

63
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE
LIMPIEZA POR EXTRACCION EN FASE SOLIDA.
ENSAYOS PARA FUROSEMIDA SULFAMETOXAZOL,
TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION EN ORINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
RAUL RODRIGUEZ MIRANDA**

ASESOR: O.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADEZCO INFINITAMENTE A DIOS Y A MI MADRE q.p.d. POR LA VIDA QUE ME
DIERON, TAMBIEN AGRADEZCO QUE ME HAYAN EDUCADO CON AMOR, CARIÑO
Y RESPETO Y QUE ME HAYAN ENSEÑADO AMAR LA VIDA Y A MIS
SEMEJANTES.

**AGRADEZCO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO.**

**AGRADEZCO A MI ESPOSA MARTITA POR SU APOYO Y
COMPRESION.**

**DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO
DE LIMPIEZA POR EXTRACCION EN
FASE SOLIDA. ENSAYOS PARA
FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL,
TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION.**

CONTENIDO

CONTENIDO

INTRODUCCION

OBJETIVOS

I	MARCO TEORICO	1
1.1.	RESUMEN DE LAS TECNICAS MAS COMUNES PARA EL TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	2
1.1.1.	PRECIPITACION O DENATURALIZACION DE PROTEINAS	2
1.1.2.	ULTRAFILTRACION	3
1.1.3.	DIALISIS	3
1.1.4.	LIOFILIZACION	3
1.1.5.	SAPONIFICACION	4
1.1.6.	DILUCION	4
1.1.7.	EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO	4
1.1.8.	HIDROLISIS DE CONJUGADOS	5
1.1.9.	HOMOGENIZACION	5
1.1.10.	DERIVATIZACION QUIMICA	6
1.1.11.	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TECNICAS MAS COMUNES PARA EL TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	7
1.2.	TECNICAS FUTURAS PARA LA PREPARACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	8
1.2.1.	EXTRACCION POR FLUIDOS SUPER CRITICOS	8
1.2.2.	MICELAS	8
1.2.3.	AFINIDAD CROMATOGRÁFICA DE ALTA RESOLUCION	9
1.2.4.	INMUNOEXTRACCION	9
1.2.5.	MICRO-ONDAS	9
1.3.	EXTRACCION EN FASE SOLIDA (EFS)	10
1.3.1.	DEFINICION	11
1.3.2.	APLICACION	12
1.3.3.	MATERIALES	13
1.3.4.	COMO TRAHAJA LA EFS	17

1.4	PROPIEDADES GENERALES DE FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO	19
1.4.1	FUROSEMIDA	19
1.4.1.1	NOMBRE QUIMICO	19
1.4.1.2	FORMULA CONDENSADA	19
1.4.1.3	CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA	19
1.4.1.4	ACCION FARMACOLOGICA	19
1.4.1.5	MECANISMO DE ACCION	19
1.4.1.6	APARIENCIA, OLORES, SABOR Y SOLUBILIDAD	19
1.4.1.7	ESPECTRO ULTRAVIOLETA	19
1.4.1.8	PRINCIPALES METABOLITOS	19
1.4.1.9	METODOS DE ANALISIS	21
1.4.2	SULFAMETOXAZOL	22
1.4.2.1	NOMBRE QUIMICO	22
1.4.2.2	FORMULA CONDENSADA	22
1.4.2.3	CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA	22
1.4.2.4	ACCION FARMACOLOGICA	22
1.4.2.5	MECANISMO DE ACCION	22
1.4.2.6	APARIENCIA Y SOLUBILIDAD	22
1.4.2.7	ESPECTRO ULTRAVIOLETA	22
1.4.2.8	PRINCIPALES METABOLITOS	24
1.4.2.9	METODOS DE ANALISIS	24
1.4.3	TRIMETOPRIM	25
1.4.3.1	NOMBRE QUIMICO	25
1.4.3.2	FORMULA CONDENSADA	25
1.4.3.3	CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA	25
1.4.3.4	ACCION FARMACOLOGICA	25
1.4.3.5	MECANISMO DE ACCION	25
1.4.3.6	APARIENCIA Y SOLUBILIDAD	25
1.4.3.7	ESPECTRO ULTRAVIOLETA	25
1.4.3.8	PRINCIPALES METABOLITOS	25
1.4.3.9	METODOS DE ANALISIS	27
1.4.4	ACIDO SALICILICO	28
1.4.4.1	NOMBRE QUIMICO	28
1.4.4.2	FORMULA CONDENSADA	28
1.4.4.3	CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA	28
1.4.4.4	ACCION FARMACOLOGICA	28
1.4.4.5	MECANISMO DE ACCION	28
1.4.4.6	SOLUBILIDAD	28
1.4.4.7	ESPECTRO ULTRAVIOLETA	28
1.4.4.8	PRINCIPALES METABOLITOS	28
1.4.4.9	METODOS DE ANALISIS	30

1.5.	CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	31
1.5.1	CROMATOGRAFIA. DEFINICION	31
1.5.2	CLASIFICACION	31
1.5.3	TERMINOS MAS EMPLEADOS EN CLAR	32
1.5.3.1	TIEMPO DE RETENCION	32
1.5.3.2	FACTOR DE CAPACIDAD	32
1.5.3.3	FACTOR DE SELECTIVIDAD	33
1.5.4	ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEP T)	33
1.5.4.1	NUMERO DE PLATOS TEORICOS	34
1.5.5	EFICIENCIA DE LA COLUMNA	35
1.5.6	ECUACION DE RESOLUCION	35
1.5.7	COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS	36
1.5.7.1	COLUMNA	36
1.5.7.2	BOMBA	36
1.5.7.3	DETECTOR	37
1.5.8	VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN CLAR	38
1.5.9.	ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO	39
II.	PARTE EXPERIMENTAL.	42
2.1.	REACTIVOS Y MATERIAL.	43
2.2.	EQUIPO	44
2.3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	45
2.3.1	DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA. LA ETAPA	45
2.3.2.	EVALUACION DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA 2A ETAPA	50
III.	RESULTADOS E INTERPRETACION	51
IV.	CONCLUSIONES	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	66

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los métodos de medición de la concentración de los fármacos y/o metabolitos en muestras biológicas, son cada vez más importantes. Problemas de biodisponibilidad, bioequivalencia, desarrollo e investigación, abuso de fármacos y farmacocinética clínica, dependen en gran medida de una metodología analítica biofarmacéutica confiable.

Sería una ventaja para nosotros si los fármacos en muestras biológicas, pudieran ser analizados sin antes haber realizado un pretratamiento o una limpieza de las mismas, sin embargo esto no es posible para algunas muestras como sangre u orina, por lo tanto se hace necesario una separación o aislamiento de los fármacos de interés mediante el tratamiento o limpieza previo al análisis final y, de esta manera obtener la selectividad y sensibilidad necesaria para detectar un componente particular.

Existe una gran variedad de técnicas útiles para la preparación de muestras biológicas. La PRECIPITACION DE PROTEINAS, es una técnica muy usada en la preparación de muestras sanguíneas, una de las principales ventajas es su rapidez y su eficiencia en la remoción de proteínas, la EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO es otra técnica utilizada con gran frecuencia para la preparación de muestras líquidas, algunas de sus ventajas son su especificidad y su rapidez, aunque presenta la desventaja de la formación de emulsiones que pueden provocar la pérdida del analito, obteniendo bajos recobros.

Otras técnicas de uso frecuente para la preparación de muestras biológicas incluyen, EXTRACCION EN FASE SOLIDA, DIALISIS, ULTRAFILTRACION, LIOFILIZACION, HOMOGENIZACION y DILUCION. Otras que tienen un uso más limitado pero que están surgiendo como técnicas para la preparación de muestras biológicas para análisis cualitativo y cuantitativo incluyen EXTRACCION POR FLUIDOS SUPERCRITICOS e INMUNOEXTRACCION.

El tratamiento previo de una muestra biológica es importante porque se eliminan o reducen considerablemente las posibles interferencias aumentando así la vida de precolumnas, columnas y detectores. Para elegir la técnica más adecuada debemos de considerar algunos factores, como la concentración del fármaco, sus propiedades físicas y químicas, propiedades y composición del material biológico y la especificidad requerida en el análisis.

En el presente estudio hacemos mención de las técnicas de uso más frecuente para la preparación de muestras biológicas, para análisis cualitativo y cuantitativo, indicando sus principales ventajas así como sus limitaciones, también hacemos mención de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como método de análisis instrumental.

En la segunda parte de este estudio desarrollamos un procedimiento de limpieza para muestras de orina mediante la técnica de Extracción en Fase Sólida, y lo aplicamos en la determinación de FUROSEMIDA, SULFAMIDOXAZOL, TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Los resultados nos indican que puede aplicarse el procedimiento de limpieza desarrollado mediante la técnica de EXTRACCION EN FASE SOLIDA para la cuantificación de Furosemida, Sulfametoxazol y Acido Salicílico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. No así para Trimetoprim, que es eliminado junto con las impurezas normales de la orina.

Por lo anterior consideramos que la EXTRACCION EN FASE SOLIDA es una técnica muy poderosa para la preparación rápida de muestras de orina para análisis químico cualitativo y cuantitativo.

OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar un procedimiento de limpieza de muestras de orina mediante la técnica de Extracción en Fase Sólida
- Aplicar el procedimiento desarrollado en la cuantificación de FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM y ACIDO SALICILICO por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

OBJETIVOS ESPECIFICOS :

- Desarrollar un procedimiento de limpieza que nos permita eliminar la mayor cantidad de impurezas presentes normalmente en muestras de orina (hombre adulto) mediante micolumnas C18 de Extracción en Fase Sólida
- Seguir espectrofotométricamente el desarrollo del procedimiento determinando la cantidad de impurezas eliminadas
- Evaluar el procedimiento desarrollado aplicándolo a la determinación cuantitativa de FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en muestras de orina
- Optimizar las condiciones cromatográficas para cada uno de los fármacos en estudio

I.- MARCO TEORICO

I.- MARCO TEORICO

I.1. RESUMEN DE LAS TECNICAS MAS COMUNES PARA EL TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

I.1.1. PRECIPITACION O DENATURALIZACION DE PROTEINAS. ^{1,2,3,4}

La remoción de proteínas por desnaturalización o precipitación es un método efectivo en la preparación de muestras biológicas.

Ciertos materiales biológicos tales como plasma, heces y saliva contienen cantidades significativas de proteínas. Por lo tanto, la precipitación o desnaturalización de proteínas es importante.

Las ventajas de esta técnica son la velocidad con la cual puede ser preparada la muestra y su simplicidad. Las desventajas, la pérdida del analito por occlusión en el precipitado y el uso de ácidos fuertes que pudieran degradar el analito.

Los agentes comúnmente utilizados para la precipitación de proteínas incluyen Ácidos, Solventes orgánicos, Sales inorgánicas y Iones metálicos.

PRECIPITACION POR ACIDOS Los ácidos comúnmente usados son el ácido tricloroacético, ácido perclórico y ácido tungstico, algunos otros ácidos que han sido usados como agentes precipitantes son el molibdíco, sulfosalicílico, fosfotungstíco, metafosfórico y pícrico. Estos ácidos actúan por formación de sales insolubles con la forma catiónica de las proteínas en valores de pH bajos. Estos agentes son muy eficientes cuando son usados en solución al 5-20%.

PRECIPITACION POR SOLVENTES ORGANICOS Los solventes orgánicos que son miscibles con el agua tales como acetona, metanol, etanol, acetonitrilo, son usados para disminuir la solubilidad de las proteínas y precipitarlas de sus soluciones. Ocasionalmente el uso de dos solventes puede ser necesario para un recobro cuantitativo del analito.

PRECIPITACION POR SALES METALICAS EN SOLUCION ALCALINA Las proteínas pueden ser removidas por el uso de sales de cobre o zinc en solución alcalina, actúan por la formación de sales insolubles con las proteínas en solución. El método es inadecuado para analitos con una tendencia a formar complejos metálicos.

Estos métodos no son 100% eficientes y pueden solamente reducir más que eliminar el problema de las proteínas.

1.1.2. ULTRAFILTRACION ^{1, 2}

Es una técnica utilizada para la remoción de proteínas y otras macromoléculas. El procedimiento usa un tipo de membranas cónicas que son colocadas en la parte superior de tubos para centrifuga. La muestra es colocada y la membrana permite el paso de moléculas más pequeñas que no están unidas a proteínas u otras macromoléculas, mediante una centrifugación suave.

Una de las desventajas de esta técnica es la unión del analito con la membrana utilizada, sus ventajas son rápidas (comparada con la diálisis), el uso de volúmenes pequeños de muestra, evita la utilización de ácidos fuertes y la degradación enzimática, estabilizando el analito.

1.1.3. DIALISIS ^{1, 2}

La Diálisis puede separar un analito de la matriz por difusión a través de una membrana semipermeable, restringiendo el paso a moléculas de gran tamaño y permitiendo el paso a moléculas más pequeñas.

La difusión es un proceso lento que es conducido por un gradiente de concentración, funcionando hasta que es establecido un equilibrio, por lo tanto el recobro máximo del analito en el equilibrio es de 50%, asumiendo que el volumen de la muestra y el medio de diálisis es el mismo. No obstante la diálisis puede ser aplicada para aquellos compuestos que se unen débilmente a las proteínas.

1.1.4. LIOFILIZACION ^{1, 2}

La liofilización prepara en forma efectiva muestras biológicas para almacenamiento y/o para análisis. La metodología está asociada principalmente con muestras biológicas que tienen un exceso de volumen de material, o con fármacos que son extremadamente solubles en agua y no fácilmente removibles por los métodos tradicionales de extracción por solventes.

La liofilización también puede ser el método de elección para muestras que tienen compuestos de interés biológico que coevaporizan con el material de la matriz biológica.

La Liofilización está indicada en la presencia de fármacos química o térmicamente inestables, es también importante como técnica de preparación de muestras de heces.

Una muestra biológica es preparada por liofilización secandola en baño de hielo-acetona o en nitrógeno líquido. Las muestras líquidas son a menudo congeladas de tal manera que se forma una delgada capa de hielo, maximizando el área superficial para la evaporación, la muestra congelada es entonces colocada en un liofilizador donde el agua y otros componentes volátiles son removidos por sublimación a vacío, la muestra es solubilizada en un solvente orgánico adecuado y analizada directamente. Algunas de las desventajas de esta técnica son su lentitud y tediosidad.

1.1.5. SAPONIFICACION ^{1, 2, 3}

La Saponificación es la hidrólisis de un éster con hidróxido de sodio o de potasio, con la formación de jabones, los cuales pueden ser removidos fácilmente. Como método de eliminación de lípidos de muestras biológicas, la Saponificación es un proceso eficiente, aunque presenta el inconveniente de la degradación de los analitos en medios básicos.

1.1.6. DILUCION ^{1, 2}

La Dilución es un método muy simple y efectivo en la preparación de rápida de muestras biológicas. La Dilución se logra con la adición de un solvente como el agua o una solución amortiguadora, seguida de un mezclado y centrifugación en caso de ser necesario para remover material sólido y posteriormente realizar el análisis.

La Dilución puede tener varias funciones, puede reducir la señal debida al material de la matriz, puede reducir la viscosidad o la fuerza iónica de una muestra y puede asegurar la compatibilidad con la fase móvil cuando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el método de análisis, además puede también romper las uniones químicas débiles del analito con las proteínas plasmáticas.

1.1.7. EXTRACCIÓN LIQUIDO-LIQUIDO. ^{1, 2, 3}

Un método de preparación de muestras biológicas que ha sido utilizado por años es la Extracción Líquido-Líquido, este generalmente involucra la extracción directa del material biológico con un solvente inmiscible con el agua.

El aislamiento del analito se logra por su partición entre la fase orgánica y un medio acuoso, el grado de distribución entre las dos fases está influenciado por la elección del solvente de extracción, pH de la fase acuosa y proporción de los volúmenes de las fases orgánica y acuosa.

La relativa hidrofobicidad del analito determina la elección del solvente. Los solventes apropiados para la extracción deben tener un bajo punto de ebullición para eliminarlos eficientemente al final de la extracción y baja viscosidad para facilitar la mezcla con la matriz de la muestra.

De los solventes más utilizados tenemos al n-hexano, tetracloruro de carbono, ciclohexano, cloroformo, diclorometano, 1,1-dicloroetano, dietiléter, acetato de etilo.

Una consideración a tomar en la elección de un solvente para la extracción es su poder elútrópico, ya que la cantidad de agua que pueda disolver afectar de manera importante la selectividad del método.

Control de la extracción por el pH Para que una extracción tenga éxito, el analito debe estar no ionizado, facilitando así la partición o distribución dentro de la fase orgánica, por lo tanto el valor de pH de la fase acuosa debe tener un valor que asegure lo anterior.

Un problema que se presenta algunas veces en la utilización de esta técnica es la formación de emulsiones, las cuales son extremadamente difíciles de romper y a menudo no pueden ser separadas ni por centrifugación o sonicación.

La formación de emulsiones causa pérdida del analito por occlusión dentro de la emulsión, dando como resultado recobros pobres, esto puede evitarse con un mezclado menos riguroso o por el uso de grandes volúmenes de solvente de extracción.

Remoción del solvente. La remoción del solvente (por evaporación, congelamiento en nitrógeno líquido, pipeteo etc.) es frecuentemente un paso limitante en la Extracción Líquido-Líquido, y representa varios problemas: 1) manejo de solventes tóxicos y inflamables, 2) las condiciones para evaporar el solvente pueden causar bajos recobros del analito debido a la degradación por calor, volatilización o adsorción al vidrio, y 3) costo y tiempo.

1.1.8. HIDROLISIS DE CONJUGADOS.^{1,2}

El efecto de un fármaco depende considerablemente de la extensión en la biotransformación que ocurre en el cuerpo humano, por lo tanto puede ser importante el aislamiento de conjugados en forma de glucuronidos o sulfatos.

Estos conjugados no son sensibles a las clásicas técnicas de extracción por solventes, debido a la dependencia que tienen con el pH fisiológico y a sus características hidrofílicas. Para vencer estos problemas las muestras de glucuronidos, acetales o ésteres de sulfato son pretatadas usando hidrólisis ácida o enzimática.

Los metabolitos no conjugados que resultan de los procedimientos de la hidrólisis son menos hidrofílicos que sus conjugados y pueden ser extraídos de la matriz biológica con un solvente adecuado.

De los métodos usados para la Hidrólisis de Conjugados tenemos: a) hidrólisis enzimática mediante el uso de Glucuronidasa o Aril-sulfatasa y b) hidrólisis ácida mediante HCl 2 - 5 Normal, 30 minutos a 90-100 °C.

1.1.9. HOMOGENIZACIÓN^{1,2}

Para muestras que contienen proteínas insolubles tales como músculo u otros tejidos relacionados, una homogenización o solubilización con HCl 1N es requerida antes de manipular la muestra.

Para muestras gelatinosas, como fluidos seminales o esputo, la Homogenización es llevada a cabo via sonicación. Una muestra sólida tal como heces puede ser homogenizada con una mínima cantidad de metanol.

1.1.10. DERIVATIZACION QUIMICA.^{1,2,31}

La técnica de Derivatización Química es útil para aquellos analitos que son inestables en un intervalo de pH necesario para una extracción por solventes o que no pueden ser sometidos a la misma.

La derivatización Química es útil también para aquellos analitos que se encuentran en baja concentración. La sustancia de interés puede ser modificada químicamente dentro de la muestra biológica con un reactivo apropiado, para formar un derivado estable que puede ser extraído y analizado en términos de la concentración original del fármaco.

Además el reactivo para la derivatización puede ser seleccionado de tal manera, que el producto de la misma no sólo presente la sensibilidad adecuada sino también una buena selectividad.

Sypniewski y Bald³¹ utilizaron 1-benzil-2-cloro piridino bromuro, para formar un derivado estable con CAPTOPRIL via derivatización pre-columna, el producto obtenido pudo ser analizado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, a una longitud de onda de 314 nm, todo esto en muestras de orina y sangre de pacientes hipertensos.

La siguiente es una lista de los compuestos más comunes y sus respectivas reacciones.

COMPUESTO	REACTIVO	LONGITUD DE ONDA	
ALCOHOL	-OH	FENIL-ISOCIANATO	250 nm
COMPUESTOS DE SULFURO OXIDABLE	SO ₂	2,2'-DITIOBIS-5-NITRO PIRIDINA	320 nm
ACIDOS GRASOS	-COOH	p-BROMOFENACIL BROMURO	258 nm
ALDEHIDOS Y CETONAS	-CO-COOH =C=O Y CHO	2,4-DINITRO FENIL HIDRAZINA	365 nm
AMINAS PRIMARIAS	-NH ₂	o-FTALDEHIDOS	340 nm
AMINAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS	NHR	9-FLUORENILMETIL CLOROFORMATO	256 nm

1.11 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TECNICAS MAS COMUNES PARA EL TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PRECIPITACION DE PROTEINAS	RAPIDEZ EFICIENCIA PARA REMOVER PROTEINAS	POSIBLE OCLUSION DEL ANALITO EN EL PRECIPITADO ANALITOS INESTABLES DILUCION DE LA MUESTRA INCOMPATIBILIDAD CON FASES MOVILES EN CLAR DIFICULTAD PARA AUTOMATIZAR
DIALISIS	MEDICION DE ANALITOS NO UNIDOS A PROTEINAS	DILUCION DE LA MUESTRA SOL O 50 % DE RECOBRO DIFICULTAD CON ANALITOS UNIDOS A PROTEINAS
ULTRACENTRIFUGACION	MEDICION DE ANALITOS NO UNIDOS A PROTEINAS NO SE REQUIERE DILUCION REMOCION DE ENZIMAS QUE DEGRADEN A LOS ANALITOS	UNION DE LOS ANALITOS A LAS MEMBRANAS
LIOFILIZACION	MEDICION DE ANALITOS TERMOLAHILES	TECNICA LENTA
SAPONIFICACION	REMOCION DE LIPIDOS NEUTROS	TECNICA TEDIOSA MEDICION DE ANALITOS INESTABLES
EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO	BIEN DOCUMENTADA EJECUCION FACIL ESPECIFICA MUESTRAS VISCOSAS	FORMACION DE EMULSIONES REMOCION DE VOLUMENES GRANDES PH
HOMOGENIZACION	EFICIENCIA PARA MUESTRAS SOLIDAS	
DERIVATIZACION QUIMICA	PRODUCTOS ESTABLES	MANIPULACION COMPLICADA

1.2. TECNICAS FUTURAS PARA LA PREPARACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

1.2.1. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPER CRÍTICOS.^{1,5,7}

La extracción por Fluidos Super Críticos (FESC) es una técnica que se está estableciendo como alternativa para la preparación de muestras biológicas. La FESC ha sido usada por varios años en la Industria de los alimentos en procesos de escalamiento principalmente, un ejemplo es la remoción de Caféina de los granos de café.

Los Fluidos Super Críticos son atractivos agentes de extracción, que pueden ser manipulados dentro de un amplio intervalo de temperaturas y presiones, los cuales afectan de manera importante la solubilidad de un analito en un determinado fluido.

Los Fluidos Super Críticos tienen densidades cercanas a las de los líquidos, viscosidades y difusividades intermedias entre gases y líquidos, y el resultado es un efectivo solvente de extracción capaz de disolver muchos compuestos.

El dióxido de carbono es el fluido que más ha sido utilizado en la FESC, el cual ofrece las siguientes ventajas: no es tóxico, no es inflamable, es económico, no deja residuos y tiene una temperatura crítica baja (31 oC) lo cual evita la degradación de los analitos.

La Extracción por Fluidos Super Críticos es una técnica que tiene que ser evaluada todavía para ser utilizada como herramienta en la preparación de muestras biológicas.

1.2.2. MICELAS.⁴

Los surfactantes son moléculas anfífilas con una cadena de por lo menos ocho átomos de carbono con un grupo polar en uno de sus extremos. Pueden ser clasificados como no-iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros. En altas concentraciones (arriba de su concentración micelar) tienden a agregarse y formar micelas.

Las micelas son agregados esféricos de moléculas de surfactante con la cadena hidrocarbonada apuntando hacia el centro y el grupo polar hacia afuera lo que provoca la expulsión de cualquier molécula de agua del centro de la micela, este arreglo es el más estable termodinámicamente.

Las micelas están siendo usadas en una gran variedad de métodos analíticos, de los cuales el de mayor interés es el de Cromatografía Líquida Micelar (CLM). Esta técnica ofrece una serie de ventajas que no ofrece alguna otra, como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Esencialmente los surfactantes reemplazan a los modificadores orgánicos convencionales como metanol y acetonitrilo usados en fases móviles en CLAR de fase reversa. Las fases móviles para CLM ofrecen una característica dual ya que son hidrofílicas e hidrofóbicas, permitiendo que los analitos se unan a la superficie vía atracción iónica y dentro de las micelas hidrofóticamente. El tiempo de retención para analitos hidrofóbicos es inversamente proporcional a la concentración de las micelas.

Puede ser posible la inyección directa de la muestra sin la necesidad de un tratamiento previo, esto, asociado con la posibilidad de aumento de la respuesta del analito cuando usamos detectores electroquímicos o de fluorescencia harán de esta una herramienta muy útil en un futuro cercano.

1.2.3. AFINIDAD CROMATOGRAFICA DE ALTA RESOLUCION ¹

La Afinidad Cromatografica de Alta Resolución es una técnica utilizada para la purificación de moléculas biológicamente activas, que combina la especificidad de la Afinidad Cromatografica con la velocidad y resolución de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Es una técnica que ofrece la posibilidad de "diseñar" columnas donde los analitos puedan ser extraídos selectivamente.

1.2.4. INMUNOEXTRACCION ^{1,4}

La Inmunoestracción ha sido usada para la extracción de compuestos endógenos, tales como leucotrienos y prostaglandinas de muestras biológicas, esto se ha logrado mediante la utilización de soportes con anticuerpos unidos, específicos para estos compuestos.

En la Inmunoestracción normalmente se requieren solventes muy fuertes, dioxano, acetona o acetonitrilo para romper las uniones entre el analito y el anticuerpo. El solvente utilizado puede ser removido por evaporación, y de esta manera concentrar el analito. La Inmunoestracción se ofrece como una técnica muy versátil y específica para la preparación de muestras biológicas.

1.2.5. MICRO-ONDAS. ¹

La técnica de Micro-ondas puede ser usada para acelerar procesos de difusión, acelerar reacciones químicas, solubilizar muestras sólidas, para descongelar muestras y desnaturalizar proteínas. Las Micro-ondas como método de solubilización, es una técnica en la cual la energía (calor) es usada para la extracción de compuestos provenientes de materiales sólidos, las muestras son mezcladas con un solvente adecuado (p.ej metanol) e irradiadas por 30 segundos, se congelan y se repite la irradiación, las muestras son centrifugadas y el sobrenadante es separado.

La Micro-ondas pueden ser usadas también para la desnaturalización de estructuras proteicas ternarias y cuaternarias.

EXTRACCION EN FASE SOLIDA

1.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).

1.3.1. DEFINICIÓN. 9, 16, 17, 19, 20, 22, 23

La extracción en Fase Sólida denominada SPE solid phase extraction en el idioma inglés, es un método muy poderoso utilizado para la preparación rápida de muestras.

La extracción en fase sólida (EFS) es un proceso físico que en su principio se parece a la extracción líquido-líquido, la diferencia estriba en que la extracción líquido-líquido emplea dos líquidos inmiscibles y la EFS emplea un sólido y un líquido. El requisito de inmiscibilidad en la extracción líquido-líquido es un problema que no se encuentra en la EFS. En la EFS el aislamiento del analito depende de su afinidad diferencial entre el solvente y el material sólido utilizado.

Idealmente la EFS se utiliza para quitar de la muestra todas las impurezas que interfieren con la molécula que está siendo analizada y produce al mismo tiempo la recuperación total del analito.

En un principio esto se puede lograr mediante la elución selectiva de los analitos y la retención de los no analitos o por la elución de los no analitos y la retención de los analitos.

En el primer caso, el análisis de la fracción eluida puede efectuarse inmediatamente, los analitos pueden concentrarse por evaporación del solvente y resuspendiéndolos en un volumen menor de solvente para un análisis posterior.

En el segundo caso, los analitos quedan adsorbidos en la columna de EFS y tienen que ser eluidos. Si se utiliza un gran volumen de muestra, los analitos pueden ser concentrados y algunas veces almacenados temporalmente en la columna. La concentración adicional puede efectuarse por evaporación del solvente como en el caso anterior.

La simplificación de la matriz antes de analizar es ventajosa por tres razones:

- 1) Las posibles interferencias son eliminadas o sus concentraciones son bastante reducidas lo que significa que las demandas puestas a la técnica analítica son minimizadas.
- 2) El proceso de limpieza aumenta la vida de precolumnas, columnas, detectores etc. y disminuye la frecuencia de purga y limpieza de los sistemas de CLAR.
- 3) La concentración del analito antes de analizarlo baja límites de detección sin concentrar las interferencias.

1.3.2. APLICACION.

La EFS tiene su más grande aplicación en :

- El laboratorio clínico para la identificación de fármacos o metabolitos en líquidos corporales (sangre completa, plasma, suero, orina, jugos gástricos, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico).
- El laboratorio analítico de la Industria Química y Farmacéutica.
- Los Institutos oficiales de análisis químicos
- Bioquímica, Alimentos, en el análisis del medio ambiente y en la educación superior

EJEMPLOS DE APLICACION EN EFS

CARTUCHO O COLUMNA	CARACTERISTICAS (SUPERFICIE)	APLICACION
C18	HIDROFOBICA. NO POLAR (FASE LIGADA)	ASLAMIENTO DE ESPECIES HIDROFOBICAS. DE SOLUCIONES ACUOSAS. FARMACOS Y METABOLITOS EN SUERO, PLASMA Y ORINA.
C8	HIDROFOBICA. NO POLAR (FASE LIGADA)	ASLAMIENTO DE ESPECIES HIDROFOBICAS. DE SOLUCIONES ACUOSAS. USADA PARA METODOS QUE REQUIEREN MENOS RETENCION QUE C18 FARMACOS Y METABOLITOS EN SUERO, PLASMA Y ORINA. PEPTIDOS EN SUERO Y PLASMA.
C2	HIDROFOBICA. NO POLAR (FASE LIGADA)	ASLAMIENTO DE ESPECIES HIDROFOBICAS. DE SOLUCIONES ACUOSAS. USADA PARA METODOS QUE REQUIEREN MENOS RETENCION QUE C8 FARMACOS Y METABOLITOS EN SUERO, PLASMA Y ORINA.
SILICA	HIDROFILICA. POLAR.	ASLAMIENTO DE ESPECIES DE BAJA A MODERADA POLARIDAD. DE SOLUCIONES NO ACUOSAS. EJ.: VITAMINAS LIPOSOLUBLES, PESTICIDAS Y LIPIDOS.

CARTUCHO O COLUMNA	CARACTERISTICAS (SUPERFICIE)	APLICACION
FLORISIL	HIDROFILICA, POLAR, FASE LIGERAMENTE BASICA	AISLAMIENTO DE ESPECIES DE BAJA A MODERADA POLARIDAD, DE SOLUCIONES NO ACUOSAS. EJ. MUESTRAS MUESTRAS CON GRANDES CANTIDADES DE GRASAS Y LIPIDOS, PESTICIDAS, HERBICIDAS
ALUMINA	HIDROFILICA, POLAR, FASE LIGERAMENTE ACIDA, NEUTRA O BASICA.	AISLAMIENTO DE ESPECIES HIDROFILICAS, DE SOLUCIONES NO ACUOSAS. EJ. VITAMINAS, ANTIBIOTICOS Y ADITIVOS EN ALIMENTOS, ESTEROIDES
AMINOPROPIL	HIDROFILICA, MODERADAMENTE POLAR, (FASE LIGADA LIGERAMENTE BASICA)	AISLAMIENTO DE FARMACOS Y METABOLITOS, SACARIDOS, PIGMENTOS FENOLICOS
CIANOPROPIL	HIDROFILICA, MODERADAMENTE NO POLAR (FASE LIGADA NEUTRA)	AISLAMIENTO DE ANALITOS EN SOLVENTES ACUOSOS Y ORGANICOS, EJ.: PEPTIDOS HIDROFOBICOS.
DIOL	HIDROFILICA, MODERADAMENTE NO POLAR (FASE LIGADA NEUTRA)	AISLAMIENTO DE ANALITOS EN SOLVENTES ACUOSOS Y ORGANICOS, EJ.: TRAZAS DE ELEMENTOS EN AGUA, ANTIOTICOS EN COSMETICOS.

SOLA y COL,²² realizaron una doble extracción con cartuchos de fase sólida, rellenos de SILICA y CIANO-PROPIL, para la determinación del factor antiplaquetario BN-50727, en muestras de orina humana. El análisis es efectuado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en un rango de concentración de 10 a 2400 ng/ml

Por otro lado **SVENSSON**²³, hizo una purificación de muestras de plasma y orina, utilizando cartuchos C18, los cuales son tratados primeramente con Metanol y posteriormente con Agua para su activación, y el lavado de los cartuchos lo lleva a cabo con Sulfato de Amonio a pH de 9.1, las muestras así tratadas son analizadas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de PAR-IONICO para la determinación de CODEINA y siete de sus metabolitos.

1.3.3. MATERIALES.

Para propósitos analíticos los sistemas de EFS están constituidos principalmente por un adecuado adsorbente sólido con un tamaño de partícula que oscila en el rango de 40-60 micras y una actividad apropiada, empaçado en un material plástico como el propileno, en cantidades variables (100 hasta 500 mg).

Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la sílica, hasta muy poco polares como la sílica unida a los grupos C18, pasando también por materiales de intercambio iónico.

Las resinas intercambiadoras de iones fueron primeramente utilizadas para la identificación de analitos de abuso en muestras de orina.

Las resinas XAD-2 son copolímeros de estireno-divinil benceno, tienen una estructura macrorreticular la cual las provee de una proporción alta de área superficial/volumen, adsorben moléculas relativamente lipofílicas como ácidos, bases y moléculas neutras por fuerzas hidrofóbicas.

SÍLICA. La sílica es el material de mayor uso en EFS, sirve como base para la elaboración de nuevas fases llamadas de unión química, que por su funcionalidad pueden ser divididas en fases no polares, fases polares y fases intercambiadoras de iones.

Materiales de relleno más comúnmente utilizados en EFS:

TIPO DE RELLENO		CARACTERISTICAS
DIAMINO	$-(CH_2)_nNHCH_2CH_2NH_2$	INTERCAMBIADOR ANIONICO DEBIL
AMONIO CUATERNARIO	$-(CH_2)_nN^+(CH_3)_3Cl^-$	INTERCAMBIADOR ANIONICO FUERTE
ACIDO CARBOXILICO	$-(CH_2)_nCOOH$	INTERCAMBIADOR CATIONICO DEBIL
ACIDO SULFONICO	$-C_6H_4-SO_3H$	INTERCAMBIADOR CATIONICO FUERTE
CIANO	$-(CH_2)_nCN$	SORBENTE DE POLARIDAD MEDIA
AMINO	$-(CH_2)_nNH_2$	SORBENTE DE POLARIDAD MEDIA
FENILO	$-C_6H_5$	SORBENTE NO POLAR
OCTILO	$-C_8H_{17}$	SORBENTE NO POLAR
OCTADECILO	$-C_{18}H_{37}$	SORBENTE NO POLAR
SILICA		SORBENTE POLAR

1.3.4. COMO TRABAJA LA EFS.

La preparación de muestras para análisis químico cuantitativo o cualitativo por EFS sigue un protocolo simple y rápido, este consiste en una secuencia de pasos que se han generalizado para la resolución de una gran variedad de problemas analíticos.

PREPARACION DE LA MUESTRA. Muchas muestras pueden requerir dilución, homogenización, disolución o ajuste del pH antes de la limpieza en el cartucho o minicolumna, algunas muestras pueden aplicarse directamente sin preparación.

PREPARACION DE LA MINICOLUMNA DE EFS (etapa de activación y enjuague). La activación se efectúa con algún solvente (metanol o acetonitrilo para fases no polares y hexano para fases polares) que solvata las cadenas terminales y superficie del material de empaque. El paso de enjuague elimina el solvente y deja la columna lista para aplicar la muestra.

APLICACION DE LA MUESTRA. Dependiendo de la matriz que contenga al analito es posible que se requiera un flujo pequeño a través de la minicolumna para asegurar la interacción del analito con el soporte.

LAVADO DE LA MINICOLUMNA. Se utiliza un solvente débil (agua para fases no polares y hexano para fases polares) para remover contaminantes pero retener al analito, en casos donde el analito es débilmente retenido y se eluye directamente, este paso permite la recuperación del analito.

ELUCION DEL ANALITO. Se utiliza un solvente fuerte para eluir el analito de la minicolumna. En fases no polares puede ser metanol, acetonitrilo, alcohol isopropílico, en fases polares, acetato de etilo o acetona.

CONCENTRACION DEL ANALITO. Si el analito está suficientemente concentrado, se puede analizar directamente, en caso contrario puede concentrarse por evaporación del solvente de elución y luego analizarse.

1.3.5. MECANISMOS DE RETENCION EN LA EPS.

El analito puede unirse a la fase sólida por diferentes mecanismos: 1) puentes de hidrógeno, 2) interacciones dipolo-dipolo, 3) interacciones hidrofóbicas, 4) interacciones electrostáticas. pueden intervenir algunas o todas estas interacciones durante la extracción y es del dominio de estas fuerzas lo que determinará la especificidad de la técnica.

1.3.6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN LA EPS.

Las principales ventajas que ofrece esta técnica son : 1) **SELECTIVIDAD**, debido a la amplia variedad de materiales disponibles, 2) **RAPIDEZ** y **FACILIDAD** en su uso y 3) **ECONOMIA**; de las desventajas podemos mencionar la necesidad de centrifugar algunas muestras biológicas como el plasma para remover fibrinas o alguna otra materia particulada que pudiera bloquear el paso de los solventes a través del cartucho o minicolumna, así como limitar el uso de material biológico demasiado viscoso.

PROPIEDADES GENERALES DE FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM Y ACIDO SALICILICO.

1.4.1. FUROSEMIDA. 11, 12, 13, 14, 15

1.4.1.1. NOMBRE QUIMICO

Furosemida es ácido-4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranílico

1.4.1.2. FORMULA CONDENSADA

$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

1.4.1.3. CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA

pK_a 3.9 a 25 oC

1.4.1.4. ACCION FARMACOLOGICA

La Furosemida es un potente diurético usado frecuentemente en el tratamiento de edemas de diversa etiología, asociadas con enfermedades renales, hepáticas y cardíacas.

1.4.1.5. MECANISMO DE ACCION

El fármaco induce diuresis predominantemente por acción sobre la superficie luminal de la nefrona y es eliminado principalmente por secreción tubular.

1.4.1.6. APARIENCIA, OLOR, SABOR Y SOLUBILIDAD

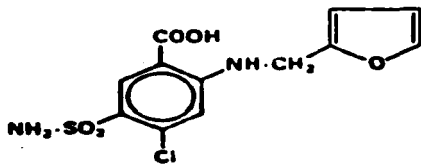
La Furosemida se encuentra como polvo cristalino blanco a ligeramente amarillo, inodoro e insípido, es prácticamente insoluble en agua y cloroformo, soluble 1 en 75 de alcohol, 1 en 850 de éter y 1 en 15 de acetona, es libremente soluble en dimetil formamida y soluciones de álcalis.

1.4.1.7. ESPECTRO ULTRAVIOLETA

El espectro UV para Furosemida muestra tres máximos: a 229, 272 y 335 nm (en solución alcalina) así mismo el espectro puede verse alterado por influencia del pH.

1.4.1.8. PRINCIPALES METABOLITOS

Se ha encontrado que el principal metabolito de la Furosemida es la Saluamina (ácido-4-cloro-N-furfuril-5-sulfamiantranílico) y su glucurónido.



FUROSEMIDA

1.4.19. METODOS DE ANALISIS

Los métodos para la determinación cuantitativa de Furosemda en plasma y orina incluyen: cromatografía en capa fina con detección espectrofluorométrica y espectrofotométrica, cromatografía de gases con detección de captura de electrones, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección espectrofotométrica y espectrofluorométrica

Para la limpieza de las muestras, los métodos que incluyen la técnica de CLAR para la medida final usan metanol o acetonitrilo para la precipitación de proteínas, todos los demás métodos usan la extracción líquido-líquido para la limpieza, con esta última técnica la fase orgánica final contiene no solamente sustancias endógenas que son solubles en el solvente sino también algunas sustancias que son solubles en agua, ya que ninguno de los solventes de extracción usados son completamente inmiscibles con la fase acuosa.

1.4.2. SULFAMETOXAZOL ^{11, 12, 13, 17}

1.4.2.1. NOMBRE QUIMICO

Sulfametoxazol es N-(5-metiloxazol-3-il)sulfanilamida

1.4.2.2. FORMULA CONDENSADA

$C_{10}H_{11}N_3O_2S$

1.4.2.3. CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA

Pka 5.6 a 25°C

1.4.2.4. ACCION FARMACOLOGICA

Sulfametoxazol es aceptado y usado como un antimicrobiano altamente efectivo en combinación con Trimetoprim.

De los microorganismos susceptibles a la sulfá están todas las cepas de *Strep. pneumoniae*, *C. diphtheriae* y *N. meningitidis*, algunas cepas de *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Strep. pyogenes*, el grupo *Vitridans* de *Streptococcus*, *Strep. faecalis*, *E. coli*, *Pr. mirabilis*, *Pr. norganii*, *Pr. rettgeri*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseud. pseudomallei*, *Serratia* y *Alcaligenes*, también son sensibles especies de *Klebsiella*, *Bruella abortus*, *Pasteurella hemolytica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolica* y *Nocardia asteroides*.

1.4.2.5. MECANISMO DE ACCION

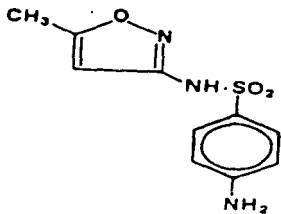
Su actividad antimicrobiana resulta de sus interacciones sobre dos etapas de la vía enzimática para la síntesis del ácido tetrahidrofólico. La sulfamida inhibe la incorporación del ácido para-aminobenzoico (PABA) en el ácido fólico y el Trimetoprim inhibe la reducción de dehidrofolato a tetrahidrofolato, inhibiendo el desarrollo bacteriano.

1.4.2.6. APARIENCIA Y SOLUBILIDAD

El Sulfametoxazol se encuentra como polvo blanco cristalino a ligeramente amarillo; es ligeramente soluble en agua, soluble 1 en 50 de alcohol y 1 en 3 de acetona, es prácticamente insoluble en cloroformo y éter etílico, es soluble en soluciones de álcalis.

1.4.2.7. ESPECTRO ULTRAVIOLETA

El espectro de ultravioleta para Sulfametoxazol exhibe dos máximos: a 265nm (en medio ácido) y a 256 nm (en medio alcalino)



SULFAMETOXAZOL

1.4.2.8. PRINCIPALES METABOLITOS

El principal metabolito de Sulfametoxazol es el N-4-acetilsulfametoxazol y su velocidad de excreción renal es independiente del pH de la orina, no así la de Sulfametoxazol que depende fuertemente del pH urinario.

1.4.2.9. METODOS DE ANALISIS

Algunos métodos para la determinación cuantitativa de Sulfametoxazol en muestras biológicas han sido reportados e incluyen: cromatografía de gases, usando un espectrómetro de masas para la detección y cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica. Para la limpieza de las muestras biológicas, la técnica más usada es la extracción líquido-líquido

1.4.3. TRIMETOPRIM ^{11, 12, 13, 17, 18}

1.4.3.1. NOMBRE QUIMICO

Trimetoprim es 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina.

1.4.3.2. FORMULA CONDENSADA

$C_{14}H_{16}N_4O_3$

1.4.3.3. CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA

pK_a 6.6 a 25 °C

1.4.3.4. ACCION FARMACOLOGICA

Trimetoprim es un fármaco antibacteriano de tipo sintético usado extensivamente en el tratamiento de una gran variedad de infecciones en el hombre.

1.4.3.5. MECANISMO DE ACCION

Trimetoprim interfiere con el metabolismo del ácido fólico, inhibiendo a la enzima dihidrofolato reductasa, bloqueando la formación de purina y timina, inhibiendo el desarrollo bacteriano.

1.4.3.6. APARIENCIA Y SOLUBILIDAD

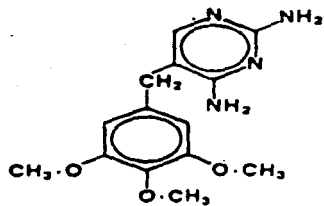
Trimetoprim se encuentra como polvo cristalino blanco a ligeramente amarillo pálido, es ligeramente soluble en agua y alcohol, es soluble en metanol, cloroformo y alcohol bencílico, muy poco soluble en éter etílico y tetracloruro de carbono.

1.4.3.7. ESPECTRO ULTRAVIOLETA

El espectro ultravioleta para Trimetoprim exhibe un máximo a 287 nm y un mínimo en aproximadamente 257 nm en medio alcalino, y también exhibe ligera fluorescencia en soluciones relativamente concentradas de cloroformo.

1.4.3.8. PRINCIPALES METABOLITOS

Cinco son los metabolitos que se han encontrado para Trimetoprim: 1) 2,4-diamino-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibencil)-pirimidina, 2) 2,4-diamino-5-(4-hidroxi-3,4,5-trimetoxibencil)pirimidina, 3) 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina-1-óxido, 4) 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina-3-óxido, 5) 2,4-diamino-5-(3-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-pirimidina.



TRIMETOPRIM

1.4.3.9. METODOS DE ANALISIS

Varios métodos analíticos para la cuantificación de Trimetoprim en muestras biológicas han sido reportados e incluyen: cromatografía de gases con detector de captura de electrones, cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal y en fase reversa con detección espectrofotométrica. Para la limpieza de las muestras biológicas los procesos han variado desde precipitación de proteínas hasta extracciones con cloroformo y acetato de etilo.

1.4.4. ACIDO SALICILICO. ^{11,12,13}

1.4.4.1. NOMBRE QUIMICO

Acido Salicilico es el ácido-2-hidróxibenzoico

1.4.4.2. FORMULA CONDENSADA

C₇H₆O₃

1.4.4.3. CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA

Pka 3.0 y 13.4 a 25oC

1.4.4.4. ACCION FARMACOLOGICA

Acido Salicilico es un fármaco analgésico y antipirético.

1.4.4.5. MECANISMO DE ACCION

Acido Salicilico alivia el dolor y disminuye la temperatura corporal por su efecto periférico y sobre el sistema nervioso central, inhibe la síntesis de prostaglandinas y actúa sobre el hipotálamo.

1.4.4.6. SOLUBILIDAD

Acido Salicilico es soluble 1 en aproximadamente 550 de agua, 1 en 4 de etanol, 1 en 45 de cloroformo y 1 en 3 de éter, es soluble en soluciones de álcalis.

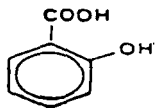
1.4.4.7. ESPECTRO ULTRAVIOLETA

El espectro ultravioleta para Acido Salicilico muestra un máximo en 236 y un mínimo en 260 nm en medio ácido.

1.4.4.8. PRINCIPALES METABOLITOS

Acido Salicilico se excreta principalmente por riñon y en cantidades ínfimas por saliva y otras vias. Casi toda la cantidad administrada aparece en la orina como salicilato libre (10 por 100), ácido salicílico (75 por 100), glucurónido salicílico fenólico y ácido genticico.

La excreción de salicilato libre varía con el estado de salud o enfermedad, con la dosis y con el pH de la orina. Si la orina es muy alcalina, hasta 85 por 100 del fármaco ingerido se elimina como salicilato libre, pero si es ácida, la cantidad desciende hasta 5 por 100 de salicilato libre.



ACIDO SALICILICO

1.4.4.9. METODOS DE ANALISIS

Algunos métodos para la determinación cuantitativa de Acido Salicílico en muestras biológicas han sido reportados e incluyen: cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica, usando las técnicas de precipitación de proteínas y de extracción por solventes para la limpieza de las muestras.

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

1.5.1. CROMATOGRAFIA. DEFINICION. ^{19, 20}

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases, una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido de gran área superficial

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra

1.5.2. CLASIFICACION.

Basándonos en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos

Considerando los procesos de separación, se pueden enumerar cuatro tipos

1) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. El grado de separación depende notablemente de la superficie activa del sólido y por lo tanto del tamaño de partícula del mismo

2) Cromatografía de partición. La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está saturada por la fase móvil y viceversa, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada una de las fases, esto es, a sus diferencias en sus coeficientes de reparto

3) Cromatografía de intercambio iónico. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa exclusivamente con muestras iónicas o ionizables, cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por lo tanto, más tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución

4) Cromatografía de exclusión. El relleno de la columna es un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Si el material es un gel reticulado se le denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel, pero en sí el proceso de separación se efectúa por lo mismo, la diferencia de pesos moleculares.

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto:

1) Cromatografía en fase normal. El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (ej. sílice) y la fase móvil es apolar (ej. n-hexano o tetrahidrofurano).

Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares.

2) Cromatografía en fase inversa. Es el proceso inverso en el cual, el lecho estacionario es de naturaleza apolar (ej. hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención (ej. buffer de fosfatos).

1.5.3. TERMINOS MAS EMPLEADOS EN CLAR.

En la cromatografía de gases la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya función es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna sin interactuar con esta, en cromatografía de líquidos a la fase móvil se le llama eluyente y realiza la misma función, aunque aquí sí tiene parte activa en la separación.

En la columna se encuentra la fase estacionaria que es un lecho de variadas composiciones químicas por las cuales se realiza la mayor parte de las separaciones, escogiéndose esta fase de acuerdo a la composición química de la muestra a analizar.

El cromatograma es el registro gráfico de la composición de los componentes de una muestra, así como la concentración en que están presentes, los cuales salen a un tiempo determinado de la columna.

1.5.3.1. TIEMPO DE RETENCION.

Es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el apice del pico, este valor será siempre igual en la misma columna y bajo las mismas condiciones de trabajo.

Tiempo muerto. Es el tiempo en el que la fase móvil se transada de un lado a otro de la columna.

En cromatografía de líquidos el tiempo de retención está dado por el flujo de la fase móvil, su interacción con la muestra y la fase estacionaria, dependiendo del tipo de separación p.ej. adsorción, partición, intercambio iónico etc.

1.5.3.2. FACTOR DE CAPACIDAD.

El factor de capacidad es el coeficiente de reparto común a todos los procedimientos de distribución y se define como:

$$K = [FE] / [FM]$$

[FE] Concentración en la fase estacionaria

[FM] Concentración en la fase móvil

Es una constante termodinámica y mide la afinidad de la muestra por la fase estacionaria. Este valor se relaciona con el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna.

La fase estacionaria retarda la muestra al interactuar con ella en un tiempo llamado tiempo de retención, y la fase móvil en un tiempo llamado tiempo muerto, el cociente entre ambos nos da el valor de K.

En cromatografía de líquidos K está controlada por la fuerza del solvente, debiéndose encontrar el más adecuado para una separación, utilizando desde un solvente de débil fuerza hasta uno de mayor fuerza, dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra, los valores óptimos de K son de 2 a 6 y en muestras con más de dos componentes el rango óptimo es $1 < K < 10$. Para encontrar que solventes son los más apropiados para una separación, existen tablas elútopicas que agrupan a los solventes de acuerdo a su fuerza sobre la fase estacionaria.

1.5.3.3. FACTOR DE SELECTIVIDAD.

El factor de selectividad es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria.

En la fase estacionaria se realiza la separación y de acuerdo a la interacción que haya con un componente y otro se realiza una selección de que pico sale primero y cual al final. Si el valor de selectividad (α) es igual a 1 los dos picos tienen afinidad igual con respecto a la fase estacionaria y no se logra la separación, así mientras más elevados sean los valores de (α) mayor, ser la selectividad de la fase estacionaria y más fácil la separación.

En cromatografía de líquidos se puede mejorar la selectividad por:

- 1) El cambio de la fase móvil, por ejemplo aumentando la polaridad, cambio en el pH y cambio en la fuerza iónica.
- 2) Cambio de fase estacionaria (columna), variar el tamaño de partícula.
- 3) Temperatura. Puede cambiarse la selectividad aumentando o disminuyendo la temperatura, utilizando un horno para columnas o una circulación de agua.

1.5.4. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT).

Este término procede de cálculos de destilación en donde cada fase de condensación y evaporación tienen lugar en un plato distinto, que en las columnas de destilación ascendente corresponde en realidad a una bandeja o recipiente, en cromatografía no son platos reales y significan valores teóricos de las etapas de distribución que sufren las moléculas de la muestra al pasar por lo largo de la columna.

La AEPT es la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico y se define como:

$$AEPT = L / N$$

L = Longitud de la columna en cm o mm

N = Número de platos teóricos

El diagrama de Van Deemter demuestra una ecuación de tres términos y cada uno de ellos describe un efecto físico que relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia y que están en cierto grado bajo el control del cromatografista.

Ecuación de Van Deemter: $AEPT = A + B/u + Cu$

A. Describe el ensanchamiento del pico debido al patrón de flujo de la fase móvil en la columna

Si la columna no es uniforme debido a la graduación del tamaño de las partículas del soporte o a un empaque irregular, la fase móvil puede fluir por vías de diferentes longitudes ocasionando el ensanchamiento del pico. Se mejora usando un soporte de tamaño uniforme, evitando fragmentaciones que produce el mal empaque y el golpeo mecánico de la columna.

B/u. Describe la difusión que tiene lugar en la fase móvil cuando el soluto molecular emigra desde las zonas de alta concentración hasta zonas de menor concentración, provocando una dispersión gaussiana que hace que disminuya la eficiencia de la columna. Para disminuir la difusión se utilizan caudales más rápidos, gas portador más denso (nitrógeno o argón) y presión elevada dentro de la columna.

Cu. Resistencia a la transferencia de masa. Las moléculas de la muestra deben transferirse de la fase móvil a la fase estacionaria, penetrar en esta última y difundirse, luego volver a la fase móvil y salir de la columna, en este proceso interviene el espesor de la película líquida que envuelve el soporte de la fase estacionaria, la difusibilidad del soluto de la muestra en la fase estacionaria, el factor de capacidad y la velocidad de flujo.

En cromatografía de líquidos de alta resolución se utiliza la fórmula: $AEPT = A + Cu$

En donde **A** y **C** presentan las mismas características que en cromatografía de gases, en este caso **B** (difusión longitudinal) es raramente un problema porque las moléculas no difunden tan rápido en un líquido como en un gas y la velocidad lineal es baja en líquidos por un fenómeno llamado difusión en reflujos.

1.5.4.1. NUMERO DE PLATOS TEÓRICOS.

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos, estos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra a medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma.

Como un cromatograma presenta la forma de una curva Normal, esta presenta una desviación estándar, la cual nos indica que tan agudo es un pico, debido a que este valor depende de varios parámetros, entre ellos el caudal, se ha optado por utilizar un valor relativo para expresar la calidad de un pico, este valor es el cociente entre la desviación estándar y el tiempo de retención.

Como el valor que se obtiene es muy pequeño, se utiliza su inverso y se eleva al cuadrado por ser la varianza la medida básica de una distribución Normal.

$$n = (t_R / \sigma)^2$$

n = número de platos teóricos

t_R = tiempo de retención

σ = desviación estándar

Existen varios factores que afectan el número de platos teóricos, como son el tiempo de retención, la longitud de la columna, el soluto de la muestra, el caudal, tamaño de la muestra, la técnica de inyección, etc.

1.5.5. EFICIENCIA DE LA COLUMNA.

Al introducir una muestra en la columna esta se presenta como un estrecho perfil de concentración [C₀], a medida que la muestra se reparte entre la fase estacionaria y la fase móvil y es arrastrada por esta última a través de la columna, se extiende en una concentración de perfil gaussiano o normal [C]. Mientras más tiempo permanezca el soluto en la columna más ancho será el pico.

A la capacidad de una columna de proporcionar picos altos y delgados se le llama alta eficiencia de la columna y se mide calculando el número de platos teóricos.

1.5.6. ECUACION DE RESOLUCION.

La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos, y es definida como la distancia que hay entre el centro de picos dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos.

$$R = \frac{V_2 - V_1}{W_1 + W_2} (1/2)$$

R = RESOLUCION

V₁ y V₂ = VOLUMENES DE RETENCION DE LOS COMPONENTES 1 y 2

W₁ y W₂ = ANCHURAS DE LOS PICOS DE LOS COMPONENTES 1 y 2

1.5.7. COMPONENTES DE UN CROMATOGRÁFO DE CLAR.

Los componentes esenciales encontrados en un instrumento de CLAR incluyen: una COLUMNA, la cual contiene el material de empaque, una BOMBA de alta presión, para transportar la fase móvil de un reservorio hacia y a través de la columna, un INYECTOR, para introducir la muestra, un DETECTOR y un INTEGRADOR o REGISTRADOR.

1.5.7.1. COLUMNA

La columna está considerada como el corazón del sistema, es construida usualmente de acero inoxidable, de 10 a 30 cm de longitud con un diámetro interno de 4.5 a 5 mm, la columna se encuentra rellena de un material de empaque que consiste de partículas rígidas y porosas, con un diámetro que oscila en un rango de 3 a 10 μm , esto permite una rápida difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria y una buena eficiencia de las columnas.

El material más usado para la manufactura de columnas es la sílica. Los grupos silanol (Si-OH) le confieren características de polaridad, las cuales son explotadas en los procesos de adsorción. La naturaleza química de la superficie de la sílica puede ser alterada por reacción con un gran número de grupos funcionales, dando así una gran variedad de materiales de empaque. Los más comunes son: octadecil-sílica, el cual contiene una cadena C18, pero también materiales con cadenas C2, C6, C8 y C22 están disponibles. Otros materiales tienen grupos funcionales tales como etano, fenil, nitró, amino e hidróxilo, fuertes intercambiadores de iones con grupos sulfónicos ácidos y grupos de amonio cuaternario.

Estos materiales tienen una amplia aplicación en cromatografía de adsorción, partición y de intercambio iónico, para cromatografía de exclusión un tipo especial de sílica con un limitado rango de tamaño de poro (diámetro) también está disponible.

1.5.7.2. BOMBA

Las bombas más usadas en CLAR mantienen ya sea una presión constante o un flujo constante. Las velocidades de flujo más usuales están dentro de un rango de 1 a 3 ml/min con presiones que van desde 500 a 4000 lb/in². Las bombas deberán presentar mínimas fluctuaciones dentro de estos rangos para lograr una máxima estabilidad en la respuesta del detector y un tiempo de retención reproducible.

Existen dos tipos de bombas en CLAR: bomba isocrática, la cual mantiene una composición constante de la fase móvil durante el curso de separación; bomba de gradiente o por gradiente, este tipo de bomba cambia la composición de la fase móvil durante el curso de separación.

1.5.7.3. DETECTOR.

Cuatro son los detectores de mayor aplicación detector de UV-VISIBLE, estos detectores dan buenas sensibilidades con muchos solutos, no son afectados por ligeras fluctuaciones en la velocidad de flujo y temperatura y no destruyen la muestra. Los dos tipos de detectores UV-VISIBLE son los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

Detector de FLUORESCENCIA, este detector puede ser considerado como de tipo selectivo, ya que sólo algunos fármacos presentan fluorescencia natural, sin embargo muchos fármacos pueden ser convertidos en derivados fluorescentes, para tales la respuesta fluorescente puede lograr una mejor sensibilidad que para una respuesta UV.

Detector de INDICE DE REFRACCION, este detector es considerado como de tipo universal ya que todo los fármacos causan un cambio en el índice de refracción cuando son disueltos en un solvente.

Este detector es muy poco sensitivo (100 veces menos que el detector UV) lo cual limita severamente su uso en el análisis de fármacos, también muchos factores pueden afectar la respuesta del detector como son: la temperatura, la presión y la composición del solvente.

Detector ELECTROQUIMICO, en este detector los solutos son sometidos o sufren una reacción redox en la superficie de un electrodo con la medida de una corriente resultante. Dos tipos de detectores están disponibles, el detector Coulométrico y el Amperométrico, el primero tiene una gran superficie de electrodo y la reacción electroquímica es llevada hasta el final, el segundo tiene una superficie de electrodo más pequeña y la reacción se lleva hasta un 10% solamente lo que hace que el primero tenga mayor sensibilidad.

Otro tipo de detectores que no tienen amplia utilidad en el análisis de fármacos, pero que han encontrado aplicación en circunstancias especiales son los detectores de CONDUCTIVIDAD, RADIOACTIVIDAD, FOTOCONDUCTIVIDAD, DE INFRAROJO, de ESPECTROMETRIA DE MASAS y de INMUNOENSAJO.

1.5.8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN CLAR.

La Cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada como complementaria a la Cromatografía de gases, en muchos casos ambas técnicas pueden ser usadas para efectos de la misma separación, para aquellos fármacos que son termolábiles o no volátiles CLAR es la elección lógica.

CLAR ofrece amplias ventajas sobre la tradicional cromatografía de líquidos :

- RAPIDEZ
- RESOLUCION
- SENSITIVIDAD
- COLUMNAS REUTILIZABLES
- IDEAL PARA MOLECULAS GRANDES Y ESPECIES IONICAS
- MUESTRAS FACILES DE RECUPERAR

Pero CLAR tiene también ciertas limitaciones o desventajas :

- INSTRUMENTACION COSTOSA
- NO EXISTE DETECTOR UNIVERSAL Y SENSIBLE
- ELEVADO COSTO DE OPERACION
- EXPERIENCIA INDISPENSABLE.

1.5.9. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO.

El propósito de la mayoría de las investigaciones cromatográficas es analizar la muestra. A la determinación de que o cuántos componentes contiene la muestra se le denomina análisis cualitativo, mientras que a la determinación de la cantidad en que están presentes algunos o todos los componentes se le denomina análisis cuantitativo.

Análisis Cualitativo. La cromatografía es esencialmente una técnica de separación, sin embargo es un método "ciego". Indica la presencia de una posible sustancia sin decir de que se trata, para confirmarlo se realizan los siguientes procedimientos:

- Utilización de datos de tiempos de retención en columnas diferentes
- Adición a la muestra del supuesto componente
- Técnicas de identificación posteriores a la elución, como espectrofotometría de infrarrojo y espectrometría de masas
- Datos bibliográficos de tiempos de retención.

Análisis Cuantitativo. Después de la identificación de los componentes de la muestra, la siguiente etapa es la determinación de la cantidad de los mismos en la muestra.

El procedimiento lógico para efectuarlo sería primero seleccionar el parámetro que vamos a medir :

- * ALTURA
- * AREA

seleccionar el método de medición que se va a utilizar:

- Métodos manuales
- Integración del área de los picos
- Integradores gráficos
- Integradores digitales
- Sistemas de tratamiento de datos con impresor/registrador.

segundo, elegir el método adecuado de cuantificación:

- Normalización Interna
- Estándar Interno
- Estándar Externo

Normalización Interna.

El método de Normalización interna, llamado también Estandarización Interna, consiste en referir el contenido del analito al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes (exceptuando al pico que corresponda al solvente) y el contenido de analito en la muestra se calcula según:

$$Pi = Ai / \sum Ai (100)$$

Donde: P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla, A_i es el área del componente i , y $\sum A_i$ es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma.

Este método tiene fundamentalmente, dos ventajas: no requiere estándar de referencia y es muy preciso ya que los errores de inyección y de preparación de la muestra se compensan. En contrapartida tiene varias limitaciones: en primer lugar, para obtener resultados médianamente exactos, es necesario que todos los componentes de la mezcla se separen en el sistema cromatográfico elegido, lo cual no siempre ocurre. Y en segundo lugar se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta (fi), es decir que si se trabaja con un detector UV, todas las sustancias deben tener el mismo valor de absorptividad a la longitud de onda elegida. Este caso suele darse pocas veces y habitualmente con familias de compuestos o sustancias que están muy relacionadas, por lo tanto este método prácticamente no se utiliza en HPLC.

Estándar Externo

El Estándar Externo, es sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en HPLC. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia.

Es decir:

$$P = Am Cs / As (D) (100)$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, Am y As son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, Cs es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado.

Estándar Interno

El método del Estándar Interno consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra.

Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas. Es decir:

$$P = Rm Cs / Rs (D) (100)$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, Rm y Rs son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente, Cs es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere de patrones de referencia al igual que el método del Estándar Externo, por lo cual su exactitud depende de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe presentar un área similar al analito
- Debe eluir a un valor de K' cercano al analito
- Debe resolverse completamente ($R_s > 1.5$)
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado

El método del Estándar Interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas, y, en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como dilución, extracción y derivatización.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. REACTIVOS Y MATERIAL.

REACTIVOS:

FUROSEMIDA	ESTANDAR DE REFERENCIA (100% B.H.)
SULFAMETOXAZOL	ESTANDAR DE REFERENCIA (100% B.H.)
TRIMETOPRIM	ESTANDAR DE REFERENCIA (100% B.H.)
ACIDO SALICILICO	ESTANDAR DE REFERENCIA (100% B.H.)
HIDROXIDO DE SODIO	GRADO REACTIVO T J BAKER
ACIDO CLORHIDRICO	GRADO REACTIVO T J BAKER
FOSFATO MONOSODICO	GRADO REACTIVO T J BAKER
FOSFATO DISODICO	GRADO REACTIVO T J BAKER
ACEFONITRILIO	GRADO HPLC MALLINCKRODT
METANOL	GRADO HPLC MALLINCKRODT
AGUA DESTILADA Y DESIONIZADA	

MATERIAL:

CARTUCHOS SEP-PACK C18 DE 360 mg DE CUERPO PEQUEÑO MILLIPORE

FLUIDO BIOLÓGICO La orina fue donada por dos hombres de 26 y 28 años, sanos, de aprox. 70 Kg de peso.

MATERIAL DE VIDRIO:

VASOS DE PRECIPITADO	25, 50, 100 y 250 ml
PIPETAS GRADUADAS	1, 5 y 10 ml
PIPETAS VOLUMÉTRICAS	1 y 2 ml
MATRACES VOLUMÉTRICOS	50, 100, 500 y 1000 ml
PROBETAS	50, 100 y 500 ml
MATRAZ KITASATO	1000 ml

2.2. EQUIPO.

CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION EQUIPADO CON INTEGRADOR PERKIN-ELMER MODELO LCI-100, BOMBA ISOCRATICA PERKIN-ELMER MODELO LC-250, COLUMNA DE ACERO INOXIDABLE DE 250 mm DE LONGITUD POR 4.6 mm DE DIAMETRO INTERNO MERCK, EMPACADA CON PARTICULAS DE 10 μ m DE DIAMETRO, ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE PERKIN-ELMER MODELO LAMBDA 3A.

2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

2.3.1. 1a.FASE. DESARROLLO Y OPTIMIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA.

El objetivo principal de esta primera etapa experimental, era desarrollar una metodología que nos permitiera limpiar o purificar muestras de orina cargadas con un analito o activo como es la FUROSEMIDA, es decir una metodología suficiente para "destruir" la matriz biológica y dejar a nuestro analito o activo de interes en una forma fisicoquimica más sencilla para un análisis posterior por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El procedimiento analítico debería de ser capaz de permitirnos eliminar todas las sustancias o impurezas presentes en la orina y dejar a nuestro analito en solución, a una concentración tal que pudiera ser analizado por CLAR

En general la Extracción en Fase Sólida (EFS), para la purificación de muestras tiene dos opciones:

- 1) RETENER EL ANALITO O ACTIVO DE INTERES, ELIMINAR TODAS LAS POSIBLES IMPUREZAS DE LA MUESTRA Y ELUIR POSTERIORMENTE EN FORMA SELECTIVA A NUESTRO ANALITO O ACTIVO
- 2) RETENER LAS IMPUREZAS DE LA MUESTRA Y ELUIR DE FORMA SELECTIVA A NUESTRO ANALITO O ACTIVO DE INTERES

Por las propiedades FÍSICAS Y QUÍMICAS tanto de la FUROSEMIDA así como de la ORINA y de las MINICOLUMNAS C18 (OCTADECILSILANO) utilizadas para el estudio, la opción más lógica a seguir a seguir era la primera, es decir, eliminar todas las impurezas o sustancias endógenas de la orina y eluir posteriormente de una forma más selectiva a la FUROSEMIDA

Para su aplicación la EFS sigue una secuencia de pasos que comprenden los siguientes:

PREPARACION DE LA MUESTRA

ACTIVACION DE LA COLUMNA

APLICACION DE LA MUESTRA

LAVADO DE LA COLUMNA

ELUCION DEL ANALITO O ACTIVO

PREPARACION DE LA MUESTRA

Muchas muestras biológicas pueden requerir dilución, homogenización, disolución o ajuste del pH antes de la limpieza en la minicolumna C18.

En nuestro trabajo el ajuste de pH era importante, ya que la afinidad de la FUROSEMIDA por el material de empaque de las minicolumnas al momento de aplicarla es dependiente del valor de pH, es decir a pH's ácidos (por debajo del valor de pKa que es 3.9 a 25 oC) la FUROSEMIDA estaría menos ionizada y de esta forma la afinidad sería mayor, habría más retención sobre la superficie C18 del material, a pH's por arriba de 3.9 ocurriría lo contrario, la FUROSEMIDA estaría más ionizada y la afinidad disminuiría.

Para ajustar el pH, utilizamos HCl a una concentración de 0.5 N y lo que hicimos fue lo siguiente : a 1 ml de una solución de Furosemida de concentración de 40 ug/ml le adicionamos 1 ml de HCl, homogenizamos. La muestra estaba lista para su aplicación en la columna C18. Por otro lado también preparamos muestras de Furosemida pero sin adicionar HCl, se aplicaron a la columna y recogieron los eluatos, se efectuó la lectura de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para el activo, que era de 232 nm.

Observamos que si las muestras no eran acidificadas antes de ser aplicadas en las columnas, el analito o activo no se retenía y eluía fácilmente de las mismas.

LAVADO DE LA COLUMNA

Esta etapa del procedimiento era una de las más importantes, ya que la eficiencia del lavado dependía grandemente de la capacidad de eliminación de las sustancias o impurezas de la orina.

El primer solvente que utilizamos para realizar el lavado de la columna, una vez que había sido aplicada la muestra con FUROSEMIDA fue agua. Era interesante saber qué cantidad de agua era posible pasar a través de la columna antes de que se eluyera la primer "traza" de analito o activo.

Esto lo determinamos aplicando soluciones de FUROSEMIDA de concentración de 40 ug/ml acidificadas con HCl 0.5 N, a través de una columna y posteriormente pasamos volúmenes de hasta 30 ml de agua a través de la misma, los cuales recogimos a la salida de la columna en eluatos de 2 ml, para determinar posteriormente su lectura de absorbancia.

Ya que nuestro activo era fuertemente retenido en la superficie del material C18 de las columnas, y que el agua como tal no era capaz de arrastrarlo y mucho menos de eluirlo, el siguiente paso era probar la cantidad de impurezas que se pudieran eliminar de una muestra de orina con la misma cantidad de agua utilizada que para una muestra con FUROSEMIDA sola

Por que agua? Como la orina dentro de su composición normal tiene una gran cantidad de sustancias de naturaleza polar, el utilizar agua como solvente en esta fase de lavado, nos facilitaría la eliminación de un buen porcentaje de ellas

Para lo anterior preparamos muestras de 1 ml de FUROSEMIDA a una concentración de 40 ug/ml acidificadas con 1 ml de HCl 0.5 N y por otro lado muestras de 1 ml de orina también acidificadas con HCl pero sin FUROSEMIDA, las aplicamos a las columnas e iniciamos el lavado de las mismas. Los volúmenes de agua para el lavado variaron desde 5 hasta 30 ml con incrementos de 5 ml. Los eluatos los recogimos en fracciones de 1 y 2 ml a la salida de la minicolumna los diluimos en proporciones 1:4 con agua, y posteriormente determinábamos su absorbancia a 232 nm

Prosiguiendo con la limpieza pensamos que solventes como metanol o acetonitrilo serían mucho más eficientes para un lavado más completo de la orina, ya que estos por ser de naturaleza orgánica y ser solubles en agua arrastrarían las sustancias que el agua por sí sola no lo haría

Sin embargo el metanol o acetonitrilo eran solventes demasiado fuertes y arrastraban con mucha facilidad a nuestro activo fuera de la columna. Nuestro lavado tenía que ser más selectivo y teníamos que eliminar solamente todas las impurezas posibles de la orina, pero mantener siempre retenido a nuestro activo

Por lo tanto teníamos que encontrar una mezcla de metanol agua o acetonitrilo agua que fuera la óptima para mantener por un lado adsorbido nuestro activo en la superficie del material de las columnas y por otro que eliminara todo el material posible de las muestras de orina.

Por consiguiente preparamos muestras que contenían 1 ml de solución de FUROSEMIDA a una concentración de 40 ug/ml acidificadas con 1 ml de HCl 0.5 N y muestras con 1 ml de orina también acidificadas con 1 ml de HCl 0.5 N pero sin FUROSEMIDA, y las aplicamos dentro de las columnas, ahora el lavado se hizo de la siguiente manera: pasamos un volumen total de 10 ml de diferentes mezclas de metanol agua y acetonitrilo agua a los porcentajes de 5, 10, 15, 20 y 25% y recogimos los eluatos en fracciones de 2 ml los diluimos con agua en la proporción 1:4 y hacemos su correspondiente medida de absorbancia.

APLICACION DE LA MUESTRA

Las muestras preparadas de FUROSEMIDA así como las de orina se introdujeron en la columna C18 con la ayuda de una jeringa de plástico de 10 ml, la velocidad de goteo mantenida a la salida de la columna fue aprox. de 60 gotas / minuto, este flujo permitió la adecuada interacción de la FUROSEMIDA con el material de empaque de las columnas

ACTIVACION DE LA COLUMNA

Los cartuchos o minicolumnas de Octadecil Silano (C18) se activaban con 5 ml de metanol, seguido de un enjuague con 10 ml de agua. Este paso permitía la solvatación de las cadenas terminales y superficie del material de empaque, así como la eliminación del exceso de solvente.

Este procedimiento se aplicó antes de cada ensayo y al utilizar una nueva columna. Además se lavaban las columnas con 5 ml de metanol después de cada ensayo con orina.

ELUCION DEL ACTIVO

Durante la fase de lavado habíamos logrado eliminar una gran cantidad de impurezas, que tenían la característica de absorber la luz ultra-violeta en la misma longitud de onda que la FUROSEMIDA.

Para eluir o arrastrar de la columna a nuestro analito o activo, teníamos que utilizar un solvente, el cual tuviera la fuerza suficiente para hacerlo, es decir un solvente por el cual nuestro activo tuviera mayor afinidad.

Esta etapa del procedimiento era también bastante importante, ya que la sensibilidad del mismo dependía en gran medida de una adecuada elución, nuestro procedimiento debería tener la capacidad de preparar muestras de orina para determinar FUROSEMIDA en concentraciones del orden de microgramos.

La elución tenía que ser con un solvente capaz de arrastrar en forma completa la FUROSEMIDA, que no arrastrara las impurezas que no habían sido eliminadas durante la fase de lavado y que fuera utilizado en el menor volumen posible.

El metanol tenía la ventaja de eluir completamente a nuestro analito o activo, pero eliminaba aún algunas impurezas que se mantenían todavía retenidas, un comportamiento similar lo presentó el acetonitrilo.

La mezcla de metanol:agua o acetonitrilo:agua en porcentajes de 50, 60, 70, 80 y 90 % eran bastante selectivas pero, no eran capaces de eluir la FUROSEMIDA de forma completa, se tenían que usar hasta 3 ml para hacerlo, era un volumen demasiado grande.

Lo óptimo en esta última fase era utilizar la menor cantidad de metanol o acetonitrilo en combinación con una solución alcalina de NaOH, capaz de eluir a la FUROSEMIDA en forma completa y selectiva .

2.3.2. 2a. FASE. EVALUACION DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA.

En la primera parte de este estudio experimental se desarrolló un procedimiento analítico mediante la técnica de EFS que nos permitió eliminar una gran cantidad de sustancias consideradas como impurezas que se encuentran normalmente en una muestra de orina.

Por lo tanto para evaluar que el procedimiento de limpieza era eficiente y que la cantidad de impurezas de la orina que pudieran aún interferir con la determinación de FUROSEMIDA era mínima, se procedió a realizar ensayos por CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

Para esto teníamos que encontrar primeramente las condiciones cromatográficas óptimas: elegir la fase móvil adecuada así como la columna de separación, la velocidad de flujo de la fase móvil, el volumen de inyección, la longitud de onda, así como la atenuación y los parámetros de integración, para obtener una buena resolución de nuestro activo.

Una vez logrado lo anterior, lo siguiente fue realizar ensayos tanto para muestras de orina adicionadas con FUROSEMIDA como para muestras de orina sola, aplicando el procedimiento antes mencionado, incluyendo la determinación CROMATOGRAFICA.

Por último el procedimiento de limpieza se aplicó también a muestras de orina cargadas con activos como: SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM y ACIDO SALICILICO.

III.- RESULTADOS E INTERPRETACION

III.- RESULTADOS E INTERPRETACION

La mejor forma de realizar la limpieza de una muestra de orina con las minicolumnas C18 de EXTRACCION EN FASE SOLIDA fue la siguiente: eluir selectivamente todas las sustancias o impurezas que se encuentran normalmente o en forma normal en la orina y eluir después de una forma también selectiva nuestro activo.

La gran afinidad que mostró la FUROSEMIDA por la superficie C18 al aplicarla en las minicolumnas, permitió hacer la eliminación de una cantidad considerable de impurezas presentes en la orina que en un momento dado hubiesen podido interferir en la determinación de la misma por CLAR.

El cuadro 1 muestra el comportamiento de FUROSEMIDA cuando es aplicada en solución a una concentración de 40 mcg/ml a través de una columna C18 y el cuadro 2 las impurezas que son eliminadas de una muestra de orina también aplicada pero sin activo. Los valores de las absorbancias fueron determinados después de hacer una dilución 1:1 con agua y la longitud de onda fue de 232 nm. La cantidad aplicada fue de 1 ml de la solución de FUROSEMIDA y 1 ml de orina, la cantidad de agua para el lavado de la minicolumna fue de 30 ml.

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ABSORBIANCIA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.007	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27

**CUADRO 1.- DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA DE FUROSEMIDA ELUIDA DEL CARTUCHO CON 1 ml DE METANOL (TUBO No 17)
FRACCION DE LAVADO (TUBOS 2-16) LA FUROSEMIDA NO ES ELUIDA DEL CARTUCHO DURANTE EL LAVADO CON 30 ml DE AGUA
LA FUROSEMIDA ES RETENIDA EN EL CARTUCHO EN EL MOMENTO DE LA APLICACION (TUBO No. 1)**

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ABSORBIANCIA	> 1	0.98	0.99	0.47	0.41	0.32	0.24	0.23	0.20	0.18	0.16	0.12	0.12	0.12	0.14	0.11	0.39

CUADRO 2.- DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA DE LAS IMPUREZAS ELUIDAS DEL CARTUCHO DURANTE LA FASE DE LAVADO CON 30 ml DE AGUA (TUBOS 2-16)

El lavado del cartucho con agua fue adecuado pero no eficiente, ya que la cantidad de impurezas arrastradas por la misma era enorme (tubos 2-16, cuadro 2) sin embargo en el tubo no. 17 al pasar 1 ml de metanol a través de el cartucho, el valor de absorbancia volvió a elevarse, indicando que había aún impurezas retenidas.

Por otro lado observamos que la utilización de HCl 0.5 N durante la preparación de la muestra con Furosemida, permitió que esta se retuviera fuertemente en la superficie del material C18 de las minicolumnas (cuadro 1), para que posteriormente pudiesemos eluirla con 1 ml de metanol (tubo no. 17).

Los cuadros 3 y 4 muestran el comportamiento de la FUROSEMIDA y el de una muestra de orina, cuando son aplicadas 1 ml de solución de FUROSEMIDA a una concentración de 40 µg/ml y 1 ml de orina a través de las minicolumnas y lavadas posteriormente con 10 ml de una mezcla de metanol agua al 20 %.

10 ml de una mezcla de metanol agua al 20 % resultaron ser más eficientes para el lavado del cartucho, arrastraron una gran cantidad de impurezas de una muestra de 1 ml de orina (cuadro 4, tubos 2-6), sin embargo aún había impurezas retenidas dentro del cartucho, que eran eliminadas con 1 ml de metanol (tubo no 7).

El lavado del cartucho con 10 ml de una mezcla de metanol agua al 20 % no eluía a la FUROSEMIDA (cuadro 3, tubos 2-6). No era posible usar un volumen mayor, ya que la FUROSEMIDA era extraída en fracciones, evitando eluirse de una manera completa.

Un comportamiento similar se observó cuando utilizamos 10 ml de una mezcla de acetonitrilo agua al 20 % para el lavado de la columna C18.

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ABSORBANCIA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34

CUADRO 3.- DETECCIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE FUROSEMIDA ELUIDA DEL CARTUCHO CON 1 ml DE METANOL (TUBO No. 7) FRACCION DE LAVADO (TUBOS 2-6). LA FUROSEMIDA NO ES ELUIDA DEL CARTUCHO DURANTE EL LAVADO CON 10 ml DE UNA MEZCLA DE METANOL-AGUA AL 20: 80 %

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ABSORBANCIA	> 1	> 1	> 1	0.97	0.76	0.66	0.42

CUADRO 4.- DETECCIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE LAS IMPUREZAS ELUIDAS CON 10 ml DE UNA MEZCLA DE METANOL-AGUA 20:80 % DURANTE LA FASE DE LAVADO (TUBOS 2-6).

Al observar los cuadros anteriores, se nota que para eluir a la FUROSEMIDA del cartucho una vez aplicada, era suficiente utilizar, 1 ml de metanol, pero notamos también que para las muestras de orina sola, el metanol eluia aún impurezas.

Por otro lado no podíamos utilizar más de 10 ml de las mezclas de metanol-agua o acetonitrilo-agua al 20 % para el lavado de los cartuchos, ya que la FUROSEMIDA era eluida en fracciones y no de una forma rápida y completa como cuando se utilizaba 1 ml de metanol sólo.

Tampoco se podía utilizar metanol-agua o acetonitrilo-agua en un porcentaje mayor al 20 % porque también teníamos el inconveniente de eluir a la FUROSEMIDA en fracciones. (cuadros 5 y 6).

Para la elución más selectiva de nuestro activo una vez lavado el cartucho, la utilización de 1 ml de una mezcla de acetonitrilo:NaOH 0.1 M 60:40 era la más adecuada, con esta mezcla la recuperación de la FUROSEMIDA era completa y la cantidad de impurezas arrastradas era mínima.

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ABUNDANCIA	0.00	0.00	0.05	0.04	0.04	0.03	0.00

CUADRO 5.- ELUCION DE FUROSEMIDA (TUBOS 3-6) CON 10 ml DE UNA MEZCLA DE METANOL:AGUA 25:75 % DURANTE LA FASE DE LAVADO.

No. DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ABUNDANCIA	0.00	0.00	0.03	0.05	0.05	0.03	0.00

CUADRO 6.- ELUCION DE FUROSEMIDA (TUBOS 3-6) CON 10 ml DE UNA MEZCLA DE ACETONITRILLO:AGUA 25:75 % DURANTE LA FASE DE LAVADO.

Con las observaciones anteriores y con la optimización de las condiciones cromatográficas, el siguiente procedimiento fue establecido y aplicado a la determinación de furosemida en 1 ml de orina:

PREPARACION DEL ESTANDAR

Pesar el equivalente a 50 mg de FUROSEMIDA estándar de referencia, en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 40 ml de metanol G.R. y agitar durante 10 minutos, aforar con metanol. De la solución anterior tomar una alícuota de 4 ml y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con metanol. Esta última solución tiene una concentración de FUROSEMIDA de 20 mcg/ml.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

A 1 ml de orina, adicionar 1 ml de una solución de FUROSEMIDA de concentración de 20 mcg/ml, 1 ml de HCl 0.5 M. Agitar con vortex durante 5 segundos, dejar reposar.

PREPARACION DE LA COLUMNA.

Humectar el cartucho o minicolumna C18 con 5 ml de metanol. Enjuagarlo con 10 ml de agua.

APLICACION DE LA MUESTRA.

Introducir en el cartucho la muestra de orina con FUROSEMIDA con ayuda de una jeringa de plástico de 10 ml, manteniendo una velocidad de goteo de aproximadamente 60 gotas/minuto a la salida del cartucho.

LAVADO DE LA COLUMNA.

Lavar el cartucho C18 con 10 ml de una mezcla de metanol-agua 20 %, manteniendo una velocidad de goteo a la salida del cartucho de aproximadamente 90 gotas/minuto.

EXTRACCION O ELUCION DEL ANALITO.

Eluir la FUROSEMIDA del cartucho C18 con 1 ml de una mezcla de acetonitrilo:NaOH 0.1 M 60:40, manteniendo una velocidad de goteo a la salida del cartucho de aproximadamente 60 gotas/minuto. Recoger el eluato en un tubo de ensaye.

DETECCION DEL ANALITO.

inyectar al cromatógrafo un volumen de 20 µl de la elución anterior. Previamente filtrado con filtro millipore de 0.22 µm.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Columna : M-Bondapack C18 de 250 mm x 4.6 mm de d.i.

Detector : UV ajustado a 212 nm

Fase móvil : metanol/buffer de fosfatos 0.01 M, pH 3.0
(43.5 : 56.5).

Velocidad de flujo : 2 ml/min

Volumen de inyección : 20 µl

Temperatura : ambiente.

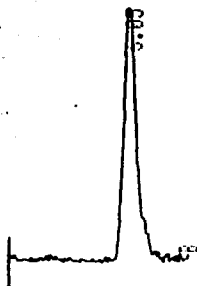


FIG. 1 CROMATOGRAMA DE UNA SOLUCION DE FUROSEMIDA DE CONCENTRACION DE 20 mcg / ml.

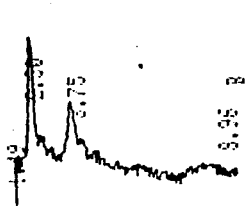


FIG. 2. CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN ELUIDA DEL CARTUCHO C18 CON 1 ml DE UNA MEZCLA DE ACETONITRIL/60% 0.1 M (60:40) PARA UN BLANCO DE URINA.

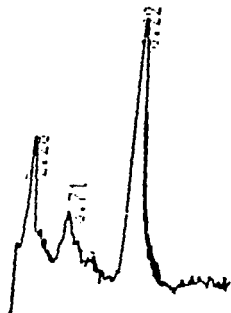


FIG. 3. CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN ELUIDA DEL CARTUCHO C18 CON 1 ml DE UNA MEZCLA DE ACETONITRIL/60% 0.1 M (60:40) PARA UNA MUESTRA DE URINA AÑADIDA CON PURPUREMIDA.



FIG. 4 CROMATOGRAMA DE UNA SOLUCION DE TRIMETOPRIM DE CONCENTRACION DE 20 mcg /ml

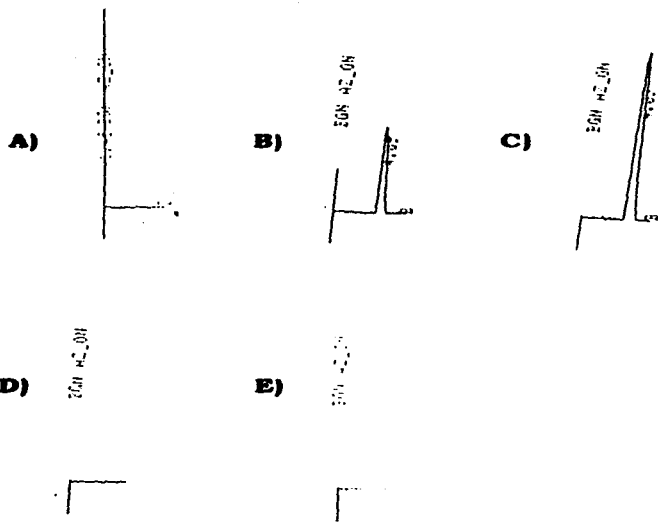


FIG. 5 REMOCION DE TRIMETOPRIM DEL CARTUCHO C18 CON 10 ml DE UNA MEZCLA DE METANOL:AGUA (20:80), DURANTE LA FASE DE LAVADO. LAS FIGURAS B Y C MUESTRAN LOS CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA 2a Y 3a FRACCIONES ELUIDAS (ELUCION DE TRIMETOPRIM). LAS FIGURAS A, D Y E REPRESENTAN LA 1a, 4a Y 5a FRACCIONES ELUIDAS.

ACTIVO	AREA	X _i	S.D.	C.V.
FUROSEMIDA	726316 712774 699212	712774	13542	1.8999
SULFAMETOXAZOL.	437558 447221 419276	441441	5269	1.1935
ACIDO SALICILICO	914512 929187 946801	936876	8991	0.9596

CUADRO 7.- AREAS CORRESPONDIENTES A LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA PARA FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL Y ACIDO SALICILICO

ACTIVO	AREA	X _i	S.D.	C.V.
FUROSEMIDA	675176 681463 687748	681463	6885	0.9222
SULFAMETOXAZOL.	410021 448723 419276	439140	1612	0.3669
ACIDO SALICILICO	899754 910112 926543	912136	13508	1.4809

CUADRO 8.- AREAS CORRESPONDIENTES A LAS MUESTRAS DE ORINA CARGADAS CON FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL Y ACIDO SALICILICO

ACTIVO	PORCENTAJE % +/- I.S.D.
FUROSEMIDA	95 +/- 1.0
SULFAMETOXAZOL	99 +/- 0.4
ACIDO SALICILICO	97 +/- 1.5

PORCENTAJE DE RECUBRO PARA FUROSEMIDA, SULFAMETOXAZOL Y ACIDO SALICILICO

FORMULA PARA EL CALCULO DE PORCENTAJE:

$$\% = \frac{X_2}{X_1} \cdot 100$$

DONDE: X_2 = PROMEDIO DEL AREA DE LA MUESTRA DE ORINA

X_1 = PROMEDIO DEL AREA DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA

S.D. = DESVIACION ESTANDAR

C.V. = COEFICIENTE DE VARIACION

IV.- CONCLUSIONES

IV.- CONCLUSIONES

- 1) LA EXTRACCION EN FASE SOLIDA ES UNA TECNICA ADECUADA PARA LA PURIFICACION O LIMPIEZA DE MUESTRAS DE ORINA DE HOMBRE ADULTO.**
- 2) EL PROCEDIMIENTO DE PURIFICACION O LIMPIEZA MEDIANTE LA TECNICA DE EXTRACCION EN FASE SOLIDA RESULTO SER APLICABLE PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE FUROSEMIDA, EN MUESTRAS DE ORINA (CARGADAS) DE HOMBRE ADULTO, POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.**
- 3) EL PROCEDIMIENTO ES APLICABLE PARA LA DETERMINACION DE SULFAMETOXAZOL Y ACIDO SALICILICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION, EN MUESTRAS DE ORINA (CARGADAS) DE HOMBRE ADULTO A UNA CONCENTRACION DE 20 mcg / ml.**
- 4) EL PROCEDIMIENTO NO ES APLICABLE PARA LA DETERMINACION DE TRIMETOPRIM.**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- **MCDOWAL** . Sample preparation for biomedical analysis
J. of Chromatography 49, 3-58 (1989).
- 2.- **CHAMBERLAIN J.** : Analysis of drugs in biological fluids
Ed. CRC Press, Florida U.S.A. . p 75-81 (1985).
- 3.- **LAURA MARQUEZ NOYOLA** : Manejo de Fármacos en fluidos biológicos y su cuantificación por CLAR. TESIS Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM 1996
- 4.- **MANOP ARUNY AMART and L.J. CLINE LOVE** : Determinations of drugs in untreated body fluids by micellar chromatography with fluorescence detection.
J. of Chromatography 342, 293-301 (1985)
- 5.- **U. LEMM, J. TENCZER and H. BAUDISCH** : Antibody-mediated extraction of the main tetrahydrocannabinol metabolite, 11-nor-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, from human urine and its identification by gas chromatography-mass spectrometry in the subnanogram range.
J. of Chromatography 342, 393-398 (1985).
- 6.- **P. MACAUDIERE, M. CAUDE and ROSSET** : Resolution of enantiomeric amides on a parkle-type chiral stationary phase a comparison of subcritical fluid and liquid chromatography approaches.
J. of Chromatography 371, 177-193 (1986).
- 7.- **JODUEHL, ANNE FARBROT and BERT IVERSEN** : Mobile phase delivery in supercritical-fluid chromatography.
J. of Chromatography 371, 145-152 (1986).
- 8.- **RUFINO LOPEZ ROQUE, GABRIEL ROCHA URRUTIA** : Estudios para la cuantificación simultánea de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
Tesis, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM. (1993).

9.- HUA LIU, M. DELGADO and L. MONTOYA : Simultaneous determination of carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, primidone and their principal metabolites by High-performance liquid chromatography with photodiode-array detection
J. of Chromatography 616, 105-115 (1993).

10.- XIAO-HUA CHEN and JAN PIET F. : Semi-automated solid-phase extraction procedure for drug screening in biological fluids using the ASPEC system in combination with clean screen DAU columns.
Ji of Chromatography 613, 289-294 (1992)

11.- LITTER M. : farmacología Clínica y Experimental; 6a edición; ed. el ateneo, Buenos Aires, Argentina; p.1627-1647 (1983).

12.- GOODMAN L. : Bases Farmacológicas de la Terapéutica; 5a edición, Nueva editorial interamericana, México, p. 280-281, 698-700, 983-939.

13.- JACKSON J. : Clarke Isolation and Identification of Drugs; 2a edición editorial staff, Inglaterra, Londres; p.634-635, 1049-1050.

14.- RUSSEL F. : Solid-Phase Extraction of Furosemide from plasma and urine and subsequent analysis by High-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography 496, 234-241 (1989)

15.- KERREMANS A. : Specimen handling and High-performance liquid chromatography determination of Furosemide.
J. of Chromatography 229, 129-139 (1982).

16.- UCHINO K. : Quantitative determinations of Furosemide in plasma, urine and asites fluid by High-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography 308, 241-249 (1984).

17.- GOCHIN R. : Simultaneous determination of Trimethoprim, Sulphamethoxazole and N-Acetyl Sulphamethoxazole in serum and urine by High-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography 223, 139-145 (1981)

18.- ASCALONE V. Assay of Trimethoprim, Sulfadiazina and it's N-Acetyl metabolite in biological fluids by normal-phase High-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography 224, 59-66 (1981)

19.- ROY M. : El libro básico para cromatografía de líquidos, Florida, U.S.A. (1982) p. 16-25.

20.- ALBERTO QUATTROCCHI : Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires, Argentina 1992

21.- STANISLAW SYPNIEWSKI and EDWARD BALD : Determination of captopril in whole human blood and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and precolum derivatization.
J. of Chromatography A, 729, 335-340 (1996)

22.- J. SOLA, C. PERAIRE and F. PLA: Determination of the anti-platelet-activating factor BN-50727 and metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction.
J. of Chromatography B, 677, 388-392 (1996)

23.- J.O. SVENSSON, Q.Y. YUE and J.AWE : Determination of codeine and metabolites in plasma and urine using ion-pair high-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography B, 674, 49-55 (1995)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CON EL FIN DE REFORZAR LA PARTE BIBLIOGRÁFICA, SE CITA A CONTINUACIÓN UNA LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS QUE EN UN MOMENTO DADO SE PUEDEN CONSULTAR Y QUE ESTÁN RELACIONADAS CON EL TEMA DE TRABAJO.

I.- MATTHIAS KLEINSCHNITZ, MARKUS HERDERICH and PETER SCHREIER : Determination of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.
J. of Chromatography B, 676, 61-67 (1996).

II.- LIU M., WANG G. and TSAI K. : Improved fluorometric quantification of urinary xanthurenic acid
Clinical Chemistry, 42, 397-401 (1996).

III.- DUCHARME J., ABDULLAH S. and WAINER I. : Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity
J. of Chromatography B, 678, 113-128 (1996).

IV.- MAWA R. and Col. : Simple high-performance liquid chromatography separation of oxazepam and its diastereoisomeric glucuronides in serum. Applications in a pharmacokinetic study in sheep.
J. of Chromatography B, 677, 331-338 (1996).

V.- GUPTA R. : Simultaneous determination of zopiclone and its two major metabolites (N-oxide and N-desmethyl) in human biological fluids by column liquid chromatography after solid-phase extraction.
J. of Liquid Chromatography and Related Technologies, 19, 669-709 (1996).

VI.- BARRON D., BARBOSA J., PASCUAL J. and SEGURA J. : Direct determination of anabolic steroids in human urine by on-line solid-phase extraction / liquid chromatography / mass spectrometry.
J. of Mass Spectrometry, 31, 309-319 (1996).

VII.- EGESTAD B. and col. : Chromatographic fractionation and analysis by mass spectrometry of conjugated metabolites of bis (2-ethylhexyl)phthalate in urine
J. of Chromatography B, 677, 99-109 (1996).

VII.- JENKINS A., LIOSA T., MONTOYA Y. and CONE E. : Identification of alkaloids in coca tea
Forensic Science International, 77, 179-189 (1996)

VIII.- MALAVASI B. and ASCALONE V. : Determination of amisulpride, a new benzamide derivate, in human plasma and urine by liquid-liquid extraction or solid-phase extraction in combination with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection Application to pharmacokinetics.
J. of Chromatography B, 676, 107-115 (1996)

IX.- ASCALONE V., RIPAMONTI M. and MALAVASI B. : Stereospecific determination of amisulpride, a new benzamide derivate, in human plasma and urine by automated solid-phase extraction and liquid chromatography on a chiral column Application to pharmacokinetics.
J. of Chromatography B, 676, 95-105 (1996)

X.- HARTONEN K. and RIEKKOLA M. : Detection of beta-blockers in urine by solid-phase extraction-supercritical fluid extraction and gas chromatography- mass spectrometry
J. of Chromatography B, 676, 45-52 (1996)

XI.- BIANCHI V. and DONZELLI G. : Rapid reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the assay of urinary 11-nor-Delta (9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and confirmation of use of cannabis derivatives.
J. of Chromatography B, 675, 162-167 (1996)

XII.- TENG R. and col. : Determinations of trovafloxacin, a new quinolone antibiotic, in biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography
J. of Chromatography B, 675, 51-59 (1996)

XIII.- KUMAZAWA T. and ZUZUKI O. : Detection of cocaine in human urine by solid-phase extraction microextraction and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection.
Japanese J. of Forensic Toxicology, 13, 207-210 (1995)

XIV.- WONG Y. and CHARLES B. : Determination of angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. of Chromatography B, 673, 306-310 (1995)

XV.- TAKENAGA N. and HATA S. : Simultaneous determination of a new anticancer agent (NB-506) and its active metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.
J. of Chromatography B, 674, 111-117 (1995).

XVI.- STRAUSBAUCH M. and col. : Concentration and separation of hypoglycemic drugs using solid-phase extraction-capillary electrophoresis.
J. of Chromatography A, 717, 279-291 (1995).