, P. et.al. (1991) *Bioavailability study of a freeze-dried sodium phenytoin-milk formulation*. *Biopharm. Drug Disp.* 12(9):687-695.
- (222) Eller, H.G. and Della-Coletta, A.A. (1990) *Absence of effect of food on alprazolam absorption from sustained release tablets*. *Biopharm. Drug Disp.* 11(1):31-38.
- (223) Dimmitt, D.C. et.al. (1991) *Pharmacokinetics of diltiazem and propranolol when administered alone and in combination*. *Biopharm. Drug Disp.* 12(7):515-522.
- (224) Moore, D.H. et.al. (1991) *The pharmacokinetics of atropine and diazepam in sheep: intramuscular co-administration*. *Biopharm. Drug Disp.* 12(7):525-536.
- (225) Divoll, A.M. et.al. (1981) *Effect of magnesium-aluminium hydroxide and kaolin-pectin on absorption of digitoxin from tablets and capsules*. *J. Clin. Pharmacol.* 21:26-30.
- (226) Albert, K.S. et.al. (1981) *Influence of kaolin-pectin suspension on steady-state plasma digoxin levels*. *J. Clin. Pharmacol.* 21:449-455.
- (227) Brodersen, R. (1980) *Competitive binding of bilirubin and drugs to albumin*. *Acta Pharm. Suec.* 18(5):79.
- (228) Pokrajac, M. et.al. (1993) *Pharmacokinetic interaction between valproic acid and phenobarbital*. *Biopharm. Drug Disp.* 14(1):81-86.
- (229) Von Moltke, et.al. (1993) *Inhibition of acetaminophen and lorazepam glucuronitation in vitro by probenecid*. *Biopharm. Drug Disp.* 14(2):119-130.
- (230) Sahai, J. et.al. (1993) *The influence of chronic administration of calcium carbonate on the bioavailability of oral ciprofloxacin*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53(3):302-304.
- (231) Uree, T.B. et.al. (1993) *The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite o-desmethylnaproxen, and their acylglucuronides in humans. Effect of cimetidine*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 35(5):467-472.
- (232) Ujhelyi, M.R. et.al. (1993) *The pharmacokinetics and pharmacodynamic interaction between propafenone and*

- Lidocaine*. Clin. Pharmacol. Ther. 53(1):38-48.
- (233) Kober, A. (1980) *Differentiated effects on drug binding diseases*. Acta Pharm. Suec. 17(2):100.
- (234) Wilkinson, G.R. (1980) *Plasma drug binding and liver disease*. Acta Pharm. Suec. 17(2):102.
- (235) Odar-Cederlöf, I. (1980) *Drug binding and renal disease*. Acta Pharm. Suec. 17(2):103-104.
- (236) Monson, J.W. *Pharmaceutical analysis. Modern Methods. Part B*. Mercer Dekker, Inc. E.U.A.
- (237) Bae, E.J. et.al. (1993) *Pharmacokinetics of methotrexate after intravenous and intramuscular injection of methotrexate-bearing neutral liposomes to rats*. J. Clin. Pharmacol. 18(6):393-404.
- (238) Shing, W.G. et.al. (1993) *Arterial and venous blood samplings in pharmacokinetic studies: vancomycin in rabbits*. J. Clin. Pharmacol. 18(3):115-122.
- (239) Davidson and Smith. *Colección Tood-Sandford (1981) Diagnóstico clínico por el laboratorio*. Salvat. España. 6a.ed.
- (240) Svensson, C.K. (1988) *Is blood sampling for determination of antipyrine pharmacokinetics in healthy volunteers ethically justified?* Clin. Pharmacol. Ther. 44(4):365-368.
- (241) Wagner, J.G. (1971) *Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics*. Drug Intelligence. E.U.A. 375 pp.
- (242) Scharmm, W. et.al. (1993) *Testosterone concentration is increased in whole saliva but not in ultrafiltrate after toothbrushing*. Clin. Chem. 39(2):519-521.
- (243) Chee, K.Y. et.al. (1993) *A simple collection method for saliva in children: potential for home monitoring of carbamazepine therapy*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(3):311-313.
- (244) Lidström-Olsson, B. (1986) *Studies on the modulation of hydroxylase activities in bile acid biosynthesis by intracellular proteins*. Acta Pharm. Nord. 23(5):316.
- (245) Bostóm, H. (1984) *Multiple forms of cytochrome P-450 in biosynthesis of bile acids*. Acta Pharm Suec. 21(5):318.

- (246) Kalles, I. (1984) *Isolation of cytosolic and microsomal proteins modulating hydroxylase activities in bile acid biosynthesis*. Acta Pharm. Nord. 21(5):319.
- (247) Smith, L.L. (1991) *Transport processes in the lung*. Acta Pharm. Nord. 3(2):110.
- (248) McLean, A.M. (1991) *Stability of diltiazem in different biological fluids*. Biopharm. Drug Disp. 12(5):327-334.
- (249) Rowland, M. (1980) *Pharmacokinetic consequences of drug protein binding*. Acta Pharm. Suec. 17(2):82.
- (250) Silver, B. et.al. (1980) *The influence of heparin administration on the plasma protein binding and disposition of propranolol*. Acta Pharm. Suec. 17(2):94.
- (251) Weigand, U.W. (1980) *Effect of heparin administration on plasma protein binding of several drugs and bilirubin in patients with thrombotic disease*. Acta Pharm. Suec. 17(2):95.
- (252) Ruhling, K. et.al. (1992) *Increase in plasma total and lipoprotein cholesterol during incubation of whole blood samples at 37°C—influence of LCAT inhibitors*. Clin. Chim. Acta 205(3):205-212.
- (253) Glomsted, J.A. (1988) *The plasma lecithin-cholesterol acyltransferase reaction*. J. Lipid Res. 9:155-167.
- (254) Viridi, N.K. and Worthington, D.J. (1989) *Cholesterol and triglyceride stability in whole blood*. Ann. Clin. Biochem. 28:197-198.
- (255) Cossum, P.A. (1991) *Inactivation of drugs by blood*. Acta Pharm. Nord. 3(2):111-112.
- (256) Mlejal, J.J. et.al. (1991) *Xenobiotic interactions with red blood cells: Monooxygenase activity and thiol interchang reactions*. Acta Pharm. Nord. 3(2):117-118.
- (257) Vetrecht, J.P. (1991) *Drug metabolism by activated leukocytes: Implications for adverse drug rections*. Acta Pharm. Nord. 3(2):118-119.
- (258) O'Brien, P.J. et.al. (1991) *Drug metabolism by activated neutrophils and eosinophils*. Acta Pharm. Nord. 3(2):119-120.
- (259) Murphy, J.R. (1982) *Erythrocyte metabolism III. Relationship*

- of energy metabolism and serum factors to the osmotic fragility following incubation. *J. Lab. Clin. Med.* 60:86-109.
- (260) Utoh and Harasaki (1992) Damage to erythrocytes from long-term heat stress. *Clin. Sci.* 82(1):9-11.
- (261) Ukida, M. et.al. (1981) Effect of storage at -20°C on the concentration of amino acids in plasma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19:17-20.
- (262) Brega, A. et.al. (1992) Improved HPLC determination of plasma and urine oxalate in the clinical diagnostic laboratory. *J. Liq. Chrom.* 15(1):501-512.
- (263) Bates, C.J. (1992) Use of homocysteine to stabilize ascorbic acid or to reduce dehydroascorbic acid during HPLC separation of large volumes of tissue extracts. *Clin. Chim. Acta* 205:249-252.
- (264) Fogg, A.G. and Summan, A.M. (1992) Stabilization by ethylenediaminetetraacetic acid of amide and other groups in drug compounds. *J. Clin. Pharm. Ther.* 17(2):107-110.
- (265) Lee, M.G. et.al. (1981) Pharmacokinetics of drugs in blood. I. Unusual distribution of gentamicin. *Biopharm. Drug Disp.* 2:89-97.
- (266) Landt, M. Evaluation of evacuated blood-collection tubes: Effects of three types of polymeric separators on therapeutic drug-monitoring specimens. *Clin. Chem.* 39(8):1712-1717.
- (267) Airauda, Ch. B. et.al. (1993) Compatibility of diazepam [Valium (R)], clorazepate dipotassium salt [Tranxene (R)] and midazolam hydrochloride [Hypnovel (R)] with Stedium 6 (R), a new multilayer polyethylene-lined film for infusion bags: a comparative study with polyvinyl chloride bags. *J. Clin. Pharmacol.* 18(6):389-392.
- (268) Cid Cárcamo, E. (1982) *Introducción a la Farmacocinética*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. 1a. ed. E.U.A.
- (269) Hamlin, W.B. (1993) The history of evaluation criteria for CAP Surveys. *Clin. Chem.* 39(7):1486-1490.1490.
- (270) Behne, D. (1981) Sources of error in sampling and sample

- preparation trace element analysis in medicine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19:17-20.
- (271) Good clinical practice: rules, regulations and their impact on the investigator. (1992). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 33(5):463-465.
- (272) Hines, et.al. (1985) Paired-ion liquid chromatographic method for the analysis of a phenanthrenemethanol antimalarial in whole blood. *J. Pharm. Sci.* 74(4):433-437.
- (273) Good clinical practice: uncommon care in the common market. (1992) *Clin. Sci.* 82(1):9-11.
- (274) Dugué, B. et.al. (1992) Preanalytical factors and standardized specimen collection: influence of Psychological stress. *J. Clin. Lab. Invest.* 52:57-63.
- (275) Eksborg, S. et.al. (1981) Quantitative determination of andriamycin and damorubicin-handling of blood and plasma samples. *Acta Pharm. Suec.* 18(4):215-220.
- (276) Boomsma, F. et.al. (1993) Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine. *Clin. Chem.* 39(12):2503-2508.
- (277) El-Sayed Y.N. et.al. (1993) High performance liquid chromatographic method for the determination of nifedipine in plasma and its use in pharmacokinetic studies. *J. Clin. Pharmacol.* 18(5):325-330.
- (278) Beijnen, J.H. and Udenberg W.J.M. (1988) High-performance liquid chromatographic bioanalysis of anthracycline cytostatic drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6(6-8):677-685.
- (279) Glick, M.R. and Ryder, K.W. (1993) Double trouble: Hemolysis and stabilized hemoglobins (so you think you're seeing red now?). *Clin. Chem.* 39(9):1764-1779.
- (280) Jay, D.W. and Provasek, D. (1993) Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assay. *Clin. Chem.* 39(9):1804-1810.
- (281) Hattab, F. (1981) Stability of fluoride solutions in glass and plastic containers. *Acta Pharm. Suec.* 18(4):249-253.
- (282) Boone, J. (1993) Governmental perspectives on evaluating

- laboratory performance. Clin. Chem. 39(7):1456-1460.1460.
- (283) Parvy, P. (1993) *Intra- and interlaboratory quality control for assay of amino acids in biological fluids: 14 years of the French experience.* Clin. Chem. 39(9):1831-1836.
- (284) Passing, H. et.al. (1981) *Comparasion of three distribution free procedures in the establishment of assigned values in control sera. The establishment of assigned values in control sera III.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:1153-1166.
- (285) Passing, H. et.al. (1981) *An optimized design for the establishment of assigned values in control sera. The establishment of assigned values in control sera IV.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:1167-1180.
- (286) Passing, H. et.al. (1981) *The importance of a blend control in the establishment of assigned values in control sera. The establishment of assigned values in control sera I.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:1137-1144.
- (287) Chung H-C. and Hsu, M-C. (1993) *Liquid chromatographic determination of amoxicillin preparations. Interlaboratory validation.* J. Chrom. 629(2):277-281.
- (288) Passing, H. (1981) *The inadequacy of normal distribution models for the establishment of assigned values in control sera. The establishment of assigned values in control sera II.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:1145-1151.
- (289) Chamberlain, J. (1990) *Analysis of drugs in biological fluids.* CRC Press, E.U.A., 4a. ed., 219 pp.
- (290) *Remington's Pharmaceutical Sciences.* (1990) Mack Printing Company, E.U.A., 16a. ed.
- (291) Bahowick, T. et.al.(1992) *Column liquid chromatography: Equipment and instrumentation.* Anal. Chem. 64(12):255R-270R.
- (292) Dorsey, J.G. et.al. (1992) *Liquid chromatography: Theory and methodology.* Anal. Chem. 64(12):353R-389R.
- (293) Buchberger, N. (1992) *Direct serum injection in ion chromatography on packing materials with a semi-perseable surface.* J. Chrom. 589:53-60.
- (294) Garcia, L.L. and Shihabi, Z.K. (1993) *Suramin determination*

- by direct serum injection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(6):1279-1288.
- (295) Shihabi, Z.K. et.al. (1993) *Iohexol determination by direct injection of serum on the HPLC column.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(6):1289-1296.
- (296) Ikarashi, Y. et.al. (1993) *Binding characteristics of various neurochemicals to glassy carbon.* *J. Chrom.* 645(2):219-231.
- (297) Kimata, K. et.al. (1992) *Suppression of the effect of metal impurities in alkylsilylated silica packing materials.* *J. Chrom.* 589:87-95.
- (298) Honoré Hansen, S. (1990) *Bare silica. Its use in liquid chromatography with aqueous eluents for pharmaceutical and biomedical analysis with special emphasis on dynamically modified silica.* *Acta Pharm. Nord.* 2(5):363-384.
- (299) Moors, M. and Massart, D.L. (1992) *Comparison of the elution of a weakly basic drugs of cyanopropyl-bonded silica cartridges from different manufacturers and different batches.* *Anal. Chim. Acta* 282(1):135-144.
- (300) Hsu, C.Y. and Cooper, W.T. (1992) *Solvent-stationary phase interactions in normal bonded phase high-performance liquid chromatographic columns. I. Investigation of system peaks in amino bonded phase columns.* *J. Chrom.* 603:63-71.
- (301) Wingren, C. et.al. (1992) *Support for liquid-liquid partition chromatography in aqueous two-phase systems: a comparison of Superdex and LiParGel.* *J. Chrom.* 603:73-81.
- (302) Jagodzinski Jacek, J. et.al. (1992) *Chromatography on Poly-Rp and its cyano and diol derivatives using both polar and non-polar solvent systems.* *J. Chrom.* 591:89-97.
- (303) Northrop, D.M. et.al. (1992) *Liquid chromatographic retention behavior of polystyrene homopolymers on a C_{18} bimodal pore diameter reversed-phase column.* *Anal. Chem.* 64(1):18-21.
- (304) Gadde, R.R. and Burton, F.W. (1992) *Simple reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for 13-cis-retinoic acid in serum.* *J. Chrom.* 593:41-46.
- (305) Díez, M.T. et.al. (1992) *Simultaneous determination of*

- allantoin and creatinine in urine by a rapid reversed-phase liquid-chromatographic method. *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1337-1350.
- (306) Papadoyannis, I.N. et.al. (1992) Simultaneous reversed-phase gradient-HPLC analysis of anthranilic acid derivatives in anti-inflammatory drugs and samples of biological interest. *J. Liq. Chrom.* 15(9):1923-1945.
- (307) Kiba, N. et.al. (1992) Column liquid chromatographic determination of sucrose and fructose with use of an enzyme reactor and spectrofluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta* 259(1):19-23.
- (308) Letourneur, D. et.al. (1992) Phosphorylated polystyrene resins in high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chrom.* 589:53-60.
- (309) Ludwig, R.C. (1992) Application of a pecllicular anion-exchange resin to the separation of inorganic and organic anions by single-column anion exchange. *J. Chrom.* 592:101-108.
- (310) Glod, B.K. et.al. (1992) Ion-exclusion chromatography using mobile phases containing β -cyclodextrin. *J. Chrom.* 595:149-153.
- (311) Etoh, T. et.al. (1992) Simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high performance ion exchange chromatography with direct injection. *J. Liq. Chrom.* 15(9):1565-1576.
- (312) Kibbey, C.E. and Meyerhoff, M.E. (1993) Preparation and characterization of covalently bound tetraphenylporphyrin-silica gel stationary phases for reversed-phase and anion-exchange chromatography. *Anal. Chem.* 65(17):2189-2196.
- (313) Kimata, K. et.al. (1993) Electron acceptor and electron-donor chromatographic stationary phases for the reversed-phase liquid chromatographic separation and isomer identification of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Anal. Chem.* 65(18):2502-2509.

- (314) Sokolowski, A. (1986) *Reversed phase ion-pair liquid chromatography*. Acta Pharm. Suec. 23(4):253.
- (315) Patterson, C. (1984) *Separation of enantiomers in ion-pair chromatographic systems*. Acta Pharm. Nord. 21(4):255.
- (316) Johansson, M.I. (1981) *Butyronitrile as organic solvent in ion-pair extraction*. Acta Pharm. Suec. 18(1):1-8.
- (317) Johansson, M.I. (1981) *Retention behaviour of amines in reversed-phase ion-pair chromatography with octyl sulfate and *n*-pentanol in the eluent*. Acta Pharm. Suec. 18(1):9-24.
- (318) Johansson, M.I. (1981) *Studies on reversed phase ion-pair chromatography with a dynamically coated adsorbent*. Acta Pharm. Suec. 18(4):254.
- (319) Kolstad, A.C. and Nordgren, T. (1980) *Kinetic studies on ion-pair extraction*. Acta Pharm. Suec. 17(5):327-332.
- (320) Gal, J. (1991) *Chirality-definitions and analysis*. Acta Pharm. Nord. 3(2):121.
- (321) Andersson, S. (1992) *Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases*. J. Chrom. 591:65-73.
- (322) Aboul-Enein, H.Y. and Islam, R.M. (1990) *Direct HPLC separation of glutethimide enantiomers using a cellulose tricinamate chiral stationary phase*. Acta Pharm. Nord. 2(6):415-420.
- (323) Delgaard, L. (1990) *Racemates and enantiomers in drug research and development*. Acta Pharm. Nord. 2(3):131-136.
- (324) Testa, B. (1990) *Mechanism of chiral recognition in pharmacology. The Easson-Stedman model revisited*. Acta Pharm. Nord. 2(3):137-144.
- (325) Allenmark, S. (1990) *Chromatographic methods for optical purity determination of drugs*. Acta Pharm. Nord. 2(3):161-170.
- (326) Hansen, J.J. et.al. (1990) *Excitatory amino acid receptor agonists. Enantiomeric resolutions by use of enzymes and chiral HPLC*. Acta Pharm. Nord. 2(3):185-192.
- (327) Oliveros, L. et.al. (1992) *Silica-bonded chiral stationary*

- phases with structurally simple n-donor chiral selectors for high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 589:53-60.
- (328) Sakurai, E. et.al. (1992) *The optical resolution of racemic chlorpheniramine and its stereoselective pharmacokinetics in plasma.* *J. Pharm. Pharmacol.* 44(1):44-47.
- (329) Martens, J. and Bhushan, R. (1992) *Resolution of enantiomers with a chiral phase chromatography.* *J. Liq. Chrom.* 15(1):1-28.
- (330) Stalcup, A.M. and Williams, K.L. (1992) *Determination of enantiomers in human serum by direct injection onto β -cyclodextrin HPLC bonded phase.* *J. Liq. Chrom.* 15(1):29-38.
- (331) Moulin, A. et.al. (1992) *High performance liquid chromatographic determination of the optical isomers of arotinolol and AC623, its main metabolite in biological samples.* *J. Liq. Chrom.* 15(1):165-182.
- (332) Mathur, R.G. et.al. (1992) *A novel polysaccharide for racemate resolution.* *J. Liq. Chrom.* 15(4):573-584.
- (333) Pirkle, W.H. and Welch, C.J. (1992) *An improved chiral stationary phase for the chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers.* *J. Liq. Chrom.* 15(9):1947-1958.
- (334) Aboul-Enein, H.Y. and Bakr, S.A. (1992) *Simple chiral liquid chromatographic separation of flurbiprofen enantiomers in biological fluids.* *J. Liq. Chrom.* 15(9):1983-1992.
- (335) Salamoun J. et.al. (1992) *Cation-exchange liquid chromatography of choline and acetylcholine on free shielded silanols of silica-based reversed-phase stationary phases.* *J. Chrom.* 596:43-49.
- (336) Haginaka J. and Wakai, J. (1992) *Preparation and characterization of mixed functional phases silica materials using phenyl-, buthyl- or octylchlorosilane as a silylating agent.* *J. Chrom.* 596:151-155.
- (337) Suec, F. and Fréchet, J.M.J. (1992) *Continuous rods of macroporous polymer and high-performance liquid chromatography separation media.* *Anal. Chem.* 64(7):820-822.

- (338) Waksmundzka-Hajnos, M. (1992) *Comparison of adsorption properties of fluorosil and silica in high-performance liquid chromatography. I. Retention behaviour of monofunctional model solutes.* J. Chrom. 600:51-57.
- (339) Morvai, M. et.al. (1992) *Buffer and pH dependence of the retention of phenylthiocarbamylamino acids in reversed-phase high-performance liquid chromatography.* J. Chrom. 600:87-91.
- (340) Teng, J.I. (1992) *Reversed-phase high performance liquid chromatography of underivatized fatty acids by fatty acid analysis column.* J. Liq. Chrom. 15(9):1473-1486.
- (341) Lima, L.R. and Synovec, R.E. (1993) *Uncoupling the effects on convection and diffusion on refractive index gradient detection in high-performance liquid chromatography.* Anal. Chem. 65(2):128-134.
- (342) Zoutendam, P.H. et.al. (1993) *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of the cardiac glycoside LNF-209 with refractive index detection.* J. Chrom. 631(1-2):221-226.
- (343) Cooper, B.R. (1992) *Quantitative determination of catecholamines in individual bovine adrenomedullary cells by reversed-phase microcolumn liquid chromatography with electrochemical detection.* Anal. Chem. 64(8):691-694.
- (344) Cox, R.L. et.al. (1992) *Ferrocene tagging of amines, amino acids and peptides for liquid chromatography with electrochemical detection.* Anal. Chim. Acta 262(1):145-159.
- (345) Eriksson, B.-M. and Wikström, M. (1992) *Determination of catecholamines in urine by liquid chromatography and electrochemical detection after on-line sample purification on immobilized boronic acid.* J. Chrom. 593:185-190.
- (346) Koizumi, K. et.al. (1992) *Analyses of isomeric mono-*o*-methyl-*D*-glucoses, *D*-glucobioses and *D*-glucos-monophosphates by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection.* J. Chrom. 593:340-344.
- (347) Tsuyama, Y. et.al. (1992) *Analysis of underivatized C₁₇-C₁₈ fatty acids by reversed-phase ion-pair high-performance*

liquid chromatography with conductivity detection. *J. Chrom.* 596:1881-1883.

- (348) McLaghlin, G.M. et.al. (1992) *Pharmaceutical drug separation by HPLC: practical guidelines*. *J. Exp. Chrom.* 15(6-7):981-1022.
- (349) Jussofie, A. et.al. (1993) Simultaneous automated determination of catecholamines, serotonin, and their metabolites in brain tissue by HPLC and electrochemical detection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 19(2):447-453.
- (350) Kanazawa, H. et.al. (1993) Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of meprobamate and other anaesthetics in plasma. *J. Chrom.* 631:1-10, 135-139.
- (351) Mathys, K. and Brunsden, P. (1988) Determination of (S)-(-)-cathinone and its metabolites (R,S)-(-) nampantolone and (R,S)-(-)-norpseudoephedrine in urine by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Chrom.* 593:79-85.
- (352) Seimlin, H.J. and Brunsden, P. (1988) Determination of psychotropic phenethylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chrom.* 545:21-46.
- (353) Tracqui, A. et.al. (1988) Simple and rapid screening procedure for 27 neuroleptic drugs. *Pharmacol. J. Clin. Pharm.* 15(3-7):1981-1992.
- (354) Viljoelto, E.A. et.al. (1988) Determination of amphetamine, methamphetamine, and dextroamphetamine in urine by liquid chromatography. *Clin. Chem.* 34:1889-1894.
- (355) Aronsson, T. (1987) Simple chromatographic systems for direct injection of unextracted blood plasma samples to HPLC and analysis with emphasis on amphetamines and the substituted amphetamines. *Acta Pharm. Scand.* 38(3):163.
- (356) Longwell, H. et.al. (1987) Guidelines for amphetamine urine analysis. *J. Chromatography*. vol. 396: 141-145.
- (357) Lomas and Briner (1987) Automated sample preparation and chromatographic analysis. Determination of 150 samples and

- Liquid chromatography with conductivity detection.* J. Chrom. 598:1891-1893.
- (348) McLaghlin, G.M. et.al. (1992) *Pharmaceutical drug separations by HPLC: practical guidelines.* J. Liq. Chrom. 15(6-7):981-1022.
- (349) Jussofie, A. et.al. (1993) *Simultaneous automated determination of catecholamines, serotonin, and their metabolites in brain tissue by HPLC and electrochemical detection.* Clin. Pharmacol. Ther. 18(2):447-463.
- (350) Kanazawa, H. et.al. (1993) *Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of medetomidine and other anaesthetics in plasma.* J. Chrom. 631(1-2):215-220.
- (351) Mathys, K. and Brenneisen, R. (1992) *Determination of (S)-(-)-cathinone and its metabolites (R,S)-(-)-norephedrine and (R,S)-(-)-norpseudoephedrine in urine by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection.* J. Chrom. 593:79-85.
- (352) Helmlin, H.J. and Prenneisen, R. (1992) *Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection.* J. Chrom. 593:87-94.
- (353) Tracqui, A. et.al. (1992) *Simple and rapid screening procedure for 27 neuroleptics using HPLC/DAD.* J. Liq. Chrom. 15(6-7):1381-1396.
- (354) Volpicelli, S.A. et.al. (1993) *Determination of clozapine, norclozapine, and clozapine-N-oxide in serum by liquid chromatography.* Clin. Chem. 39(8):1656-1659.
- (355) Arvidsson, T. (1987) *Liquid chromatographic systems for direct injection of untreated blood plasma sample in drug analysis with emphasis on interactions with the endogenous components.* Acta Pharm. Nord. 24(3):143.
- (356) Lingeman, H. et.al. (1991) *Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography.* Anal. Chem. 20(2):48-59.
- (357) Luders and Brunner (1987) *Automated sample preparation and chromatographic analysis: Determination of CGS 10787B and*

- related compounds. *J. Chrom. Sci.* 25:192-197.
- (358) Bickel, M.H. (1981) *Tissue binding of drugs.* *Acta Pharm. Suec.* 18(5):73.
- (359) Sah, R.N. and Miller, R.O. (1992) *Spontaneous reaction for acid dissolution of biological tissues in closed vessels.* *Anal. Chem.* 64(2):230-233.
- (360) Mincey, D.W. et.al. (1992) *Temperature controlled microwave oven digestion system.* *Anal. Chim. Acta* 264(1):97-100.
- (361) Kojima, I. et.al. (1992) *Microwave digestion of biological samples with acid mixture in a closed double PTFE vessel for metal determination by "one-drop" flame atomic absorption spectrometry.* *Anal. Chim. Acta* 264(1):101-106.
- (362) Engelhardt, H. (1986) *Practice of high performance liquid chromatography.* Springer-Verlag, Alemania.
- (363) Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. (1979) *Introduction to modern liquid chromatography.* John Wiley and Sons, E.U.A., 2a.ed.
- (364) Mikés, O. (1970) *Laboratory handbook of chromatographic methods.* Van Nostrand Reinhold Co., Gran Bretaña.
- (365) Parris, N.A. (1985) *Instrumental liquid chromatography.* Elsevier, Holanda, 2a.ed.
- (366) Garret, E. et.al. (1991) *High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drug The "Ecstasy", a modified amphetamine with applications to stability, partitioning and plasma protein binding.* *Acta Pharm. Nord.* 3(1):9-14.
- (367) Perrin, J.H. and Hardee, G.E. (1980) *Flow microcolorimetric investigations of drug-albumin interactions.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):75.
- (368) Weber, G. (1980) *Energetics and dynamics of binding of ligands to proteins.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):69.
- (369) Ehrnebo, M. (1980) *Influence of drug binding to blood cells on pharmacokinetics.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):81.
- (370) Sjöholm, I. (1980) *Specificity of the drug binding site of human serum albumin.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):76.
- (371) Jacobsen, S. and Sager, G. (1980) *Plasma proteins binding*

- drugs. *Acta Pharm. Suec.* 17(2):67.
- (372) Tillement, J.P. et.al. (1980) *Binding of some basic drugs to human serum lipoproteins.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):68.
- (373) Gizurarson, S. (1989) *A simple flow injection analysis for studies of drug-protein binding interactions in serum.* *Acta Pharm. Nord.* 1(5):291-294.
- (374) Lindup, W.E. and Bowner, C.I. (1980) *Effect of albumin concentration on drug binding constants.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):77.
- (375) Albany, A.A. et.al. (1981) *Binding of xanthine derivatives to human serum albumin as a function of pH.* *Acta Pharm. Suec.* 18(5):379-390.
- (376) Kurz, H. and Firchl, B. (1980) *Relevance of drug binding to animal muscle tissue for human muscle binding.* *Acta* 17(2):72.
- (377) Mucklow, J.C. (1980) *Correlation between the fraction of drugs in blood and the concentration in CSF, milk and saliva as well as placental transport.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):82.
- (378) Du Souich, P. et.al. (1990) *Effects of cefotaxime on the serum protein binding of sulfisoxazole.* *Biopharm. Drug Disp.* 11(5):371-379.
- (379) Andreasen, F. (1980) *Thiopentone binding at variable pH and temperature.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):70.
- (380) Chignell, C.F. (1980) *A critical evaluation of the techniques available for measuring drug-protein binding.* *Acta Pharm. Suec.* 17(2):71.
- (381) Johansen, M. et.al. (1991) *Metabolic study of pholcodine in urine using enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) and capillary gas chromatography.* *Acta Pharm. Nord.* 3(2):91-94.
- (382) Tuten, T. et.al. (1993) *Discordant results for determinations of triglycerides in Pig sera.* *Clin. Chem.* 39(1):125-128.
- (383) Kumar, A.M. (1993) *An improved assay of urinary catecholamine metabolites, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and vanillylmandelic acid, using high performance liquid chromatography with electrochemical detection.* *Clin.*

- Pharmacol. Ther. 16(6):1329-1340.
- (384) Malavasi, B. et.al. (1994) *Simple, rapid and specific identification and quantification of a metabolite of alpidem, a new imidazopyridine anxiolytic, in human urine, by direct injection into HPLC column with fluorescence detection.* Clin. Pharmacol. Ther. 17(2):419-432.
- (385) Tateishi, T. et.al. (1994) *Fluorescence detection of mexiletine and its p-hydroxylated human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using post-column derivatization with o-phthalaldehyde.* Clin. Pharmacol. Ther. 17(3):659-671.
- (386) Silvestro, L. et.al. (1992) *High performance liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of oligosaccharides from enzymatic digestion of glycosaminoglycans.* J. Chrom. 591:225-232.
- (387) Beyer, C. (1993) *Creatine measurement in serum and urine with an automated enzymatic method.* Clin. Chem. 39(8):1613-1619.
- (388) Birkett, D.J. et.al. (1980) *Fluorescent probe studies of albumin binding sites.* Acta Pharm. Suec. 17(2):78
- (389) Jim, L.K. et.al. (1992) *A simple high-performance liquid chromatographic assay for ciprofloxacin in human serum.* J. Clin. Pharmacy Ther. 17(2):111-116.
- (390) Stiff, D.D. et.al. (1992) *High-performance liquid chromatographic analysis of etoposide in plasma using fluorescence detection.* J. Liq. Chrom. 15(5):863-874.
- (391) *Communications: Precaution in use of high-pressure liquid chromatographic simultaneous plasma procainamida and N-acetylprocainamide determination.* (1979) J. Pharm. Sci. 68(4):532-534.
- (392) Aksnes, L. (1992) *A simplified high-performance liquid chromatographic method for the determination of vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human serum.* J. Clin. Lab. Invest. 52:57-63.
- (393) Blanchard, J. (1981) *Evaluation of relative efficacy of various techniques for desproteinizing plasma samples prior*

- to high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chrom.* 226:455-460.
- (394) Wollard, G.A. (1984) *Effect of precipitating agents on the analysis of metronidazole by high-performance liquid chromatography.* *J. Chrom.* 303:225-228.
- (395) Absel-Hay, M.H. and Gharaibeh, A.M. (1992) *High performance liquid chromatographic determination of floctatenic and its major metabolite, floctatenic acid in plasma.* *J. Clin. Pharm. Ther.* 17:31-35.
- (396) Wong, C-Y. et.al. (1992) *High-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen in pharmaceutical dosage forms and plasma.* *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1215-1225.
- (397) Augustijns, P. and Verbeke, N. (1992) *A microassay method for the determination of theophylline in biological samples using HPLC with electrochemical detection.* *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1303-1314.
- (398) Kato, Y. et.al. (1993) *Determination of erythromycin in human plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(3):661-680.
- (399) Yamakita, H. et.al. (1992) *Determination of N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) in rat and dog plasma by high-performance liquid chromatography.* *J. Liq. Chrom.* 15(1):83-100.
- (400) Griesemann, E. et.al. (1993) *Simple HPLC method for routine determination of urinary phenylacetic acid excretion.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(3):733-741.
- (401) Gocool, P. et.al. (1987) *Behavior of solute adsorbed at the liquid-liquid interface during solvent extraction with porous-membrane phase separators.* *Anal. Chem.* 59:2-7.
- (402) Snyder, L.R. (1978) *Classification of the solvent properties of common liquids.* *J. Chrom. Sci.* 16:223-234.
- (403) Svenaga, A. et.al. (1986) *Determination of pyridinolcarbamate and its metabolites in rabbit plasma and urine by liquid chromatography.* *Acta Pharm. Suec.* 23(4):245-252.
- (404) Metha, A.C. et.al. (1992) *High-performance liquid*

- chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma. J. Clin. Pharm. Ther.* 17:117-120.
- (405) Bouquet, S. et.al. (1992) *Sensitive determination in plasma of imipramine and desipramine by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. J. Liq. Chrom.* 15(9):1993-2004.
- (406) Hammad, M. et.al. (1992) *A fast HPLC analysis of cholesterol and cholesteryl esters in avian plasma. J. Liq. Chrom.* 15(9):2005-2014.
- (407) Washington, B. et.al. (1993) *Application of a novel technique: the determination of histamine content of urine, brain, and cerebral spinal fluid. Clin. Pharmacol. Ther.* 16(5):1198-1202.
- (408) Cappani, et.al. (1985) *Liquid chromatographic assay for fluoxymesterone in human serum with application to a preliminary bioavailability study. J. Pharm. Sci.* 74(3):308-311.
- (409) Saleh, M.I. and Loh, H.K. (1993) *Liquid chromatographic assay of pyronaridine in plasma and blood. Anal. Chem. Acta* 282(3):559-564.
- (410) Psomas, J.E. and Fletouris, D.J. *Liquid chromatographic assay of xylazine in sheep and cattle plasma. J. Liq. Chrom.* 15(9):1543-1552.
- (411) Peng, et.al. (1985) *Quantitative liquid chromatographic determination of bromadoline and its N-demethylated metabolites in blood, plasma, serum and urine samples. J. Pharm. Sci.* 74(3):304-307.
- (412) Zoest, A.R. et.al. (1992) *Diltiazem: A sensitive HPLC assay and application to pharmacokinetic study. J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1277-1288.
- (413) Carlucci, G. et.al. (1993) *Human plasma and aqueous humor determination of imipenem by liquid chromatography with ultraviolet detection. Clin. Pharmacol. Ther.* 16(11):2347-2358.
- (414) Parkin, J.E. (1993) *Salting-out solvent extraction for pre-concentration of benzalkonium chloride prior to high*

- performance liquid chromatography. J. Chrom. 635(1):75-80.*
- (415) Agudo, M. et.al. (1993) *Continuous liquid-liquid extraction for preconcentration with on-line monitoring. Anal. Chem. 65(20):2941-2943.*
- (416) Wyss, R. and Erdin, F. (1992) *Use of direct injection precolumn techniques for the high-performance liquid chromatographic determination of the retinoids acitretin and 13-cis-acitretin in plasma. J. Chrom. 593:55-62.*
- (417) Moulin, A. et.al. (1992) *High performance liquid chromatographic determination of arotinolol and AC623 its main metabolite in biological samples. J. Liq. Chrom. 15(1):151-164.*
- (418) Papadoyannis, I.N. et.al. (1993) *Comparative study of different solid-phase extraction cartridges in the simultaneous RP-HPLC analysis of morphine and codeine in biological fluids. Clin. Pharmacol. Ther. 16(14):3017-3040.*
- (419) Carlucci, G. et.al. (1992) *Determination of tenoxicam in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Liq. Chrom. 15(4):883-896.*
- (420) Sun, J.J. and Fritz, J.S. (1992) *Chemically modified resins for solid-phase extraction. J. Chrom. 590:197-202.*
- (421) Chang, R.R. et.al. (1990) *Bioaccumulation of PCDDs and PCDFs in food animals III: A rapid cleanup of biological materials using reverse phase adsorbent columns. Chemosphere. 20(7-9):881-886.*
- (422) Bloque, G. (1992) *Concurrent C₁₈ solid phase extraction of platelet activating factor (PAF) and arachidonic acid metabolites. J. Liq. Chrom. 15(6-7):1249-1258.*
- (423) Buszewski, B. et.al. (1992) *The influence of packing properties on the isolation of rutin from plants and drugs using solid phase extraction. J. Liq. Chrom. 15(11):1967-1970.*
- (424) Crowe, T.D. and Jacobsen, D.W. (1992) *Rapid solid-phase extraction of dopamine, serotonin and their acidic*

- metabolites for high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Liq. Chrom.* 15(2):221-230.
- (425) Szumilo, H. and Dzido, T. (1992) *Demonstration of tryptamide and its metabolites with solid phase extraction TLC and HPLC in rats.* *J. Liq. Chrom.* 15(2):337-350.
- (426) Daniels, R. (1993) *Mediated adsorption of drug molecules onto solid surfaces and the prediction thereof by a chromatographic technique.* *Archiv. Der Pharmazie* 326(2):97-100.
- (427) Hsu, C-Y. L. and Walters, R.R. (1993) *Optimization of sample application conditions for solid-phase extractions columns.* *J. Chrom.* 629(1):61-66.
- (428) Horil, S. (1994) *Liquid chromatographic determination of oxytetracycline and chlortetracycline residues in animal tissues.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 17(1):213-221.
- (429) Husek, Alés, et.al. (1993) *High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine A in human skin.* *Archiv. Der Pharmazie.* 326(6):365-368.
- (430) Chang, R.R. et.al. (1993) *Sample cleanup by solid-phase extraction for the ultratrace determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in biological samples.* *Anal. Chem.* 65(18):2420-2427.
- (431) Ise, N. et.al. (1993) *Determination of bicazamycin and its benzoyl ester determinative in yellowtail tissues by high performance liquid chromatography.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(11):2399-2414.
- (432) Ramos, M. et.al. (1993) *Determination of chloramphenicol in chicken muscle by high performance liquid chromatography and UV-diode array detection.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 17(2):385-401.
- (433) Güldütuna, S. et.al. (1993) *High performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum, liver biopsies, bile, gastric juice and faeces by fluorescence labeling.* *Clin. Chim. Acta.* 214(1):195-207. -207.

- (434) Degroodt, J.M. et.al. (1993) *Multiresidue analysis of tetracyclines in kidney by HPLC and photodiode array detection.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(16):3515-3530.
- (435) Zhong, W.Z. (1993) *Application of solid-phase extraction in the determination of U-8227 in rat serum, urine and brain.* J. Chrom. 629(1):83-88.
- (436) Hagen, L. et.al. (1993) *Plasma and urinary oxalate and glycolate in healthy subjects.* Clin. Chem. 39(1):134-138.
- (437) Schramm, W. et.al. (1993) *Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine.* Clin. Chem. 39(3):481-487.
- (438) Lee, B-L. et.al. (1993) *Urinary trans,trans-muconic acid determined by liquid chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure.* Clin. Chem. 39(9):1788-1792.
- (439) Campins-Falcó, P. et.al. (1993) *Determination of caffeine in human urine samples free of the interference of its metabolites by reversed-phase liquid chromatography using solid-phase extraction from sample clean-up.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(6):1297-1314.
- (440) Campins-Falcó, P. et.al. (1993) *Simple and sensitive reversed-phase liquid chromatographic assay for analysis of chlorthalidone in urine.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(12):2571-2581.
- (441) Rop, P.P. et.al. (1993) *Liquid chromatographic analysis of cocaine, benzoylecgonine, local anesthetic agents and some of their metabolites in biological fluids.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(13):2797-2811.
- (442) Saarinen, M. et.al. (1993) *A column switching technique for the screening of diuretics in urine by high performance liquid chromatography.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(18):4063-4078.
- (443) Zhong, W.Z. (1993) *High performance liquid chromatographic method for the determination of dimethindene in urine.* J. Chrom. 629(1):89-93.
- (444) Chopineau, J. et.al. (1994) *Determination of tamazepam and its active metabolite, oxazepam in plasma, urine and*

- dialysate using high performance liquid chromatography. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17(2):373-383.
- (445) Papadoyannis, I.N. et.al. (1993) *A simple and quick solid phase extraction and reversed phase HPLC analysis of some tropane alkaloids in feedstuffs and biological samples.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(5):975-998.
- (446) Spraul, M. et.al. (1993) *High performance liquid chromatography coupled to high-field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: Application to urinary metabolites of ibuprofen.* *Anal. Chem.* 65(4):327-330.
- (447) Ikegawa, S. et.al. (1994) *Separatory determination of biliary metabolites of equilin in rat by high-performance liquid chromatography.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 17(1):223-239.
- (448) Schad, H. et.al. (1992) *Demonstration benzene metabolites in urine of mice by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.* *J. Chrom.* 593:147-151.
- (449) Wood, S.A. (1992) *A sensitive high performance liquid-chromatographic method for U-80, 278A, a substituted aminotetralin in rat plasma, whole blood and brain tissue.* *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1227-1248.
- (450) Pivnichny et.al. (1987) *A robotic sample preparation scheme for the high performance liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma.* *J. Chrom. Sci.* 25:181-186.
- (451) Schöneshöfe, M. and Fener, A. (1981) *A convenient and efficient method for the extraction and fractionation of steroid hormones from serum or urine.* *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19:71-75.
- (452) Chollet, C. and Salanon, M. (1992) *Determination of 2 and 17 β r7B in plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with automated pre-column exchange.* *J. Chrom.* 593:73-78.
- (453) Ahmad, N. et.al. (1988) *Cleanup of biological extracts by a Pasteur pipette column and a comparison of in vivo-accumulated chlorinated pesticide residues with other clean up systems.* *J. Environ. Sci. Health. Part B.*

B23(1):69-83.

- (454) Gilbert, R.S. et.al. (1991) *An ion-exchange chromatography procedure for the isolation and concentration of basic amino acids and polyamines from complex biological samples prior to high-performance liquid chromatography.* Anal. Biochem. 199(1):86-92.
- (455) Shantani, H. (1992) *Solid-phase extraction (SPE) and HPLC analysis of toxic compounds and comparison of SPE and liquid-liquid extraction. I. Analysis of 4-4'-methylenedianiline in serum. II. Analysis of the components of dental materials.* J. Liq. Chrom. 15(6-7):1315-1336.
- (456) Soares, M.E. et.al. (1992) *Comparative study of different extractive procedures to quantify morphine in urine by HPLC-UV.* J. Liq. Chrom. 15(9):1533-1542.
- (457) Swart, K.J. and Aapgis, M. (1992) *Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in plasma.* J. Chrom. 593:15-20.
- (458) Jhonson, E.L. (1988) *Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis.* J. Chrom. Sci. 26: 372-379.
- (459) Shimada, et.al. (1984) *Determination of a new antihypertensive agent (2R,4R)-2-(2-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid in blood by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* J. Pharm. Sci. 73(1):119-121.
- (460) Lawrence, J.F. (1985) *Advantages and limitations of chemical derivatization for trace analysis by liquid chromatography.* J. Chrom. Sci. 23:484-487.
- (461) Sterson, L.A. et.al. (1988) *Chemical derivatization as a strategy to enhance detectability of agents used in cancer management.* J. Pharm. Biomed. Anal. 6(6-8):657-668.
- (462) Baffi, F. et.al. (1992) *Study of reversed-phase C₁₈-silica in liquid chromatography for the determination of free dissolved*

- amino acids and copper (II)-aminoacids complexes at the picomole level in marine matrices. *Anal. Chim. Acta* 260(1):99-106.
- (463) Fermo, I. et.al. (1992) High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of total homocysteine in plasma. *J. Chrom.* 593:171-175.
- (464) Saito, K. et.al. (1992) High-performance liquid chromatography of histamine and *N*-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *J. Chrom.* 595:163-167.
- (465) Lee, B.L. et.al. (1992) Determination of beta-amino-isobutyric acid in urine and serum using pre-column derivatization technique. *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1351-1360.
- (466) Alaiz, M. et.al. (1992) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylene manolate. *J. Chrom.* 591:181-186.
- (467) Rhodes, G.R. and Boppana V.K. (1988) High-performance liquid chromatographic analysis of arginine-containing peptides in biological fluids by means of a selective post-column reaction with fluorescence detection. *J. Chrom.* 444:123-131.
- (468) Baffi, F. et.al. (1993) Comparison of the performance of RP C₁₈ on silica and polymeric supports for the liquid chromatographic separation of metal-amino acid complexes with post-column derivatization. *Anal. Chem. Acta* 278(1):71-81.
- (469) Miller-Stein, C. et.al. (1993) Column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of SK&F 106203 in human plasma after fluorescence derivatization with 9-anthryldiazomethane. *J. Chrom.* 631(1-2):233-240.
- (470) Nakanishi, A. et.al. (1992) 3-bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one as a high sensitive fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 591:159-164.

- (471) Lau-Cam, C.A. and Roos, R.W. (1993) Assay of aminocaproic acid in dosage forms by reversed phase high performance liquid chromatography with dansylation. *J. Liq. Chrom.* 16(2):403-419.
- (472) Schneede, J. and Veland, P.M. (1992) Formation in an aqueous matrix and properties and chromatographic behavior of *r*-pyrenyldiazomethane derivatives of methylmalonic acid and other short-chain dicarboxylic acids. *Anal. Chem.* 64(3):315-319.
- (473) Anelli, P.L. (1992) Optical resolution of 2-chloro-3-phenylmethoxypropanoic acid after derivatization with (*s*)-2-octanol by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 589:346-348.
- (474) Nicoll-Griffith, D. et.al. (1993) Automated derivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of ibuprofen enantiomers. *J. Chrom.* 653(2):253-259.
- (475) Mascher, H. (1993) Determination of total pyridoxal in human plasma following oral administration of vitamin B₆ by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J. Pharm. Sci.* 82(9):972-974.
- (476) Brown and Carpenter (1980) Comparison of two high-pressure liquid chromatographic assay for carboprost a synthetic prostaglandin. *J. Pharm. Sci.* 69(12):1396-1399.
- (477) Heldin, E. (1991) Tartaric acid derivatives as chiral selectors in liquid chromatography. *Acta Pharm. Nord.* 3(3):188.
- (478) Potts, B.D. and Parli, C.J. (1992) Analysis of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine in plasma and tissue using chiral derivatization and normal-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chrom.* 15(4):685-682.
- (479) Toyooka, T. et.al. (1993) Further studies on the resolution of carboxylic acid enantiomers by laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem. Acta* 278(1):71-81.
- (480) Kondo, J. et.al. (1993) Fluorescence derivatization reagent for resolution of carboxylic acid enantiomers by

- high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 645(1):75-81.
- (481) Zakhari, N.A. (1991) Spectrophotometric determination of ergot alkaloids with ninhydrin. *Acta Pharm. Nord.* 3(3):151-154.
- (482) Lawrence, J.F. (1979) Fluorimetric derivatization in high performance liquid chromatographic. *J. Chrom. Sci.* 17:147-151.
- (483) Moret et.al. (1992) Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination. *J. Chrom.* 591:175-180.
- (484) Wang, Z. (1992) Sensitive fluorescence detection of some nitrosamines by precolumn derivatization with dansylchloride and high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 589:349-352.
- (485) Karlsson, K-E. and Hartuig, P. (1981) Two-phase derivatization of tertiary amines. *Acta Pharm. Suec.* 18(4):193-204.
- (486) Lars, H. et.al. (1981) Quantitation of non-UV-absorbing ions by ion-pair chromatography. *Acta Pharm. Suec.* 18(4):257-282 (Parte 1 y 2).
- (487) Karlsson, K-E. (1981) Two-phase derivatization of tertiary amines. *Acta Pharm. Suec.* 18(5):337-348.
- (488) Karlsson, K-E. and Hartuig, P. (1980) Two-phase derivatization of tertiary amines. *Acta Pharm. Suec.* 17(4):249-261.
- (489) Gao, C-X. et.al. (1989) Polymeric activated ester reagents for off-line and on-line derivatizations of amine nucleophiles in high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Anal. Chem.* 61:1538-1548.
- (490) Husain, P.A. et.al. (1993) HPLC-based method for determination of absolute configuration of α -chiral amines. *Anal. Chem.* 65(10):1456-1461.
- (491) Olof, E.P. et.al. (1984) Determination of artesunate of

- dihydroartemisinin* in plasma by liquid chromatography with post-column derivatization and UV-detection. *Acta Pharm. Suec.* 21(4):223-234.
- (492) Favaro, G. et.al. (1993) *Liquid chromatographic determination of non-volatile nitrosamines by post-column redox reactions and voltametric detection at solid electrodes. Study of a flow reactor system based on Ce(IV) reagent.* *Anal. Chem. Acta* 273(1-2):443-447.
- (493) Sachetto, G.A. et.al. (1992) *Liquid chromatographic determination of non-volatile nitrosamines by post-column redox reactions and voltametric detection at solid electrodes. Behaviour of the Ce(IV)-Ce(III) couple at gold, platinum and glassy carbon electrodes and suitability of the Ce(IV) reagent.* *Anal. Chem. Acta* 258(1):99-108.
- (494) Caturia, M.C. and Cusido E. (1992) *High-performance liquid chromatography method for the determination of aminoglycosides based on automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde.* *J. Chrom.* 593:69-72.
- (495) Simpson, R.C. et.al. (1993) *Determination of oxiracetam in human plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorimetric detection.* *J. Chrom.* 631(1-2):227-232.
- (496) Loftsson, T. et.al. (1991) *Solubilization and stabilization of drugs through cyclodextrin complexation.* *Acta Pharm. Nord.* 3(4):215-217.
- (497) Føjglóvá, Z. et.al. (1993) *Microbore HPLC determination of polyether antibiotics using post-column derivatization with benzaldehyde reagents.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 17(2):359-372.
- (498) Meader, G. et.al. (1992) *Determination of amphetamines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. On-line pre-column derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and preconcentration.* *J. Chrom.* 593:9-14.
- (499) Miller, R.B. and Guertin, Y. (1992) *High-performance liquid chromatographic assay for the derivatized enantiomers of*

- atenolol in whole blood. *J. Liq. Chrom.* 15(6-7):1289-1302.
- (500) Boppana, V.K. et.al. (1992) *High-performance liquid chromatographic determination of monohydroxy compounds by a combination of pre-column derivatization and post-column reaction detection.* *J. Chrom.* 593:29-36.
- (501) Williams T. and Barnet, N.N. (1992) *Determination of magnesium and calcium by ion chromatography with post-column reaction fluorescence detection.* *Anal. Chim. Acta* 259(1):14-23.
- (502) Del Nozal, M.J. et.al. (1993) *Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole) as a reagent for post-column derivatization of neutral monosaccharides in high pressure liquid chromatography.* *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(5):1105-1116.
- (503) Cohen, A.F. (1993) *The bioavailability of digoxin from three oral formulations measured by a specific HPLC assay.* *Br. J. Clin. Pharmac.* 35(2):128-135.
- (504) Akasaka, K. (1992) *High-performance liquid chromatography and post-column derivatization with diphenyl-*r*-pyrenylphosphine for fluorimetric determination of triacylglycerol.* *J. Chrom.* 596:197-201.
- (505) Piš, J. and Harmatha, J. (1992) *Phenylboronic acid as a versatile derivatization agent for chromatography of ecdysteroids.* *J. Chrom.* 596:271-274.
- (506) Handelman, G.J. et.al. (1993) *An improved protocol for determining ratios of retinol- d_4 to retinol isolated from human plasma.* *Anal. Chem.* 65(15):2024-2028.
- (507) Ahuja, S. (1979) *Chemical derivatization for the liquid chromatography of compound of pharmaceutical interest.* *J. Chrom. Sci.* 17:168-172.
- (508) Riley, C.M. (1988) *Bioanalysis of cisplatin analoges. A selective review.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6(6-8):869-876.
- (509) Aycard, M. et.al. (1992) *Determination of (R) and (S) warfarin in plasma by high performance liquid column chromatography using precolumn derivatization.* *J. Liq. Chrom.*

15(11):2175-2182.

- (510) Kubo, H. et.al. (1993) *Fluorometric determination of indomethacin in serum by high performance liquid chromatography using in-line oxidation with hydrogen peroxide.* J. Liq. Chrom. 16(2):465-474.
- (511) Al-Rawithi, S. et.al. (1993) *Determination of acrolein in urine by liquid chromatography and fluorescence detection of its quinoline derivative.* Pharm. Research 10(11):1587-1590.
- (512) Franklin, M. (1992) *Determination of m-ethyl-o-phenylpiperazine in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection.* J. Liq. Chrom. 15(9):1553-1564.
- (513) Eriksson, B-M. (1990) *Assay of catecholamines and related compounds in biological samples with emphasis on liquid chromatography and electrochemical detection.* Acta Pharm. Nord. 1(2):62.
- (514) Welch, K.J. and Hoffman, N.E. (1992) *Physico-chemical properties of electron-acceptor stationary phases in liquid chromatography.* J. Chrom. 591:75-88.
- (515) Mogele, R. et.al. (1992) *Determination of organic acids, amino acids and saccharides by high-performance liquid chromatography and a post-column enzyme reactor with amperometric detection.* J. Chrom. 591:165-173.
- (516) Kissinger, P.T. et.al. (1979) *The potential utility of pre- and post-column chemical reactions with electrochemical detection in liquid chromatography.* J. Chrom. Sci. 17:137-146.
- (517) Allam, K. et.al. (1992) *Derivatization in trace organic analysis: Selection of an inert solvent.* Anal. Chem. 64(2):238-239.
- (518) Knaap, D.R. (1979) *Handbook of analytical derivatization reactions.* Jhon Wiley and Sons. E.U.A. 1979.
- (519) Mellini, D.W. et.al. (1993) *Determination of the caffeine metabolite AFMU in human urine by column switching HPLC.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(6):1419-1426.

- (520) Konishi and Hashimoto (1990) *On-line clean-up system of plasma sample for simultaneous determination of morphine and its metabolites in cancer patients by high-performance liquid chromatography.* J. Pharm. Sci. 79(5):379-383.
- (521) Daoud, N. (1987) *Reversed-phase LC systems for direct injection of untreated blood plasma samples.* Acta Pharm. Suec. 24(1):39.
- (522) Daoud, N. et.al. (1986) *Determination of drugs by direct injection of untreated blood plasma on reversed phase liquid chromatographic columns. Application to some antiepileptic drugs.* Acta Pharm. Suec. 23(2):65-76.
- (523) Villaseñor, S.R. (1992) *Matrix elimination in ion chromatography by "heart-cut" column-switching techniques.* J. Chrom. 602:155-161.
- (524) Veals and Lin (1988) *Development of column-switching HPLC methods for drug analysis in biological fluids.* Amer. Lab. 4:(42-47).
- (525) Koenigbauer and Majors (1990) *Sample cleanup in high performance liquid chromatography using on-line multidimensional techniques.* LC.GC 8(7):510-514.
- (526) Nam, K.S. et.al. (1990) *Supercritical fluid extraction and cleanup procedures for determination of xenobiotics in biological samples.* Chemosphere 20(7-9):873-880.
- (527) Thomson, C.A. and Chesney, D.J. (1992) *Supercritical carbon dioxide extraction of 2,4-dichlorophenol from food crop tissues.* Anal. Chem. 64(8):848-853.
- (528) Oostdyk, T.S. et.al. (1993) *Study of sonication and supercritical fluid extraction of primary aromatic amines.* Anal. Chem. 65(5):596-600.
- (529) Budford, M.D. et.al. (1993) *Extraction rates of spiked versus native PAHs from heterogenous environmental samples using supercritical fluid extraction and sonication in methylene chloride.* Anal. Chem. 65(11):1497-1505.
- (530) Alexandrov, N. et.al. (1992) *Cleanup of complex organic mixtures using supercritical fluids and selective adsorbents.*

- Anal. Chem. 64(3):301-311.
- (531) Berger, T.A. and Deye, J.F. (1992) *Correlation between column surface area and retention of polar solutes in packed-column supercritical fluid chromatography.* J. Chrom. 594:291-295.
- (532) Burford, M.D. et.al. (1993) *Construction of a robust stainless-steel clad fused-silica restrictor for use in supercritical fluid extraction.* J. Chrom. 648(2):445-449.
- (533) Mulcahey, L.J. and Taylor L.T. (1992) *Supercritical fluid extraction of active components in a drug formulation.* Anal. Chem. 64(9):981-984.
- (534) Laintz, K.E. et.al. (1992) *Separation of metal ions with sodium bis(trifluoroethyl)dithiocarbamate chelation and supercritical liquid chromatography.* Anal. Chem. 64(3):311-315.
- (535) Liu, H. et.al. (1992) *Combined supercritical fluid extraction/solid-phase extraction with octadecylsilane cartridges as a sample preparation technique for the ultratrace analysis of a drug metabolite in plasma.* Anal. Chem. 64(7):802-806.
- (536) Chester, T.L. et.al. (1992) *Supercritical fluid chromatography and extraction.* Anal. Chem. 64(12):163R-170R.
- (537) Nomura, A. (1993) *Supercritical fluid chromatographic determination of cholesterol and cholesteryl esters in serum on ODS-silica gel.* Anal. Chem. 65(15):1994-1997.
- (538) Shim, J-H. et.al. (1993) *Boronic esters as derivatives for supercritical fluid chromatography of ecdysteroids.* J. Chrom. 639(2):281-285.
- (539) Howard, A.L. and Taylor, L.T. (1993) *Use packed column supercritical fluid chromatography with ozone-based sulfur chemiluminescence detection.* Anal. Chem. 65(6):724-729.
- (540) Jagota, N.K. and Stewart, J.T. (1992) *Analysis of diazepam and clordiazepoxide and their related compounds using supercritical fluid chromatography.* J. Liq. Chrom. 15(11):2429-2444.
- (541) Kirschner, C.H. and Taylor, L.T. (1993) *Quantitative analysis*

- by on-line supercritical fluid extraction/Fourier transform infrared spectrometry. Anal. Chem. 65(1):78-83.
- (542) Langenfeld, J.J. et.al. (1993) *Effects of temperature and pressure on supercritical fluid extraction efficiencies on polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls.* Anal. Chem. 65(4):338-344.
- (543) Miller, D.J. et.al. (1993) *Solventless collection of analytes by rapid depressurization after static supercritical fluid extraction.* Anal. Chem. 65(8):1038-1042.
- (544) Berger, T.A. and Wilson, W.H. (1993) *Packed column supercritical fluid chromatography with 220000 plates.* Anal. Chem. 65(10):1451-1455.
- (545) Fahmy, T.M. et.al. (1993) *Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials.* Anal. Chem. 65(10):1462-1469.
- (546) Küppers, S. et. al. (1993) *Influence of linear velocity and multigradient programming in supercritical fluid chromatography.* J. Chrom. 629(2):345-359.
- (547) Page, S.H. et.al. (1993) *Rapid method for the determination of phase behavior of fluid mixtures employed in supercritical fluid experiments.* Anal. Chem. 65(10):1493-1495.
- (548) Raynie, D.E. (1993) *Warning concerning the use of nitrous oxide in supercritical fluid extractions.* Anal. Chem. 65(21):3127-3128.
- (549) Carretero, I. et.al. (1992) *Detection of banned drugs in sport by micellar liquid chromatography.* Anal. Chem. Acta 259(1):203-210.
- (550) Macka, M. et.al. (1993) *Determination of acyclovir in blood serum and plasma by micellar liquid chromatography with fluorimetric detection.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(11):2359-2366.
- (551) Carretero, I. et.al. (1993) *Determination of dipyrene metabolites in human plasma by micellar liquid chromatography.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(13):2767-2776.
- (552) Torres-Lapasió, J.R. et.al. (1993) *Modelling of the retention*

- behavior of solutes in micellar liquid chromatography with organic modifiers. *J. Chrom.* 639(2):87-96.
- (553) García, M.A. et.al. (1993) Optimization of the separation selectivity of a group of benzene and naphthalene derivatives in micellar high-performance liquid chromatography using a C_{18} column and alcohols as modifiers in the mobile phase. *J. Chrom.* 646(2):297-305.
- (554) Posluszny and Weinberger (1988) Determination of drug substances in biological fluids by direct injection multidimensional liquid chromatography with a micellar cleanup and reversed-phase chromatography. *Anal. Chem.* 60:1953-1958.
- (555) Amin, M. et.al. (1993) Determination of steroids in urine by micellar HPLC with detection by sensitized terbium fluorescence. *Anal. Chem.* 65(17):2346-2351.
- (556) Li, Y-M. et.al. (1993) Use of micellar mobile phases and an HPLC column switching systems for direct injection determination of urinary free cortisol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(12):2583-2599.
- (557) Jimenez Vargas, E. (1990) Un acercamiento a la validación de los métodos analíticos. *Pharma News* 1(5):16-17.
- (558) *The United States Pharmacopeia (USP XXII)* (1990) E. U. A.
- (559) *Validación de métodos analíticos, guía del comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud.* (1990) Secretaría de Salubridad y Asistencia, México.
- (560) *Bioavailability studies in man.* (1990) Nordic Guidelines. Nordiska Lakemedelsnamnden. Nordic Council of Medicines. Upsala.
- (561) Fiskerstrand, T. et.al. (1993) Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin. Chem.* 39(2):263-271.
- (562) Guillame, Y. and Guinchard, C. (1993) Optimizing mobile phase composition, its flow rate and column temperature in HPLC using an experimental dosing assisted with a simplex method.

- Clin. Pharmacol. Ther. 16(16):3457-3470.
- (563) Bermejo, B. (1989) *Laboratorios químicos y biológicos*. Blumej Labor, 3a.ed. España.
- (564) *Prudent practices for disposal of chemicals from laboratories*. (1983) National Academy Press, E.U.A.
- (565) Tsanaclis, L.M. and Wilson, J.F. (1993) *Intra- and interlaboratory sources of imprecision in drug measurements by different techniques*. Clin. Chem. 39(5):851-855.
- (566) Smith, S.J. et.al. (1993) *Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values*. Clin. Chem. 39(6):1012-1022.
- (567) Fraser, C.G. and Petersen P.H. (1993) *Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical need*. Clin. Chem. 39(7):1447-1455.
- (568) Metzler, C. (1989) *Bioavailability/bioequivalence: Study, design and statistical issues*. J. Clin. Pharm. 29:289-292.
- (569) Keenan, T.J. (1987) *Quality assurance of chemical measurements*. Lewis Publishers, E.U.A.
- (570) Wallnófer, A.E. and Cohen, A.F. (1993) *Good Clinical Practice: a question of balance*. Br. J. Clin. Pharmac. 35(5):449-450.
- (571) Strobel, H.A. (1974) *Instrumentación química*. Limusa, México.
- (572) Willard, H.H. et.al. (1984) *Métodos instrumentales de análisis*. Continental, México.
- (573) Skoog and West (1986) *Análisis instrumental*. Interamericana, México, 2a.ed.
- (574) Keller, H.R. (1993) *Window evolving factor analysis for assessment of peak homogeneity in liquid chromatography*. Anal. Chem. 65(4):471-475.
- (575) Shi, W. and Davis, J.M. (1993) *Test of theory of overlap for two-dimensional separations by computer simulations of three-dimensional concentration profiles*. Anal. Chem. 64(4):482-492.

- (576) Herman, F.L. (1993) *Tandem detectors to quantitate overlapping chromatographic peaks.* Anal. Chem. 65(8):1023-1027.
- (577) Li, J. and Pardue, H.L. (1993) *Development and evaluation of an error-compensating predictive data-processing method for liquid chromatography.* Anal. Chem. 65(15):1980-1987.
- (578) Koskinen, M.O. and Koskinen, L.K. (1993) *Numerical integration of complex chromatograms using fitted Gaussian functions.* Clin. Pharmacol. Ther. 16(15):3171-3184.
- (579) Bello, G. (1990) *La cromatografía líquida de alta resolución.* Pharma News 1(5):28-32.
- (580) Connor, K.A. (1981) *Análisis farmacéutico.* Reverté, España.
- (581) Pietrzyk, D. and Frank, C. (1983) *Química analítica.* Interamericana, México, 2a.ed.
- (582) Yamauchi, S. (1993) *Retention indices of phenols for internal standards in reversed-phase high-performance liquid chromatography. Application to retention prediction and selectivities of mobile phases and packing materials.* J. Chrom. 635(1):61-70.
- (583) Kennedy, J. (1980) *Analytical chemistry.* H.B.J., E.U.A.
- (584) Peckson, R.L. et.al. (1976) *Modern methods of chemical analysis.* Jhon Wiley and Sons, E.U.A.
- (585) Robinson, K.A. (1983) *Chemical Analysis.* Little Brown, E.U.A.
- (586) Millipore (1992) *A new high reliability/precision autosampler for HPLC.* Pharma News 3(2):31-34, -34.
- (587) Wikström, M. (1992) *Computer simulation of weak affinity chromatography.* J. Chrom. 597:83-91.
- (588) Bishop, J. and Nix, A.B.J. (1993) *Comparison of quality control rules used in clinical chemistry laboratories.* Clin. Chem. 39(8):1638-1649.
- (589) Groth, T. and DeVerdier, C-H. (1993) *Analytical quality goals and assessment to ensure transferability of laboratory results.* Clin. Chim. Acta 222(1-2):129-139.
- (590) Brown, S.F. et.al. (1993) *Software for portable scientific data management.* Computers in physics. Clin. Chim. Acta

7(3):304-308.

- (591) Bredberg, U. (1991) *Validation of a new method for estimation of drug absorption-computer simulations an in vivo applications.* Acta Pharm. Nord. 3(3):187-188.
- (592) *Guidelines for hospital laboratory computer systems.* (1993) Clin. Chim. Acta 222(1-2):147-171.
- (593) Gunter, B.H. (1993) *How statistical design concepts can improve experimentation in the physical sciences.* Clin. Chim. Acta 7(3):262-273.
- (594) Chloupek, R.C. and Hancock, W.S. (1992) *Computer simulation as a tool for the rapid optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of a tryptic digest of human growth hormone.* J. Chrom. 594:65-73.
- (595) Wieling, J. (1992) *Selection of robust combinations of extraction liquid composition and internal standard. Monte Carlo simulation of improvement of assay methods with liquid-liquid extraction prior to high-performance liquid chromatography.* J. Chrom. 594:45-63.
- (596) Karlsson, M.O. (1989) *Novel methods for estimation of ligand binding kinetics and drug absorption.* Acta Pharm. Nord. 1(6):372.
- (597) Semple, H.A. et al. (1990) *A computer simulation of the food effect: Transient changes in hepatic blood flow and Michaelis-Menten parameters as mediators of hepatic first pass metabolism and bioavailability of propranolol.* Biopharm. Drug Disp. 11(1):61-76.
- (598) Toreen, E.C. and Egger, A. (1978) *Computers in the clinical laboratory.* Dekker, E.U.A.
- (599) Niazi, S. (1979) *Textbook of biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.* U.S.A., Appleton-Century-Crofts.
- (600) Garcia, C.R. (1980) *Análisis e interpretación de datos. Bioequivalencia.* México, Farmetrix.