

78
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS Y
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD PARA
SULFAMETAZINA SODICA EN MATERIA PRIMA Y
PLASMA. DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION
DE SULFAMETAZINA EN PLASMA DE CABRA
POR CLAR.

INFORME DE SERVICIO
SOCIAL TITULACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ANA BELEM TRUJEQUE GARCIA

ASESORES: DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO.
O.F.B JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

260670



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el El informe de Servicio Social: Desarrollo de Métodos Analíticos y Estudios de Estabilidad para Sulfametazina Sódica en Materia Prima y Plasma. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Cuantificación de Sulfametazina en Plasma de Cabra por CLAR., que presenta la pasante: Ana Belem Trujeque García. con número de cuenta: 8902145-3 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga.

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

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de Enero de 1998

PRESIDENTE D.A.R. Juan José Díaz Esquivel.
VOCAL D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez.
SECRETARIO Dra. Raquel López Arellano.
1er. SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera.
2do. SUPLENTE M. en C. Efrén Hernández Baltazar.

NO DESISTAS.

Cuando vayan mal las cosas
Como a veces suelen ir
Cuando ofrezca tu camino
Solo cuestas por subir.

Cuando tengas poco haber
Pero mucho que pagar y
Precises un reír
Aún teniendo que llorar.

Cuando ya el dolor te agobie y
No puedas ya sufrir
Descansar acaso debes
¡pero nunca desistir!

Tras las sobras de la duda
Ya plateadas, ya sombrías
Puede bien surgir el triunfo
No el fracaso que temías.

Y no es dable a tu ignorancia
Figurarte cuán cercano
Puede estar el bien que anhelas y
Juzgas tan lejanos.

Lucha pues por más que tengas
en la brega que sufrir
Cuando todo este peor
Más debemos insistir.

Rudyard Kipling
Escritor británico.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias por permitirme llegar hasta aquí.

A MIS ASESORES

Por la amistad, confianza, apoyo y la ayuda brindada para la realización del presente trabajo.

A EFREN HERNÁNDEZ BALTAZAR.

Por la oportunidad de conocerlo como maestro y amigo. Por su preocupación, amistad y consejos brindados durante el tiempo que convivimos

A JOSÉ GUADALUPE ORTIZ GOVEA

Por escucharme cordialmente, brindarme su cariño, comprensión y ayuda desde el momento en que lo conocí, llenando de paz y alegría mi vida. Por todo su apoyo, aliento y por compartir mi carga, en la realización de este trabajo.

A MI HERMANO.

Me ha enseñado que trabajando duro, con persistencia, paciencia y dedicación se puede lograr lo que se desea.
Julio César Trujeque García

A MI MADRE.

Porque cultivó mi vida, quiero poder demostrarle que no lucho en vano y que no puedo expresarle mi eterna gratitud.
Irma García Galicia

**A DOLORES AGUILAR. SANCHEZ, MARGOT GOMEZ MIRON Y MIGUEL
ANGEL RAFAEL MONSALVO.**

Por todo lo que compartimos juntos durante la carrera, por su amistad leal y sincera que se fortaleció a través del tiempo, con todas la adversidades y alegrías que vivimos juntos gracias.

**A DR. JORGE TORTORA PEREZ, MVZ OSCAR CHÁVEZ Y Q.F.B. ENRIQUE
AMADOR GONZALEZ.**

Por las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo.

**Agradezco a las siguientes organizaciones por su apoyo para la realización
de éste trabajo:**

PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación
tecnológica)

Fundación UNAM

CONACYT (consejo Nacional de Ciencia y Tecnología)

Importadora y Manufacturera Bruluart S.A.

Becton Dickinson de México S.A. de C.V.

HELM S.A.

International Química Carter.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y sus profesores.

Por darme una educación profesional.

DEDICATORIAS

A MI PADRE (QEPD).

Donde te encuentres, espero estés orgulloso de mí, porque los consejos que me inculcaste desde niña siempre los tendré presentes en mi vida.
César Trujeque Alvarado

A VICTOR TRUJEQUE GARCÍA (QEPD).

Lo que lograste en tu corta vida me sirvió de inspiración, lo poco que convivimos realmente dejó en mi una huella imborrable y siempre te recordaré con mucho cariño.

KARLA TRUJEQUE Y MIRIAM GARCIA.

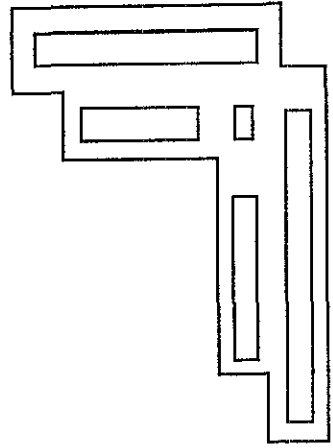
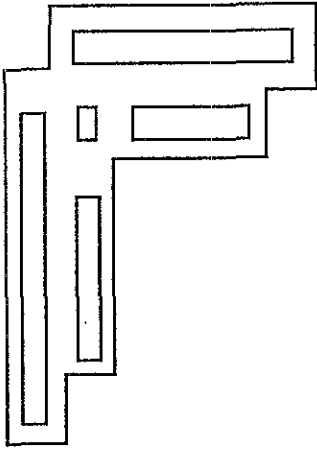
Que les sirva como inspiración para lograr alcanzar cada una de sus metas fijadas en ésta vida. Que nada es imposible, sólo es necesario proponérselo.

A las futuras generaciones

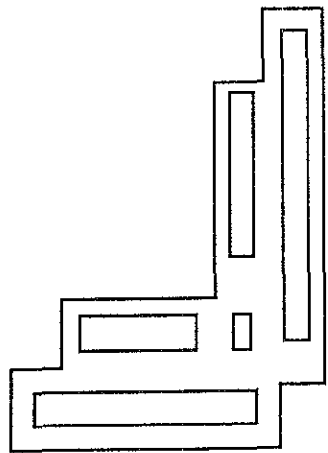
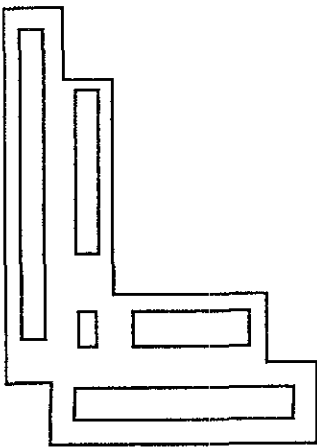
Espero les sirva para adquirir conocimientos acerca de ésta área

A mis amigos por la íntima alegría de haberlos conocido:

Dolores Aguilar., Margot Gómez., Miguel Angel Rafael., Guillermo Montoya, Ruben Arreola, Salvador Sánchez, Mariela Narvaez, Angélica María Mendoza, Lourdes Sánchez M., Emilia Aurora H., Magdalena Bermejo, Yaneli Alejandre P., kenia Márquez G., Guadalupe Morales M., Densa, Guadalupe Vázquez.



INDICE



INDICE

CONTENIDO	Pag
1 Introducción.....	1
2 Objetivos.....	2
CAPITULO I. Marco teórico.	
1. Características Físicoquímicas de Sulfametazina.....	3
2. Farmacología de sulfametazina.....	5
2.1. Farmacocinética.....	5
2.2. Concentración en la sangre de las sulfonamidas.....	6
2.3. Relación estructura-actividad de la sulfametazina.....	8
2.4. Indicaciones terapéuticas para las sulfonamidas.....	8
2.5. Generalidades sobre la coccidiosis.....	9
3. Descripción de la matriz muestra.....	9
4. Métodos de preparación de muestras para el análisis cromatográfico.....	10
4.1. Dilución.....	11
4.2. Precipitación de proteínas.....	11
4.3. Filtración.....	12
4.4. Ultrafiltración.....	12
4.5. Diálisis.....	13
4.6. Extracción Líquido Líquido.....	13
4.7. Extracción en Fase Sólida.....	16
4.7.1. Desarrollo de un método por Extracción en Fase Sólida.....	16
4.7.2. Metodología para la extracción en fase sólida.....	19
4.7.3. Mecanismo de retención.....	22
5. Cromatografía Líquida de Alta resolución.....	24
5.1. Definición.....	24
5.2. Equipo Cromatográfico.....	24
5.3. Bases de la separación.....	25
5.4. Clasificación de la Cromatografía Líquida.....	26
6. Desarrolló de un método cromatográfico.....	28
6.1. Importancia del uso del detector de arreglo de fotodiodos.....	32
7. Análisis cuantitativo.....	38
7.1. Normalización interna.....	39
7.2. Estándar interno.....	40
7.3. Estándar externo.....	41
7.4. Estándar agregado.....	42
8. Validación de métodos bioanalíticos.....	43
8.1. Linealidad.....	43
8.2. Precisión.....	44
8.3. Exactitud.....	45
8.4. Limite de detección.....	46
8.5. Limite de cuantificación.....	46
8.6. Especificidad.....	47
8.7. Estabilidad de la muestra.....	47

CAPITULO II. Desarrollo experimental	
1. Equipo, material, reactivos y soluciones.....	48
2. Etapa I. Desarrollo del método de preparación del plasma.....	50
2.1. Comportamiento de muestras de sulfametazina preparadas en agua en el proceso de extracción.....	50
2.2. Comportamiento de muestras de sulfametazina preparadas en plasma en el proceso de extracción.....	53
3. Etapa II. Desarrollo del método cromatográfico para cuantificar sulfametazina.....	57
CAPITULO III. Validación.	
1. Equipo, material, reactivos y soluciones.....	64
2. Ensayo analítico para sulfametazina en plasma.....	65
3. Plan de validación.....	68
3.1. Validación del sistema.....	69
3.2. Validación del método.....	69
3.3. Criterios de aceptación.....	72
4. Resultados y Discusión de la validación del sistema.	73
4.1. Linealidad.....	73
4.2. Precisión.....	78
5. Resultados y Discusión de la validación del método.....	80
5.1. Especificidad.....	80
5.2. Linealidad.....	84
5.3. Precisión y exactitud.....	88
5.4. Repetibilidad entre días y reproducibilidad.....	90
5.5. Limite de detección y de cuantificación.....	91
5.6. Estabilidad de la muestra en la matriz biológica.....	95
5.7. Estabilidad de la muestra en el disolvente de elución.....	97
CAPÍTULO IV. Conclusiones.	
1. Conclusiones	100
ANEXOS	
Anexo 1: Abreviaturas.....	101
Anexo 2: Preparación de soluciones.....	102
Anexo 3: Programación del estudio de estabilidad para muestras de sulfametazina...	104
Anexo 4: Fórmulas utilizadas para la validación del método analítico.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	109

1. INTRODUCCIÓN

La sulfametazina sódica es uno de los fármacos de elección para el tratamiento de coccidiosis en cabras. Una de sus formas de administración es por bolos de liberación controlada. Para producir una respuesta adecuada durante un tiempo prologando es necesario que el bolo libere la sulfametazina de tal manera que se logre un nivel de concentración óptimo y se mantenga durante el tiempo adecuado del tratamiento.

Para evaluar la eficacia de los bolos es necesario determinar su biodisponibilidad. Para realizarlo se deben estimar las concentraciones de sulfametazina en plasma de cabra, por lo que es indispensable un método analítico que permita la cuantificación en plasma con precisión, exactitud, especificidad y reproducibilidad. La cromatografía líquida de alta resolución es adecuada para este tipo de evaluaciones; sin embargo es importante la preparación del plasma antes de su análisis cromatográfico ya que no es conveniente que se inyecte directamente porque puede obstruir las tuberías, filtros y columna del sistema cromatográfico por su alto contenido de proteínas.

Dada la importancia que tiene determinar la biodisponibilidad de sulfametazina en cabra se desarrolló y validó un método analítico para cuantificarla en plasma de cabra utilizando para el análisis la cromatografía líquida de alta resolución.

El presente reporte se dividió en cuatro capítulos.

En el capítulo I se describen las características fisicoquímicas de la sulfametazina (Solubilidad, punto de fusión, constante de acidez, constante de partición, características espectrofotométricas), así como las farmacocinéticas (la velocidad de eliminación, sus productos y mecanismo de biotransformación). También se encuentra los métodos reportados para cuantificar Sulfametazina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y los métodos para preparar muestras de origen biológico como plasma, suero, leche y orina. Tal información ayudó a seleccionar las condiciones de análisis para la sulfametazina en plasma de cabra por Cromatografía Líquida de Alta resolución, para lo cual se utilizó el equipo cromatográfico Waters® (modelo).

El capítulo II contiene el desarrollo del método analítico para cuantificar sulfametazina en plasma. Éste a su vez se divide en dos partes. En la primera parte se estudió el efecto de las variables que podían afectar la extracción en fase sólida de la sulfametazina en plasma de cabra. Las variables estudiadas fueron: la velocidad de Flujo con la que se hace la extracción, el volumen de plasma, la naturaleza y el pH del eluyente.

En la segunda parte se estudió la composición de la fase móvil y su efecto sobre la pureza del pico cromatográfico de sulfametazina.

El capítulo III contiene los procedimientos que se aplicaron para la validación del método analítico desarrollado. En éste se presentan los resultados de la validación y su discusión. Las características que se evaluaron del método fueron linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección y cuantificación. La estabilidad de la sulfametazina en plasma y metanol a temperatura de refrigeración.

Finalmente en el capítulo IV se presentan las conclusiones basándose en los objetivos propuestos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar y validar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para cuantificar sulfametazina en plasma de cabra.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar las condiciones de preparación de la muestra de plasma de cabra para el análisis cromatográfico.

Seleccionar las condiciones cromatográficas para cuantificar sulfametazina en muestras de plasma de cabra.

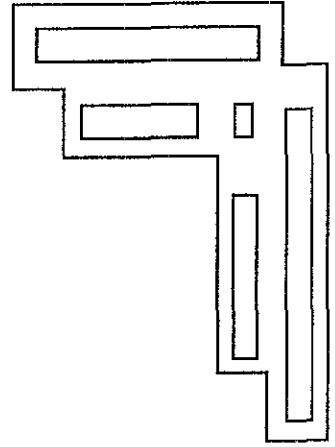
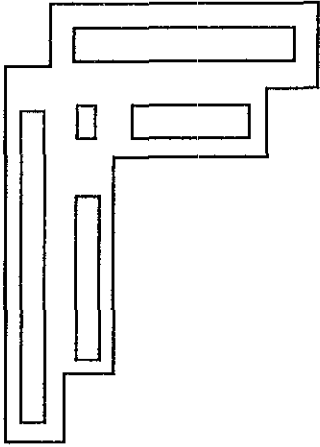
Validar el método cromatográfico establecido.

OBJETIVO SOCIAL:

Disminuir la enfermedad de coccidiosis en cabras y por consiguiente aumentar la producción de carne caprina.

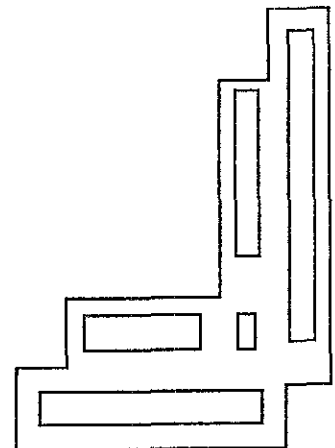
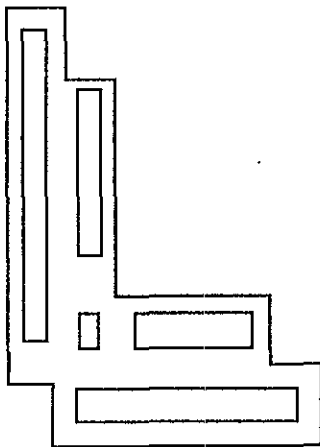
OBJETIVO ACADÉMICO:

Facilitar a los estudiantes de la carrera de Q.F.B. entender cómo se desarrolla y se validan métodos bioanalíticos para estudios de biodisponibilidad y farmacocinética.



CAPÍTULO I.

MARCO TEÓRICO



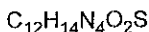
1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA SULFAMETAZINA

(Florey, K.1978 p 403,408)

SINÓNIMOS:

Sulfametazina
Sulfadimerazina
Sulfadimidina
Sulfamidina
Sulfadimetilpirimidina
4-Amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil) bencenosulfonamida
N⁴-(4-6-dimetil-2-pirimidil)sulfanilamida
4,6-Dimetil-2-sulfanilamidopiridinina.

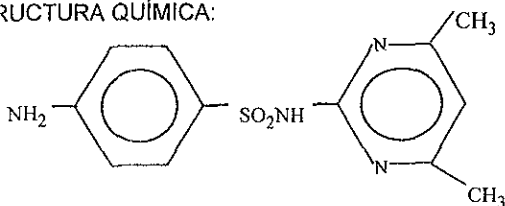
FÓRMULA CONDENSADA:



PESO MOLECULAR:

278.33 g/mol

ESTRUCTURA QUÍMICA:



APARIENCIA, COLOR Y OLOR:

Es un polvo blanco o blanco amarillento, casi inodoro, el cual puede oscurecerse por la exposición a la luz. Presenta un sabor ligeramente amargo.

ESPECTRO ULTRAVIOLETA:

La sulfametazina en solución acuosa a un pH de 6.6 muestra dos picos uno a 241 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 670$) y otro a 255 nm.

La sulfametazina en solución con NaOH muestra dos picos a 243 y 257 nm con $E_{1cm}^{1\%}$ de 765 y 776 respectivamente.

SOLUBILIDAD:

Casi insoluble en agua, soluble 1 en 120 de etanol, 1 en 2500 de éter y 1 en 600 de cloroformo, soluble en ácidos minerales diluidos y en soluciones acuosas de álcali (hidroácidos y carbonatos).

RANGO DE FUSIÓN:

Según la USP XIX el rango de fusión para la sulfametazina es de 197-200°C utilizando el procedimiento 1

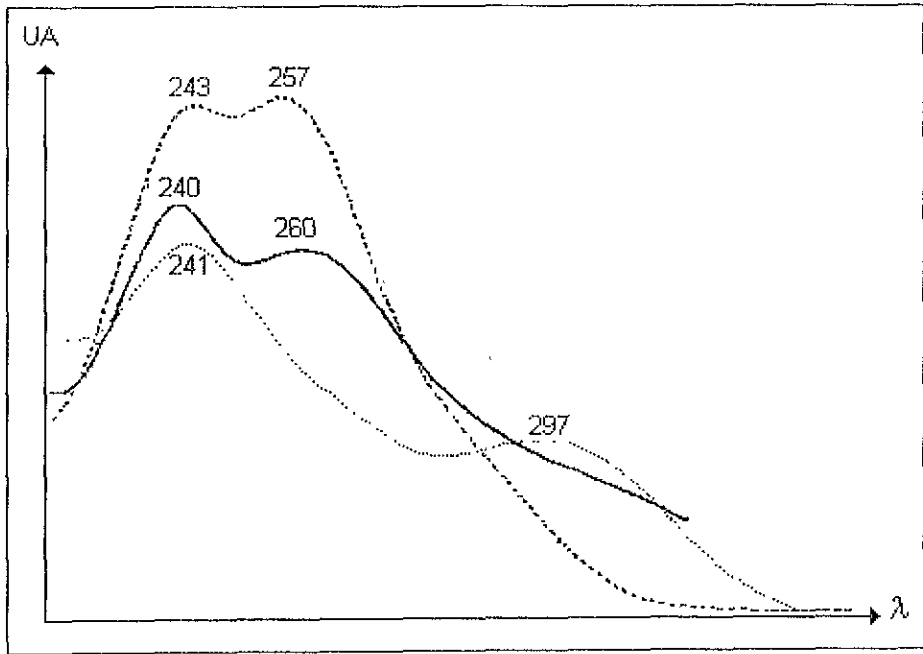
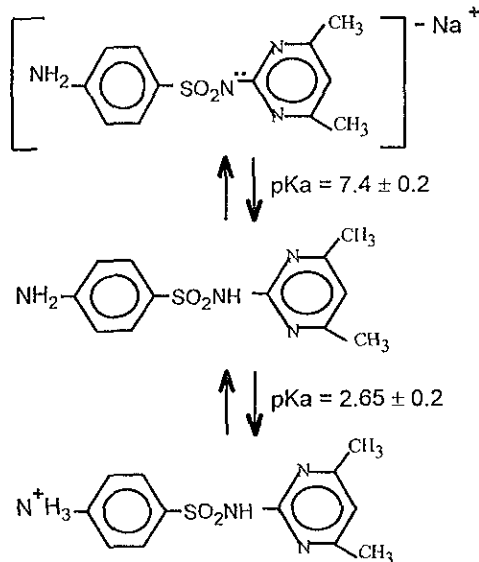


Figura 1. Espectro ultravioleta de soluciones acuosas de sulfametazina en agua (—) en HCl 0.01N (.....), y en 0.01 N de NaOH (— · — ·).

CONSTANTE DE DISOCIACIÓN:



2. FARMACOLOGÍA DE LA SULFAMETAZINA

2.1 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE SULFAMETAZINA.

ABSORCIÓN.

El paso del sitio de absorción a sangre para las sulfonamidas es gobernado por la difusión pasiva. La velocidad a la que se dé está absorción, está influida por diferentes factores como el grado de ionización, la lipofilidad del fármaco, área y vascularidad del sitio de absorción y liberación de la formulación. Las sulfonamidas se absorben en el tubo digestivo con mayor rapidez y de modo más completo en los carnívoros que en los herbívoros. Los compuestos pirimidícos como la sulfametazina se absorben bien.

La biodisponibilidad y la velocidad de absorción de la Sulfametazina varía marcadamente cuando el fármaco es administrado al ganado vacuno en diversas formas de dosificación. La Sulfametazina es absorbida rápidamente cuando es dada oralmente como una solución y en bolos de rápida desintegración; pero es absorbida más lentamente cuando se administra en bolos de liberación controlada.

La liberación de sulfametazina desde los bolos de liberación controlada es un factor limitante en la velocidad de absorción para la Sulfametazina. Booth, N. en 1988 reporta los siguientes datos de biodisponibilidad de la Sulfametazina: 94% para solución, 78 para bolos de rápida desintegración y 43% para bolos de liberación controlada

La absorción de la sulfametazina en los animales enfermos puede ser diferente a lo observado en animales sanos de la misma especie. El rumén en éxtasis, producido con atropina reduce marcadamente la absorción de la sulfametazina administrada oralmente a ovejas. La diarrea incrementa la velocidad de absorción de la sulfametazina en becerros alimentados con leche. Sin embargo, la fiebre inducida por pirógenos no altera la velocidad de absorción de la sulfametazina administrada oralmente a cabras.

DISTRIBUCIÓN.

Los niveles máximos sanguíneos de la sulfametazina se presentan generalmente de 2-3 horas después de su ingestión; lo cual se ve influenciada por el estado de ionización de la sulfonamida, vascularidad de los tejidos específicos, la presencia de barreras específicas de la difusión de sulfonamidas (Booth, N. 1988 p 787-788). En un estudio que se realizó en cabras enanas en África la sulfametazina fue encontrada ligada a proteínas principalmente a albúmina en un 58.9 ± 3.6 % (Shetty y Asuzu, 1989 p 928-932), dentro de este estudio se menciona que la sulfametazina por poseer un valor de pKa (7.4) semejante al valor de pH del cuerpo puede ser distribuida más eficientemente, pero se encontró que presenta menor uniformidad en la distribución debido a que por estar en mayor proporción unida a proteínas presenta una menor disponibilidad para cruzar por difusión la membrana celular. Para ser terapéuticamente activa una sulfonamida por lo común debe alcanzar una concentración de 8-12 mg de fármaco libre por 100 ml. de sangre (Katzung, B. 1984 p 539). La distribución de las sulfonamidas en varios tejidos y fluidos ocurre como resultado de una difusión pasiva (Booth, N 1988 p 787-788)

BIOTRANSFORMACIÓN

La sulfametazina sufre acetilación en el hígado aproximadamente de un 70 a 90%, las enzimas que catalizan la acetilación se encuentran en las células parenquimales del hígado. De este porcentaje acetilado un 30% se encuentra en sangre y un 60% se encuentra en orina, estos porcentajes varían de acuerdo a la especie animal. El compuesto acetilado es terapéuticamente inactivo y ligeramente soluble en orina.

La biotransformación de la sulfametazina ha sido estudiada en varias especies: en Humanos, ganado, gallinas, conejos, cerdos, caballo, cabra, mono y rata ((Florey, K.1978 p 403,408)

EXCRECIÓN

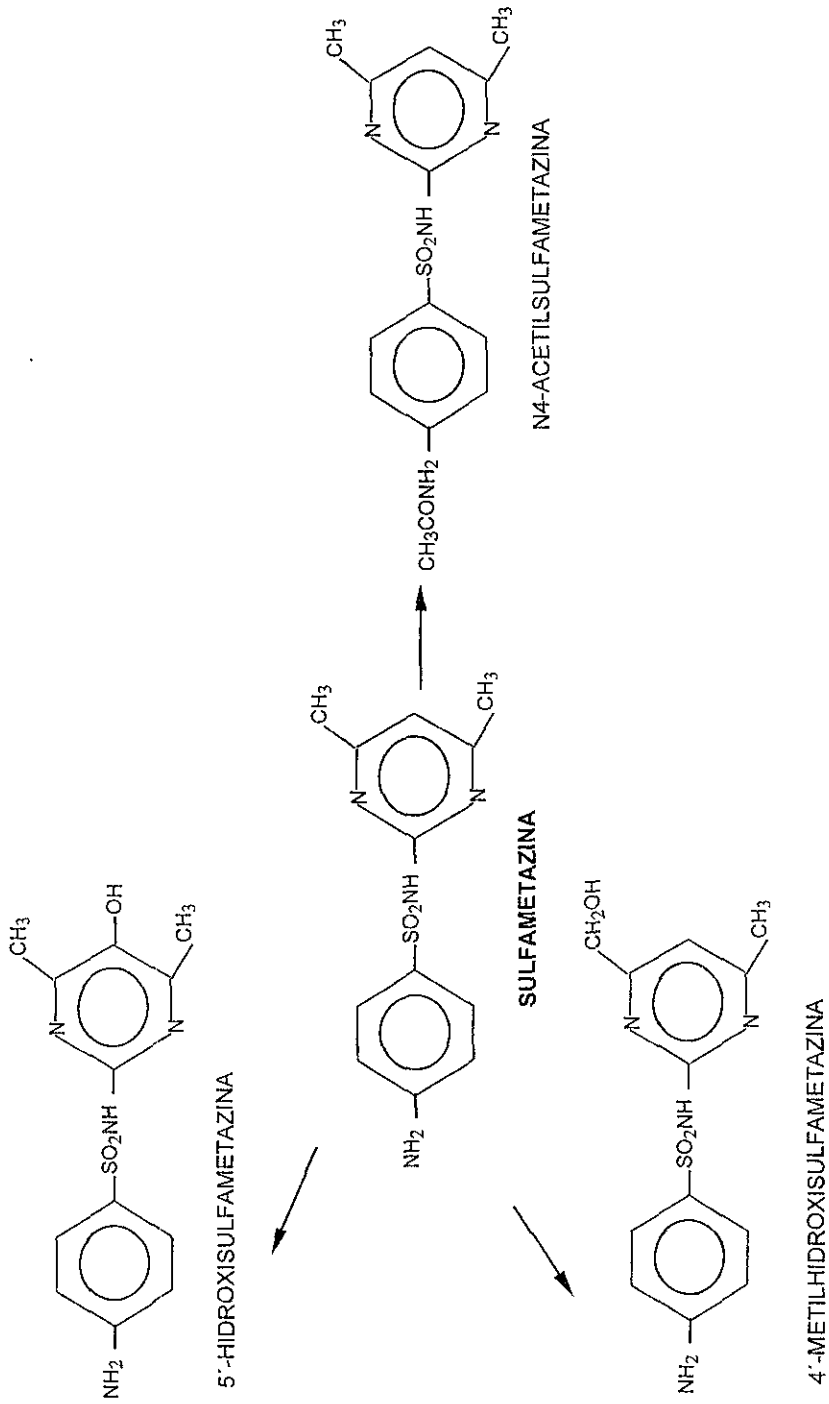
La sulfametazina es excretada principalmente por orina debido a que sus compuestos acetilados son solubles en la orina. Su excreción guarda una relación estrecha con el pH y el volumen de orina excretada; si los fluidos tubulares tienen un valor de pH entre los dos pKs de la sulfametazina ($7.4 > \text{pH} > 2.6$) se favorece la formación de su forma no ionizada facilitando su reabsorción y disminuyendo su excreción, mientras que, a valores de pH extremos ($7.4 < \text{pH} < 2.6$) favorecen su ionización disminuyendo la cantidad absorbida y excretándose. Otro factor de igual importancia en la excreción es el grado de "depuración renal" el cual es la cantidad de sulfametazina excretada por los glomerulos y no reabsorbida por los túbulos (Booth, N. 1988 p 787-788). En pequeñas cantidades se excreta en la bilis, jugo pancreático, jugo intestinal, saliva y leche. En un estudio (Witkamp, R.1993 p 55-62) se reportó, el efecto del sexo sobre el $t_{1/2}$ (tiempo de vida media) de la sulfametazina en cabras, para cabras hembras el $t_{1/2}$ es de 2.13 ± 0.8 y machos de 8.7 ± 3.0 horas.

2.2 CONCENTRACIÓN EN LA SANGRE DE LAS SULFONAMIDAS.

Se necesita un nivel óptimo de sulfonamida en la sangre para producir la respuesta terapéutica adecuada. El nivel no debe ser demasiado bajo, porque la acción antibacteriana disminuida puede permitir que el organismo patógeno adquiera resistencia al fármaco. Tampoco debe ser un nivel demasiado alto porque puede producir efectos tóxicos. No es posible fijar las concentraciones necesarias de sulfonamidas en la sangre para la acción antibacteriana, porque la susceptibilidad de las bacterias patógenas varía entre límites amplios. Generalmente, se aceptan valores óptimos que producen efecto terapéutico suficiente. Se estima una concentración de 8 a 15 mg/100 ml de sangre para el tratamiento de la mayoría de las infecciones con sulfanilamida, sulfapiridina, sulfadiazina, sulfamerazina y sulfametazina en humanos y de 5mg/100ml en animales (Brander and Pugh, 1971 p 369).

Dentro de ciertos límites la concentración de sulfonamidas en la sangre es una medida de la dosificación. La efectividad de las sulfonamidas va a depender de factores tales como: el porcentaje de fármaco unido a proteínas, la biotransformación del fármaco y el mecanismo de defensa del huésped.

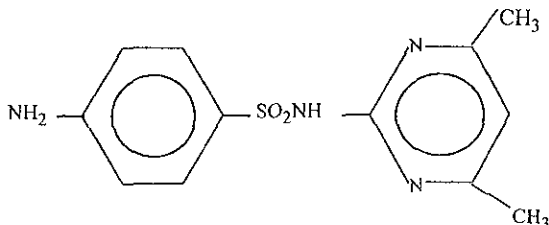
Figura 2. Productos de biotransformación de la sulfametazina. (VAN'TKLOOSTER, G. 1991 p 157-168)



2.3 RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD

(Goodman, G. 1982 p. 1088)

SULFAMETAZINA .



La sulfametazina deriva de la estructura general de las sulfonamida, el ácido sulfanílico y es ésta estructura la que reúne los requerimientos químicos básicos y mínimos para su acción antibacteriana.

El grupo para NH_2 de la sulfametazina es esencial para la máxima actividad antibacteriana.

El grupo SO_2NH_2 no es esencial para la actividad antibacteriana, en forma original, pero el átomo de azufre sí lo es; éste debe de estar ligado al anillo bencénico directamente.

Por poseer la sulfametazina un anillo heterocíclico (pirimidina) sustituido en NH presenta mayor potencia antibacteriana y menor toxicidad con respecto a aquellos principios activos que no lo poseen.

Si se sustituye un hidrógeno de cualquier carbono del anillo bencénico se obtienen compuestos inactivos.

2.4 INDICACIONES TERAPEUTICAS PARA LAS SULFONAMIDAS

(Cuellar, O A.1986 p 103-108)

Las sulfonamidas han sido recomendadas para la prevención y/o tratamiento de la coccidiosis en ganado. La sulfametazina es un activo de alta degradación agonista de Streptococos y E. Coli, pero con actividad adicional en Stafilococos, Salmonella y Pasteurella. El hecho de que el tratamiento sea exitoso depende de que la población infectada sea sensible al tratamiento y las concentraciones que se logren en sangre y tejido, así como de las defensas celulares y humorales del hospedador. Clínicamente las sulfonamidas han demostrado mejores resultados cuando son administradas durante estados de infección aguda, porque durante este período los mecanismos de defensa humoral y celular del hospedador están movilizados y actúan conjuntamente con los efectos del fármaco; debido a esto la terapia con sulfonamidas en infección crónica no es recomendable.

2.5 GENERALIDADES SOBRE LA COCCIDIOSIS

(Quiroz, R.1984 p 130, 135)

Conocida también como enteritis o diarrea sanguinolenta es una enfermedad infecciosa parasitaria debida a la presencia y acción de protozoarios del genero Eimeria. Se caracteriza por diarrea, con sangre y anemia. Ataca la luz del tracto gastrointestinal provocando destrucción de células y tejido. El daño físico causado a las células epiteliales del intestino provocan interferencia en la absorción de nutrientes tales como aminoácidos, carbohidratos, minerales, etc. Generalmente, se presenta en animales jóvenes (de cuatro a seis meses de edad) en forma aguda, mientras que en los adultos es crónica.

La pérdida de peso ocurre por la disminución en la absorción de los nutrientes, pero también por la pérdida de agua, sangre y tejido. Como resultado, se retarda el crecimiento y generalmente se requiere un periodo largo de tiempo para que el animal alcance un peso específico y por lo tanto requiere de mayores cantidades de alimento. Entre los agentes terapéuticos recomendados para el tratamiento de la coccidiosis se utiliza la sulfametazina.

Esta enfermedad es común entre las cabras, que la contraen al absorber las larvas infestantes mientras están pastando.

3. DESCRIPCIÓN DE LA MATRIZ MUESTRA

El plasma se obtiene por la adición de anticoagulante (EDTA) en la sangre seguido de una centrifugación (15 min x 3000 rpm) y separación del sobrenadante el cual está constituido por plasma.

El plasma de cabras es incoloro, ligeramente amarillo. El color amarillento se debe a la bilirrubina, en menor grado a los carotenos y otros pigmentos provenientes de la dieta del animal (French, M. 1975).

Los valores aproximados de algunos componentes del plasma sanguíneo de cabra se mencionan en la Tabla I.

Tabla I. Componentes plasmáticos de la cabra
(French, M. H. 1975)

COMPONENTE	mg/100ml
Asparagina	1,0
Ac. Aspártico	0,1-0,2
Glucosa	50 - 80
Acetato	4 - 11
Propionato	< 0 2
PROTEÍNAS PLASMATICAS	mg/100ml
Fibrinógeno	600
Albumina	3960
Globulina	2710
Proteínas	6670

4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

(McDowall, R. 1989 p 3-58)

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja.

Los tejidos, la leche, heces, sangre, plasma u orina son matrices biológicas. Estas, están constituidas de compuestos inorgánicos y orgánicos tales como carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales.

El tratamiento de la matriz biológica involucra uno o más pasos de separación con el objeto de eliminar el mayor número de impurezas y compuestos extraños a la sustancia de interés. En principio, se pueden seguir dos caminos: a) remoción de la mayoría de impurezas de la muestra, b) separación de las sustancias de interés de la muestra. En ambas ocasiones se combinan para mejorar los resultados.

El tratamiento de una muestra biológica puede tener diversos objetivos. Estos incluyen :

- Remover proteínas o material no proteico que puede interferir con la determinación del analito.
- Remover el material no deseado, si el poder de resolución de la columna cromatográfica es insuficiente para separar todos los componentes de la muestra completamente o en un tiempo razonable.
- Remover el material que podría afectar la resolución cromatográfica o reproducibilidad.
- Solubilizar los compuestos de interés para ser inyectados bajo las condiciones cromatográficas preestablecidas..
- Concentrar al analito dentro de los límites de detección de un instrumento a utilizar.
- Diluir para reducir la fuerza del solvente o evitar la incompatibilidad de solventes,
- Remover el material que puede bloquear los filtros, válvula, columna, o tubería de un aparato cromatográfico
- Estabilizar el analito para evitar degradación hidrolítica o enzimática.

Una vez definido el (o los) objetivo (s), es necesario seleccionar el método más apropiado para preparar la muestra y éste dependerá de diversos factores como son:

- Las propiedades físicas y químicas del analito.
- La concentración del analito en la muestra.
- El tipo de matriz involucrada.
- Forma en la que se presenta el analito en la muestra.
- Características del método para cuantificar el analito.
- Tipo de detector de la señal analítica.
- Objetivos del método de análisis.

Así la naturaleza de la muestra como los factores anteriormente descritos dictan el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede, como primera aproximación, inyectarse directamente con una previa filtración, en cambio si es sólido es necesario molerlo y homogenizarlo apropiadamente. Posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz deben solubilizarse en un solvente adecuado. Estos solventes deben seleccionarse por su poder solubilizante del analito y su bajo poder solubilizante de los componentes de la matriz de la muestra o de aquellas sustancias que puedan dañar las columnas o el equipo cromatográfico.

Tanto para la preparación de la muestra, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como son:

- Dilución
- Precipitación de proteínas
- Filtración
- Ultrafiltración
- Diálisis
- Extracción Líquido - Líquido
- Extracción en Fase Sólida

A continuación se describe cada uno de ellos.

4.1 DILUCIÓN.

(McDowall, R. 1989 p 3-58)

Este método es utilizado cuando un analito se presenta en una concentración demasiado alta o cuando el sistema de detección es específico (detector de fluorescencia, índice de refracción), entonces se hace una dilución de la muestra y este procedimiento es el más sencillo en la preparación de las muestras para el análisis.

El líquido utilizado para la dilución de la muestra puede ser agua, buffer, o un solvente orgánico, el cual se adiciona a la muestra y si es necesario se centrifuga para remover partículas de materia. El líquido de dilución puede tener diversas funciones, reduce las señales dadas, que son debidas a material endógeno en la matriz, reduce la viscosidad o fuerza iónica de la muestra, asegura la compatibilidad de la muestra con la fase móvil si el método de análisis es por CLAR, o rompe los enlaces débiles entre el analito y las proteínas del plasma.

4.2 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

La remoción de proteínas por desnaturalización o precipitación es un método efectivo para muestras de sangre completa y plasma. El objetivo principal de esta técnica es remover proteínas que pueden precipitar cuando se encuentran en contacto con la fase móvil y bloquear la tubería e incrementar la presión del sistema o deterioro del funcionamiento de la columna de CLAR.

Algunas ventajas de esta técnica son la velocidad y la sencillez a la cual la muestra puede ser preparada, sin embargo, las desventajas son: la pérdida del analito por la inclusión de éste en el precipitado y la estabilidad a valores de pH bajos cuando se utilizan ácidos fuertes. Si el sobrenadante es inyectado directamente hacia el sistema de CLAR éste deberá ser compatible con la fase móvil; pero si difiere mucho de ésta, es necesario emplear una solución capaz de amortiguar el valor del pH. El tipo de agentes mas comúnmente usados para precipitar proteínas son, ácidos, solventes orgánicos, sales inorgánicas y iones metálicos (McDowall, R. 1989 p 3-58).

En un estudio realizado por Bianchard, J (1981, p 455-460) sobre agentes precipitantes de proteínas se demostró que el ácido tricloroacético al 10% (p/v) y el ácido perclórico al 6% (p/v) son muy eficientes para precipitar proteínas (aprox. del 99.8% al 98.3%), sin embargo, el valor del pH del sobrenadante obtenido es muy bajo (1.4 a 2.0) y el analito debe ser estable para estas condiciones.

Durante la precipitación de proteínas se diluye el analito y en consecuencia será necesaria una operación para concentrar la sustancia de interés para ser analizada.

4.3 FILTRACIÓN

(Quattrocchi, O. 1992 p 211)

Tanto las muestras como los estándares al inyectarlos en un sistema cromatográfico deben estar totalmente libres de partículas en suspensión ya que las partículas presentes en las muestras pueden rayar los sellos del inyector o bloquear algún componente del equipo por lo tanto es necesaria la filtración para evitar dicho problema. Ésta se realiza en filtros desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 ó 0.22µm de un material apropiado; estos filtros se seleccionan de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras.

4.4 ULTRAFILTRACIÓN

(McDowall, R. 1989 p 3-58)

La ultrafiltración puede ser usada con dos objetivos; uno para medir las concentraciones de analitos libres o no enlazados a proteínas de plasma o suero, y otro, para la limpieza de la muestra. En la ultrafiltración se emplean membranas en forma de cono, que se ajustan a tubos de centrifuga; las alícuotas de la muestra son colocadas en la parte superior de los conos y centrifugadas ligeramente. Las membranas permiten el paso a moléculas demasiado pequeñas al límite de exclusión.

Virtualmente con este método todas las proteínas en el plasma pueden ser removidas, pero una desventaja potencial de éste, es la unión del analito a la membrana. Una de las mayores ventajas de la ultrafiltración sobre la diálisis es su velocidad, especialmente cuando la cavidad de las fibras de la membrana son usadas. La ventaja de esta técnica sobre la precipitación de proteínas es su aplicabilidad a volúmenes pequeños de muestra en donde no ocurre una dilución durante la filtración. La degradación de compuestos lábiles es evitada debido a que no se manejan valores de pH extremadamente ácidos. Por otro lado si un analito es biotransformado por alguna enzima plásmatica, la remoción de ésta por ultrafiltración deberá estabilizarlo por la eliminación de la fuente de su degradación.

4.5 DIÁLISIS.

La diálisis puede separar un analito a partir de la matriz por difusión a través de una membrana semipermeable. La membrana restringe el tamaño de molécula que puede pasar a través de ella permitiendo que sólo compuestos de masa molecular pequeña la atraviesen y no permite el paso de macromoléculas al medio de diálisis. La difusión es un proceso lento y es manejado por gradiente de concentración la cual continua hasta un equilibrio establecido; por lo tanto la máxima recuperación de los analitos en equilibrio es el 50%, asumiendo que los volúmenes de muestra y del medio de diálisis son los mismos. Sin embargo la diálisis puede ser aplicada solo a compuestos que están débilmente unidos a proteínas o que no encuentran unidos a estas y para los que se encuentran unidos fuertemente a proteínas se requiere previamente de romper su enlace. El uso de diálisis para la preparación de muestras podría normalmente ser desalentador porque puede involucrar mucho trabajo tedioso y una gran dilución de la muestra.

4.6 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO .

La extracción líquido-líquido es la distribución (partición) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está determinada por el equilibrio entre la concentración del analito en la fase acuosa y en la fase orgánica. La distribución del analito entre estas dos fases será influenciada por los solventes de extracción escogidos, el valor del pH de la fase acuosa, el volumen usado de ambas fases, la temperatura, la saturación de cada fase y la fuerza iónica. La condición inicial de la extracción deberá ser tal, que la sustancia a extraer sea distribuida preferencialmente hacia el solvente de extracción.

Si existe una baja recuperación del compuesto o compuestos de interés, ésta podrá ser aumentada por extracciones sucesivas de la muestra para producir recuperaciones aceptables, pero en la práctica algunas veces se usa un exceso de solvente para su extracción con el fin de disminuir el tiempo y conseguir el mismo resultado.

La extracción líquido - líquido es una técnica especial para la preparación de muestras, es muy versátil y existe suficiente información de ésta, sin embargo, es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes, por sus impurezas pueden agregar nuevos compuestos a la muestra y estos pueden interferir en la determinación del analito.

En la tabla II se describen los métodos reportados para el tratamiento de fluidos biológicos en los que cuantifican sulfametazina y están implicadas las técnicas descritas en los párrafos anteriores.

Tabla II Preparación de muestras para cuantificar Sulfametazina en fluidos biológicos.

Referencia	Muestra	Cantidad utilizada	Método utilizado	Solvente adicionado	Solvente de extracción	Condiciones de centrifugación	Tratamiento de sobrenadante	Condiciones de evaporación	Tratamiento de residuos
Van Klooste r G. 1991 p 157-168	plasma u orina	300 µl	ELL.	Paso 1 1 ml de acetatos (0.5M), 60 ml de NaOH 4M, 1 ml de H ₂ PO ₄ 0.5M	Paso 2 4 ml de Dietileter-Diclorometano-Isopropanol (60:40:0.5 v/v)	Paso 3 10 min, 500g	Paso 4 Evaporar	Paso 5 A sequedad bajo N ₂	Paso 6 Redisolver con 200 µl de fase móvil y cuantificar
Nouws J. 1985 p 177-186	Plasma o leche	1000µl	Pp de proteínas	Paso 1 2000µl de Ac. Perclórico 0.66M y neutralizar con 140µl de KOH 40%		Paso 2 5000 r.p.m. Paso 4 5000 r.p.m.	Paso 3 Adicionar 1000µl de acetatos 1M (pH= 5.2) más 4 ml de etilacetato. Rotar por 20 min. Paso 5 Capa superior a sequedad	Paso 6 A sequedad bajo N ₂	Paso 7 Redisolver en 300 µl de fase móvil
Tsai, C 1985 p 674-678	Suero o leche	1 ml	Pp de proteínas	Paso 1 4 ml de acetónitrilo		Paso 2 75 min a 1000 x g Paso 5 10 min a 1000 x g Paso 6 10 min a 1000 x g	Paso 9 Tomar 0.05ml del sobrenadante y adicionar 0.1 ml de fluorescamina por min. A temp. de cuarto.	Paso 3 A sequedad bajo N ₂ a 40°C en baño de H ₂ O Paso 6 A sequedad	Paso 4 Disolver en 0.05 ml de agua + 1 ml de CH ₃ CN Paso 7 Adicionar 0.01 de TCA
Goehli, T. 1978 p 404-406	Suero o plasma	0.2 ml	Pp de proteínas	Paso 1 Adicionar 0.1 ml de Ac. Tricloroacético		Paso 2 2500 r.p.m. por 15 min	Paso 3 Una alícuota de 5 µl del sobrenadante fue inyectado a la columna		
Bevill F.R. 1978 p 1200-1203	Plasma	5 ml	Ultrafiltración	Paso 1 Adicionar 20mg de fenilbutazona a una membrana de cono	Paso 4 Extraer con 2.5 ml de etil acetato	Paso 2 2000g x 30 min	Paso 3 Tomar 2 ml y adicionar estándar interno		

Los superíndices indican la secuencia de pasos que se siguieron para el tratamiento de la muestra

Pp de proteínas = Precipitación de proteínas

ELL = Extracción Líquido-líquido

TCA = Tricloroacético

4.7 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Otra manera de extraer compuestos de interés de muestras biológicas, es adsorbiéndolas selectivamente sobre la superficie de partículas sólidas. La extracción en fase sólida consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho empacada con un adsorbente, El fluido biológico se transfiere al cartucho y los compuestos que tienen mayor afinidad por el adsorbente quedan retenidos. Después se eluyen los compuestos endógenos de la matriz biológica de tal forma que se quede retenido el compuesto de interés en el cartucho, para posteriormente eluirlo con un solvente adecuado a fin de realizar su análisis.

En general la capacidad de retención de solutos de una columna de EFS (extracción en fase sólida) depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y de las condiciones de extracción.

Para la elección del tipo de adsorbente es necesario considerar la naturaleza del compuesto de interés y de la matriz. En las tablas III y IV se muestran los adsorbentes más utilizados en este tipo de extracciones

4.7.1 DESARROLLO DE UN METODO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

(McDowall, R. 1989 p 3-58)

Para desarrollar un método por EFS es necesario:

1. Buscar información acerca de métodos de ensayo cromatográficos publicado para estructuras similares. Si el analito es un compuesto nuevo puede ser posible la deducción de las condiciones cromatográficas a partir de estructuras similares con las entidades químicas ya existentes.
2. Las propiedades Fisicoquímicas del analito
3. Las propiedades Fisicoquímicas de la matriz-muestra.
4. Las propiedades de la fase móvil del Método cromatográfico; ya que ésta dará información acerca de las condiciones de elución para el compuesto a partir de la EFS
5. Evaluar la retención del analito sobre varias fases enlazadas; si la separación en CLAR es por fase reversa, es importante recordar que el pH puede tener un efecto sobre la retención de un compuesto. Generalmente una fase estacionaria de similar polaridad a el compuesto de interés se usa con la muestra disuelta y se aplica en la columna con un disolvente de polaridad opuesta. El analito es eluido de nuevo cambiando la polaridad del solvente, para una molécula orgánica relativamente lipofílica se recomienda usar un cartucho C₁₈, C₈ o C₂, en un solvente polar y eluido con un solvente relativamente no polar.
6. Comparar las recuperaciones obtenidas a partir de matrices biológicas y de soluciones estándar.
7. Los volúmenes de elución deben ser optimizados, con el fin de no obtener demasiado diluido el analito.
8. El tamaño del adsorbente puede ser optimizado, por ejemplo si se requiere una cantidad de adsorbente de 100 mg es necesario considerar el tamaño del cartucho con motivo de facilitar el manejo, tener volúmenes de elución pequeños y mejorar la economía.

En el diagrama de flujo (Fig. 3) se ilustran los pasos secuenciales para desarrollar un método de extracción en fase sólida.

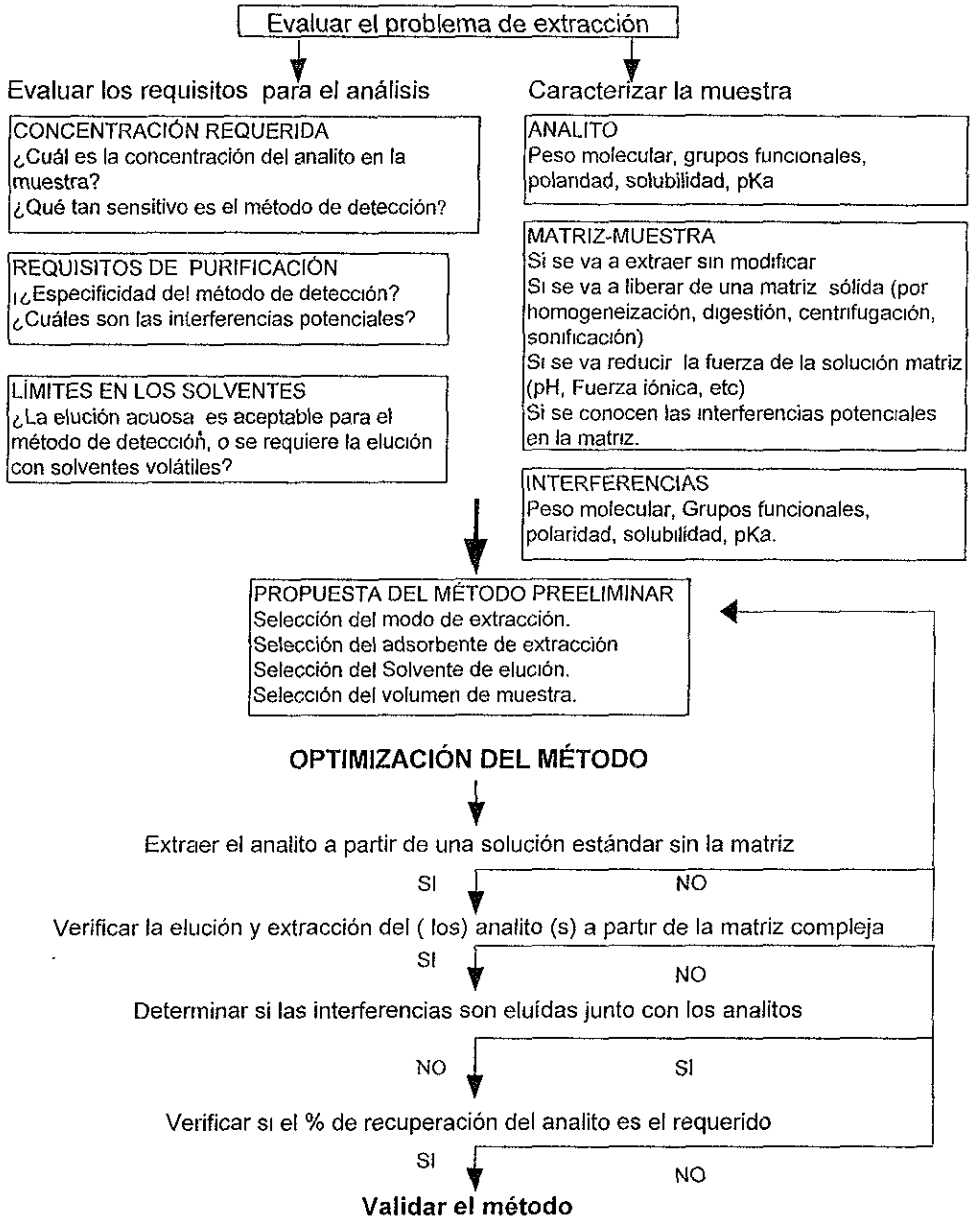
Tabla III. Materiales de relleno de los cartuchos en fase sólida, los indicados con * representan fases ligadas (Quattrocchi, O 1992 p 211).

TIPO DE RELLENO	CARACTERÍSTICAS
Diamino* $-(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio cuaternario* $-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3Cl^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Acido carboxílico* $-(CH_2)COOH$	Intercambiador catiónico débil
Acido sulfónico* $-C_6H_4-SO_2OH$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina	Sorbente polar
Florisol Silicato de magnesio activado	Sorbente polar
Silica gel	Sorbente polar
Tierra diatomea	Sorbente polar
Ciano* $-(CH_2)_3CN$	Sorbente de polaridad media
Amino* $-(CH_2)_3NH_2$	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

Tabla IV. Adsorbentes más comunes y sistemas de preparación (Quattrocchi, O. 1992 p 211).

MATERIAL DE RELLENO	TIPOS DE ANALITOS	NATURALEZA DE LA MATRIZ	ACTIVACIÓN DE LA COLUMNA	SOLVENTE DE ELUCIÓN
C_{18}/C_8 C_2	Sustancias no polares Sustancias ionizables en su forma no ionizada	Acuosa	Metanol Agua	Metanol / Acetonitrilo o mezclas de éstos con agua o buffers de pH adecuado
Sílice Diol CN	Sustancias polares	Solución en solventes no polares Aceites	Cloroformo Hexano	Solventes polares Metanol
Aniónico	Aniones Carboxilatos/Sulfonatos	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffers de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con Metanol / Acetonitrilo
Catiónico	Cationes Aminas	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffers de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con Metanol / Acetonitrilo

Figura 3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA DESARROLLAR UN MÉTODO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (Riley, M. 1994 p139)



4.7.2. METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

(Quattrocchi, O. 1992 p 211)

Para la preparación de las muestras por extracción en fase sólida (EFS) se utilizan los pasos que se describen a continuación

- **Activación de la columna** . Esta operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente "activados", especialmente en el caso de las cadenas del material de relleno de fase reversa que deben "estirarse" para lograr la interacción. Se realiza fluyendo metanol u otros solventes menos polares como acetonitrilo o tetrahidrofurano.
- **Lavado**. Esta operación se realiza haciendo pasar a través del cartucho agua grado Cromatográfico o un apropiado amortiguador de pH. Este removerá los excesos de metanol y preparara la superficie para la muestra. Este solvente debe ser tan similar como sea posible en polaridad, fuerza iónica y valor de pH de la muestra que va ser extraída.
- **Aplicación de la muestra**. La muestra se aplica en la columna utilizando un flujo determinado (típicamente 1 a 10 ml/min); este paso debe efectuarse lentamente porque caudales demasiados rápidos a través de la columna pueden producir una menor interacción entre los analitos y el material de relleno, que conducen a bajas recuperaciones de analito. Las muestra biológicas son generalmente viscosas y cuando sea posible deberán ser diluidas. La selección del solvente de dilución depende del modo de trabajo que se seleccione:
 1. Aplicación de la muestra en un solvente tal que permita la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna. En este caso la preparación de la muestra finaliza con esta operación.
 2. Retención del analito en la columna utilizando un solvente con el cual no eluya el analito. Este método es el más habitual y puede utilizarse para la preconcentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna. En este caso la preparación de la muestra debe continuarse como se describe en "lavado de la columna"
- **Lavado de la columna**. Esta operación se refiere a la eliminación de las impurezas retenidas del paso anterior. Utiliza un solvente apropiado que remueva selectivamente compuestos endógenos de la muestra. El lavado de la columna no es indispensable, pero en general es recomendable porque produce muestras más "limpias", con menos sustancias que interfieran en el subsecuente análisis.
- **Elución del analito**. Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna.

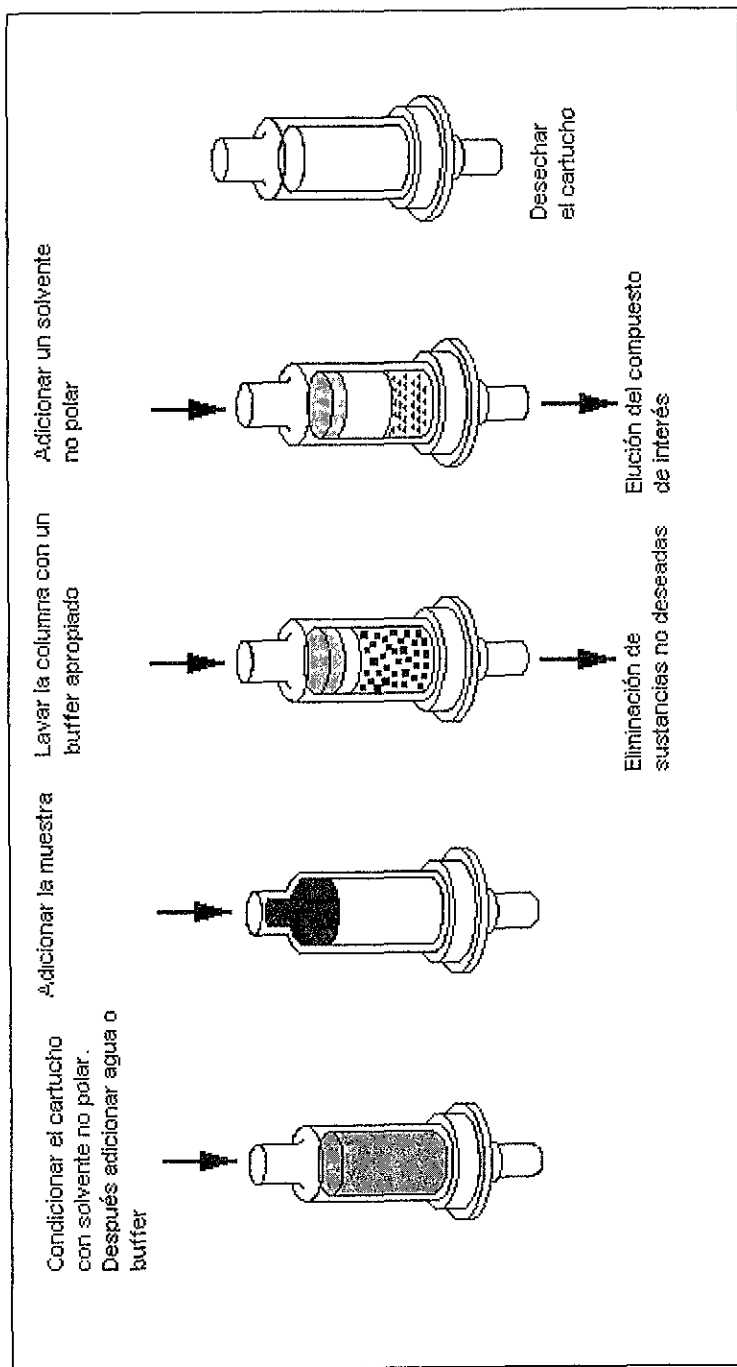
En la figura 4 se ilustra el procedimiento descrito

En la tabla V se muestran los métodos reportados por extracción en fase sólida para cuantificar sulfametazina en diferentes muestras biológicas

Tabla V. Preparación de muestras por extracción en fase sólida para sulfametazina.

Referencia	Muestra Biológica	Cantidad utilizada	Acondicionamiento del Cartucho	Carga de la muestra	Lavado Cartucho	Elución del Analito	Características de la columna.
Hubert, Ph. 1993 p 53-60	Plasma	2.0 ml	Adición de 2.0 ml de MeOH y 2.0 ml de buffer de fosfatos (pH = 7.4). A una velocidad flujo 12 ml/min Vol de aire 0.3 ml	Adicionar 1 ml del plasma en la parte superior del cartucho y un vol. de aire 1.5 ml. Con una Vel. de Flujo 0.75 ml/min	2ml de buffer de fosfatos(pH=7.4) Vel. de Flujo = 1.5 ml/min y un volumen de aire de 1.0 ml	Con 0.25 ml de MeOH y después 0.75 ml de Buffer de fosfatos (pH=6.4). Vel. de Flujo = 1.5 ml/min y un vol. de aire de 1.1 ml	Bond Elut C ₁₈ ® con 100 mg y 1 ml de Capacidad.
Boison, J. 1994 p 558-569	Tejido	5.0 g	Con 20 ml de MeOH + 20 ml de agua	Con 8 ml de CHCl ₃ + 10 ml de NaH ₂ PO ₄	Con 20 ml de agua	Con 1 ml de MeOH y después 2 ml de NaH ₂ PO ₄	SPE C ₁₈ ® con 500 mg y 3 ml de Capacidad.
Zomer, E. 1992 p 987-993	Leche	20 ml		20ml de McIlvaine/EDTA (Ac. Citrico, NaHPO ₄ , EDTA y NH ₄ OH) Calentar 15 min a 60°C Hasta cuajar. Centrifugar 5 min y filtrar. 28 ml del extracto colocar al cartucho	Con 5 ml de agua.	De 2 a 5 ml de MeOH al 100%.	Bond Elut C ₈ ® con 500 mg con 4 ml de Capacidad.

Figura 4 Ilustración procedimiento para la preparación de una muestra por EFS (Extracción en fase sólida) con cartuchos Sep-Pak® (C₁₈, tC₁₈, C₈, C₂, CN, Diol) (McDonald, D. 1995, 51)

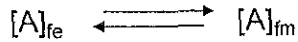


4.7.3. MECANISMO DE RETENCIÓN EN LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).

(McDowall, R. 1989 p 3-58)

En la estructura siloxano de los enlaces de sílica existe una capa permanente de moléculas de agua que solo es posible remover con calor; las cadenas de los enlaces de sílica resaltan de esta capa y entre los enlaces se encuentran interdispersas moléculas de agua y el solvente de acondicionamiento (ver figura 5). Esta configuración es controlada por solvatación: Las cadenas están más extendidas conforme el contenido orgánico aumenta y se encuentran contraídas cuando disminuye. Este comportamiento de aumento y contracción de las cadenas ocurre durante las etapas de aplicación de los solventes en la extracción.

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo. La retención obedece a una partición. Existe un equilibrio entre la concentración del analito en la fase estacionaria $[A]_{fe}$ y la fase móvil $[A]_{fm}$ es decir:



para que el analito presente se retenga en la columna este equilibrio debe estar desplazado hacia la izquierda, mientras que para conseguir la elución del analito en cuestión el equilibrio debe desplazarse hacia la derecha

El analito puede enlazarse a la fase sólida por un número de diferentes mecanismos los cuales son los mismos que para la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Por ejemplo puentes de Hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, Fuerzas de dispersión hidrofóbica e interacción electrostática. Algunas o todas estas fuerzas están involucradas durante una extracción; es el dominio de estas fuerzas lo que determinará la especificidad del método desarrollado.

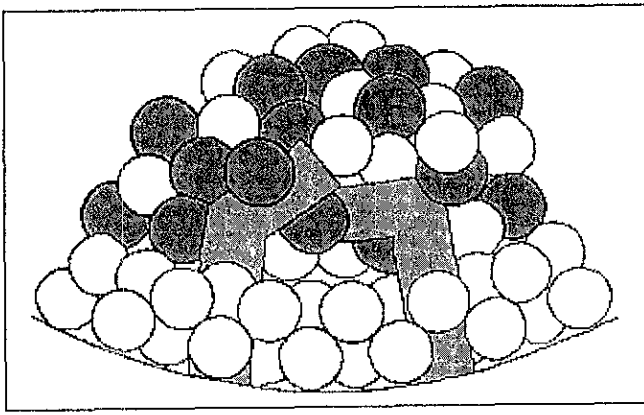


Figura 5. Superficie del enlace de sílica solvatada. Los círculos más oscuros representan moléculas de solvente orgánico, los claros representan moléculas acuosas y la figura gris representa los enlaces unidos a la sílica, los cuales pueden ser C_{18} , C_8 etc.

REUTILIZACIÓN DEL CARTUCHO

McDowall (McDowall, R. 1989 p 3-58) indica que algunas publicaciones mencionan la reutilización de cartuchos de fase sólida hasta 10 veces, esta se practica algunas veces por razones económicas pero debe ser cuidadosamente evaluada ya que los resultados no son del todo confiables. *La reutilización de fase sílica enlazada inevitablemente afecta su selectividad por el recubrimiento de la fase enlazada con constituyentes endógenos del plasma.*

APLICACIONES DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Las principales ventajas de la extracción en fase sólida son la selectividad debido a la amplia variedad de fases enlazadas, disponibles en el mercado, la velocidad y el menor tiempo para la preparación de un gran número de muestras al día y hace frente a un amplio intervalo de analitos de polaridad distinta.

Una desventaja es la necesidad de centrifugar a bajas temperaturas y deshielar las muestras de plasma antes del análisis para remover fibrina y otros componentes que pueden bloquear el flujo de solventes a través del sorbente. El operador debe completamente concentrarse mientras extrae la muestra como sea posible para adicionar el solvente justo. Otra desventaja identificada es la carencia de información acerca de esta técnica.

5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

5.1 DEFINICIÓN (Yost, R. 1980 p 3-5).

La cromatografía líquida es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho. La separación se da como resultado de repetidas adsorciones y desorciones de los componentes 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.

5.2 EQUIPO CROMATOGRÁFICO (Quattrocchi, O. 1992 p 211).

La columna es el lugar donde se produce la separación, y está se puede considerar como el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. Un equipo cromatográfico en general estará constituido por:

- Reservorios de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector o automuestreador.
- Sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

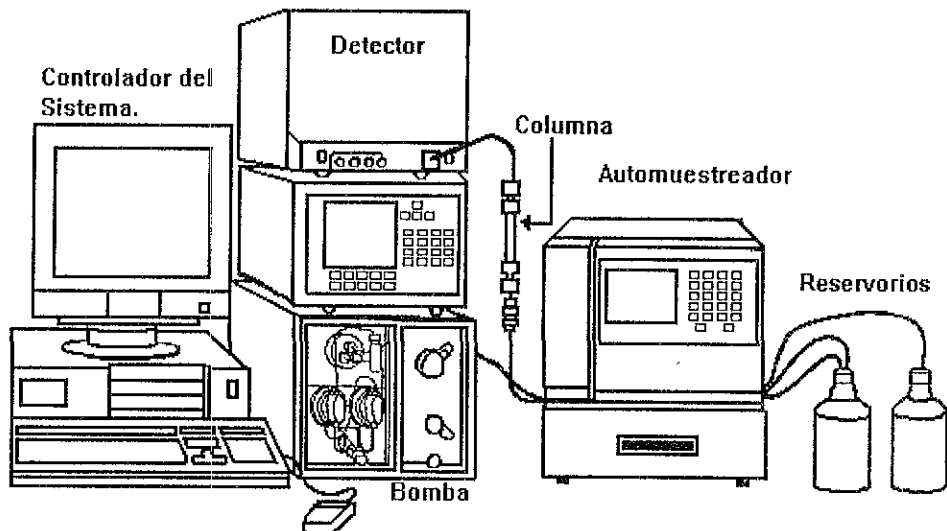


Figura 6. Componentes que conforman un equipo cromatográfico.

5.4. CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

(Yost, R. 1980 p 3-5)

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación pueden enumerarse cuatro tipos:

Cromatografía de adsorción.

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción - desorción.

Cromatografía de partición.

La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Cromatografía de intercambio iónico.

El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuerte será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo 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.

Cromatografía de exclusión.

Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada, según sea el tamaño molecular, está técnica también es llamada filtración sobre geles o cromatografía sobre gel, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel.

En cuanto a los dos primeros tipos de cromatografía, no siempre puede asegurarse cuál de los procesos implicados (adsorción o reparto) desempeña el papel más importante. Por ello, en la práctica se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases: Cromatografía en fase normal y Cromatografía en fase inversa.

La cromatografía en fase normal

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (ejemplo n-hexano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares.

La cromatografía en fase inversa

El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras que la fase móvil es un líquido polar normalmente agua o un alcohol. En este caso, cuan más apolar sea la muestra, mayor será su retención.

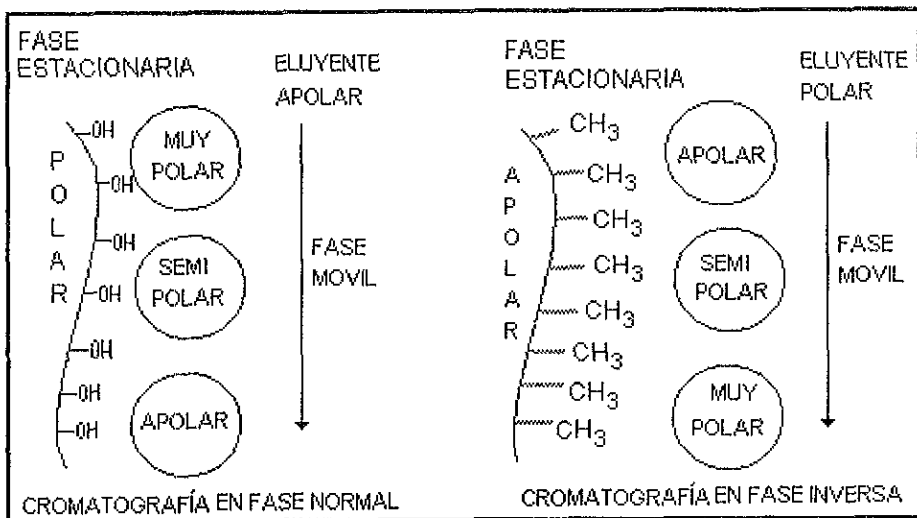
Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase inversa el aditivo será una sustancia menos polar. Algunas veces los aditivos son agregados con el fin de controlar el pH, ya que el valor de pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables en la tabla VI se presentan los aditivos más comunes para esta técnica.

Tabla VI. Aditivos más comúnmente usados en cromatografía líquida en fase normal y fase inversa (Quattrocchi, O. 1992:211)

ADITIVOS PARA FASE NORMAL	ADITIVOS PARA FASE INVERSA
Eter etílico	Metanol
Eter Propílico	Acetonitrilo
Eter Isopropílico	Tetrahidrofurano
Metil-terbutil éter	Dioxano
Compuestos halogenados (cloroformo, tetracloruro de carbono, acetona,)	Buffer de fosfatos
Alcohol isopropílico.	Buffer de acetatos
Hidrocarburos alifáticos.	Buffer de citratos
	Aminas
	Ácidos (acético, fosfórico)

En la figura 8 se representa estas dos técnicas, al tiempo que se indica el orden de elución de los distintos componentes de una muestra, en función de sus diferentes polaridades (Yost, R. 1980:3-5).

Figura 8. Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.



6. DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMÁTOGRAFICO

(Quattrocchi, O 1992 p 211).

Al igual que en todo campo de la química analítica, el enfoque general en CLAR puede tener varias perspectivas según la meta perseguida. Así, en cromatografía preparativa, la meta será la obtención de la mayor cantidad posible de una fracción determinada de alta pureza, en la cual sea sencilla la posterior eliminación de la fase móvil. El factor a optimizar será α y el parámetro más importante la capacidad de carga de la columna. En cambio, no son tan importantes la eficiencia global (siempre que sea suficiente para la separación primaria), el coeol y en general la geometría del pico. En el campo biológico o bioquímico, la cantidad de muestra de la que se dispone para el análisis suele ser escasa y la matriz demasiado compleja como para ser tratada en forma directa, constituida por compuestos de estructura muy diversa y en muchos casos interferencias potenciales, que en general no se consigue - ni interesa - cuantificar. En la industria farmacéutica o en síntesis orgánicas, los objetivos del análisis pueden ser el principio activo, excipientes, productos de partida, subproductos de síntesis y productos de degradación.

Dado que el desarrollo es costoso y se invierte mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones.

Indudablemente, el primer paso debería consistir en una investigación bibliográfica. Sería lamentable invertir semanas de trabajo para llegar a conclusiones que podrían obtenerse en minutos de consulta en una base de datos adecuada, dirigidas al analito específico o a compuestos químicamente relacionados que puedan aportar información útil, fácilmente transferibles al problema bajo estudio. En las tablas VII y VIII se muestran las condiciones cromatográficas usadas para la cuantificación de sulfametazina en diversidad de muestras.

La figura 9 muestra en un diagrama de flujo los pasos a seguir en un desarrollo sistemático de métodos cromatográficos

En primer lugar, deberá fijarse con claridad cuál es la meta perseguida, y los límites de dichos objetivos:

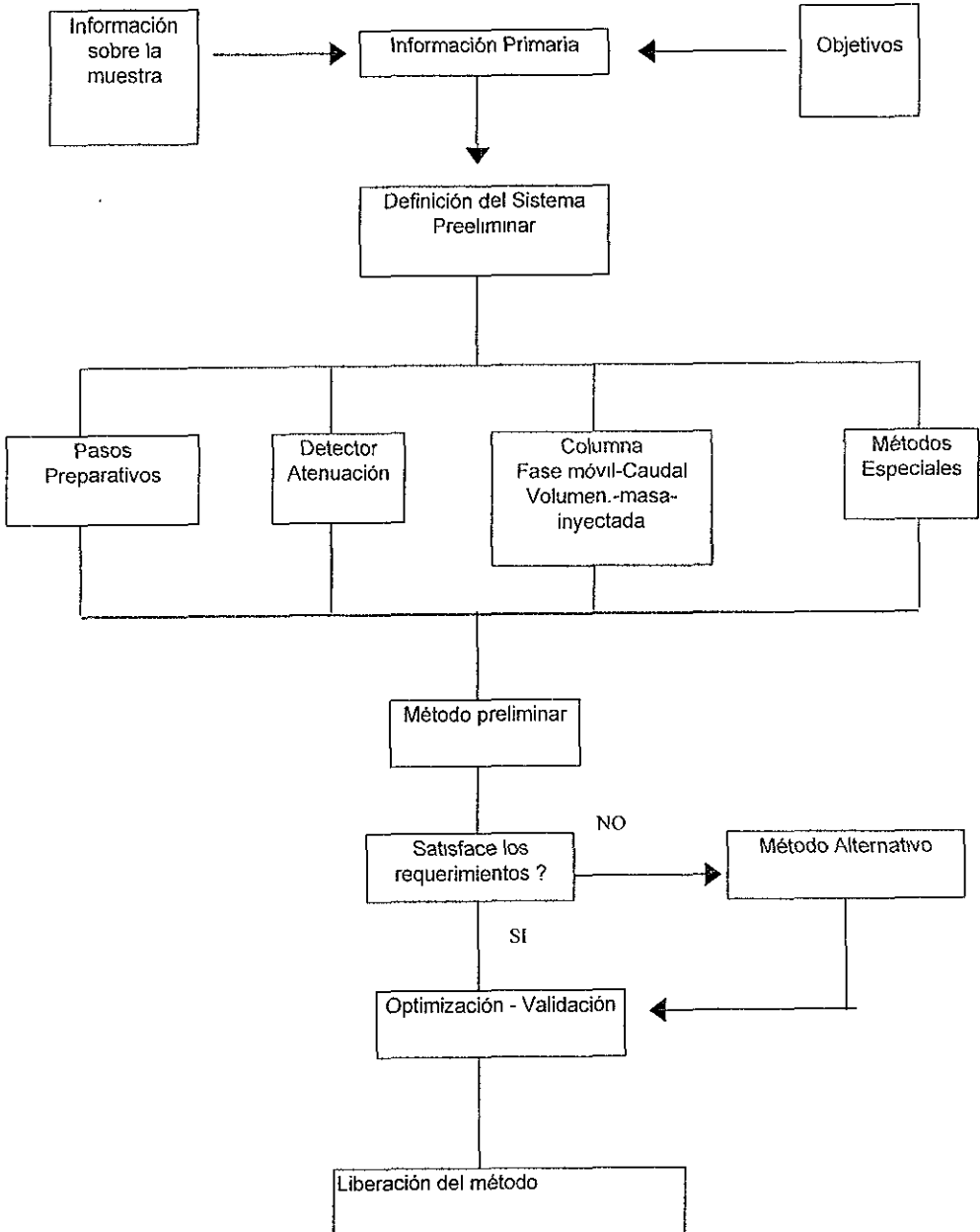
- ¿Se requiere identificación o cuantificación?
- ¿Cuál es el nivel presente (macro o microcomponentes)?
- ¿Cuál es la precisión requerida?
- ¿Cuántos componentes se desean valorar?
- ¿Cuántas muestras se desea procesar?

El número de muestras a evaluar puede no ser relevante para pocos ensayos, pero largas rutinas pueden indicar la necesidad de contar con equipos automáticos.

Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:

- Identidad de componentes de interés
- Intervalo de pesos moleculares de los componentes de interés
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV.
- Concentración de los componentes de interés.
- Naturaleza de la matriz (suero, orina, tabletas, etc.)

Figura 9. Pasos a seguir en el desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta resolución (Quattrocchi, O. 1992 p 211).



CLASIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA SULFAMETAZINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Tabla VII. Condiciones cromatográficas para la determinación de sulfametazina.

REFERENCIA	TAMANO DE COLUMNA	MATERIAL DE EMPAQUE	DETECTOR	VELOCIDAD DE FLUJO	VOLUMEN DE INYECCIÓN	FASE MÓVIL
Boison, J 1995 p 651-658	250 x 4.6 mm id	C ₁₈ ODS de 5 μm	UV a 265 nm	1.2 ml/min	20-50 μl	0.05M de NaH ₂ PO ₄ - Acetonitrilo (72 +28 v/v)
Boison, J. 1994 p 558-564	250 x 4.6 mm id	C ₁₈ ODS de 5 μm	UV a 265 nm	0.8 ml/min	20-50 μl	0.05M de NaH ₂ PO ₄ - MeOH (7+3 v/v)
Cargnan, G.1991 p 479-482	250 x 4.6 mm id	C ₁₈ de 5 μm	UV a 265 nm	1.5ml/min	850μl	600 ml de metanol con 1400 ml de agua
Hori, S.1990 p 990-992	250 x 4.6 mm id	Nucleosil 100® C18 de 5 μm	UV a 265 nm	1 ml/min	10 μl	10 mM KH ₂ PO ₄ - acetonitrilo (78:22)
Parks,O 1982 p 632-634	30 cm x 4 mm id	C ₁₈ μBondapack ⑤°	UV a 254 nm	1 ml/min		Agua-Metanol-Ac. Acético (80+20+0.5) con 0.1% de hidróxido de tetrabutilamonio.
McGary,E. 1986 p 1341-1342	30 cm x 3.9 mm id	C ₁₈ de 10 μm μBondapack ⑤°	UV a 254 nm	1 ml/min	20 μl	25% de acetonitrilo +7.5% (0.5% ac. Acético-0.05% octano-1% Sal sódica de Ac sulfónico en agua)
Long, A 1990 p 423-426	30 cm x 4 mm	Octadecil sílica derivada ODS	UV a 270 nm	1 ml/min	20 μl	0.017M H ₃ PO ₄ / Acetonitrilo (70:30 v/v)
Seymour, D. 1980 p 701-703	25 cm	MicroPak® C18-10	UV a 270 nm	20ml/hr	10 μl	Cloroformo: isoocetano: metanol :Acido acético (65:30.5:4:0.5)
Johnson,K. 1975 p 1657-1660	0.61m(2ft) x 2mm	Sílica pososa octadecil	UV a 254 nm	0.6 ml/min	50 μl	KH ₂ PO ₄ (pH=7.7) : Alcohol isopropilico (97.5:2.5 v/v)
Cox, B. 1982 p 1311-1315	4.6 mm x 25 cm	C ₁₈	UV a 254 nm	Hasta obtener una presión de 1100 psi	20 μl	250 ml de Acetonitrilo : 750 ml de agua

CLASIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA SULFAMETAZINA POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Tabla VIII. Condiciones cromatográficas para la determinación de sulfametazina.

REFERENCIA	TAMANO DE COLUMNA	MATERIAL DE EMPAQUE	DETECTOR	VELOCIDAD DE FLUJO	VOLUMEN DE INYECCIÓN	FASE MOVIL
Smedley, M. 1994 p 1112-1122 Smedley, M. 1990 p 875-879	250 x 4.6 mm	C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	1.5 ml/min	100 µl	(1) 12% MeOH : KH ₂ PO ₄ 0.1M (12:88v/v) (2) 30% MeOH : KH ₂ PO ₄ 0.1M (30:70 v/v)
Tsai, C. 1995 p 674-6678	300 x 3.9 mm	C ₁₈ de 10 µm	Fluorescente 390 y 475 nm	1 ml/min	50 µl	Una mezcla de 300 ml de acetoneitrilo y 700 ml de 10 mM KH ₂ PO ₄
Larocque, L. 1990 p 365-367	4.6 x 250 mm	Supelcosil®- C ₁₈ -DB de 5 µm	UV 265 nm	1 ml/min	20 µl	Metanol-0.1M KH ₂ PO ₄ (30:70)
Kram, T. 1972 p 254-256	1 m de longitud con 2.1 mm id	Intercambio aniónico	UV a 254 nm	0.8 ml/min		0.01M de borato de sodio (pH 9.2), conteniendo nitrato de sodio en varias concentraciones (0.01, 0.04, 0.07, y 0.1M)
Parasrampur, J 1986 p 2511-2519	30cm x 3.9mm	C ₈	UV a 257 nm	2.0 ml/min	20 µl	16%(v/v) de Metanol y 0.02M KH ₂ P ₂ O ₄ en agua
Sharma, J. 1976 p 1606-1608	0.5 m en longitud 2.6 mm id	Fase enlazada amino	UV a 254 nm	1.5 ml/min	5 µl	Metanol
Van T'klooster, G 1991 p 157-168	100mm x 4 mm	C18 5 µm	UV a 265 nm	0.8 ml/min	20 µl	Metanol-Buffer de fosfato(0.05M, pH6.67) 10:90.
Nouws, J 1985 p 177.186	150 x 4.6 mm id	Lichrosorb® C ₈ 5 µm	UV a 272 nm	2.0 ml min	100 µl	Mezcla de acetato de sodio 0.02M, Ac. Acético 0.2M, metanol, acetoneitrilo y agua (50:3.6:15.4:27.4)
Hubert, P. 1993 p 53-60	125 x 4 mm id	C 18 ODS	UV a 262 nm	0.9 ml/min	20 µl	Metanol-buffer de fosfatos (0.05M pH 6.4) 25:75
Goehl, T 1978 p 404-406	3.9 mm * 30 cm	C 18 ODS 10 µm	UV a 254 nm	1.5 ml/min	5 µl	Acetoneitrilo-1% de Ac. Acético (13:87)

6.1 IMPORTANCIA DEL USO DEL DETECTOR DE ARREGLO DE FOTODIODOS EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

(Quattrocchi, O. 1992 p 211)

Dentro de los diferentes detectores de absorción UV/VIS podemos distinguir los siguientes:

- Detectores de longitud de onda fija.
- De longitud de onda variable.
- De longitud de onda variable y programable.
- Detectores por arreglo de diodos o fotodiodos.

Uno de los avances más importantes en sistemas de detección se dio con la introducción de los detectores de arreglo de diodos. Actualmente la cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica cuantitativa que permite definir la identidad del compuesto de la muestra al comparar su tiempo de retención de éste, con un compuesto estándar, ambos inyectados en el mismo sistema de separación. Con este tipo de detectores se puede disponer de barridos espectrales de las sustancias al mismo tiempo que eluyen de la columna

Este detector tiene la ventaja múltiple, es decir, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreta sino el espectro de absorción completo en tiempo real, de modo que a las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se agrega una tercera longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a los detectores convencionales. Expresado de otro modo, con un detector convencional se monitorea la separación a una longitud de onda, la estimada como la más conveniente. Finalizado el ensayo la información que pudiera haberse obtenido a otra longitud de onda estará perdida. Con el detector de arreglo de fotodiodos se monitorea y almacena (en un soporte magnético) la información relativa a todo el espectro de absorción, de modo que está información puede ser posteriormente recuperada y manipulada. La gráfica del espectro de absorción de los picos eluidos proporciona una primer aproximación de la identidad del compuesto.

Con el detector de arreglo de fotodiodos y un software apropiado se puede obtener información adicional para el desarrollo de un método, así como para el estudio de pureza de los picos de interés. La información que se puede obtener es la siguiente:

- Superposición de espectros
- Isogramas, relación de absorbancias,
- Topogramas.
- Análisis de pureza de los picos de absorción.. etc.

A continuación se describe cada una de estas.

- **Isograma.** Es un gráfico que representa líneas de isoabsorción en un diagrama bidimensional (longitud de onda y tiempo).

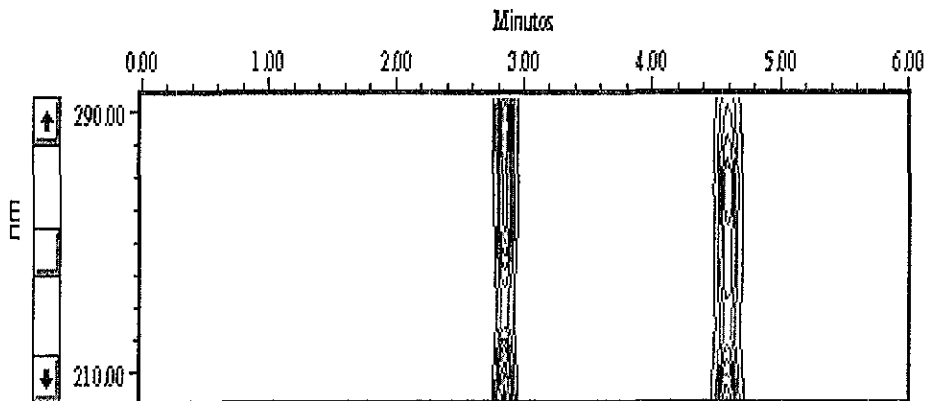


Figura 10. Cromatogramas de isoabsorción de los estándares de sulfatiazol y sulfametazina. Observe como se encuentran definidos, sin ninguna deformación del isograma.

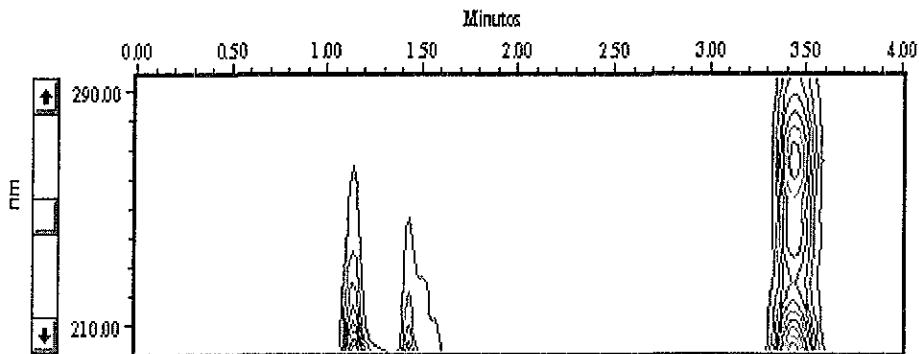


Figura 11. Cromatograma de isoabsorción del estándar de sulfatiazol en plasma de cabra, observe como los primeros picos cromatográficos existe una deformación debida a la presencia de otros compuestos, esto indica que lo dos primeros picos no se encuentran puros, mientras que el tercero (correspondiente al sulfatiazol), en el que no se observa ninguna deformación, indica que es puro.

- **Topograma.** Un gráfico típico del detector de ordenamiento de fotodiodos es el topograma, en el cual se representa en forma tridimensional de los parámetros tiempo, longitud de onda y absorbancia. Esta representación proporciona una imagen visual muy elegante, aunque su análisis es más difícil y probablemente no aporta datos adicionales al isograma. El topograma puede ser ampliado o reducido a voluntad. También puede ser rotado en cualquiera de sus ejes para facilitar la visualización de bandas ocultas por otras bandas mayores. Topograma de la figura 12 muestra los tres ejes asociados a esta información (X tiempo, Y respuesta, Z longitud de onda)

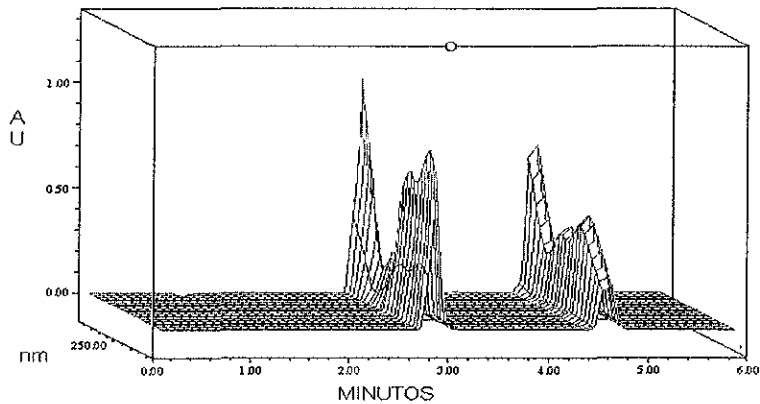


Figura 12. Topograma de los estándares de sulfatiazol y sulfametazina asociando los tres ejes: Minutos, nanómetros (nm) y unidades de absorbancia (UA).

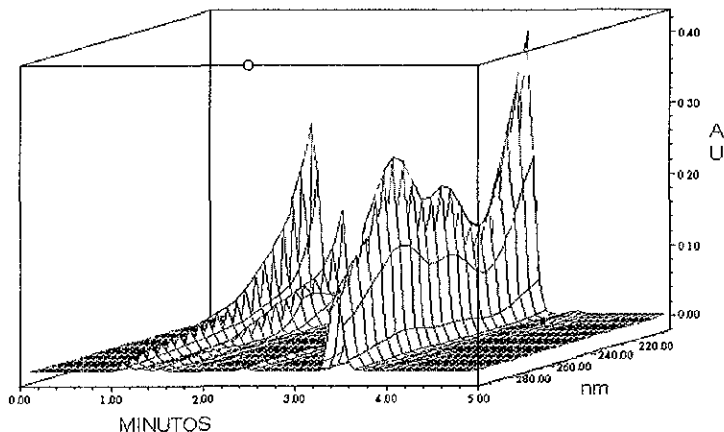


Figura 13. Topograma del estándar de sulfatiazol en plasma de cabra, asocia los tres ejes: Minutos, nanómetros (nm) y unidades de absorbancia (UA).

- **Superposición de espectros.** Uno de los criterios de pureza más difundidos consiste en la superposición de los espectros de absorción de los segmentos creciente, vértice y decreciente del pico en estudio. En general, estos espectros se grafican "normalizados", es decir corregidos en su escala de modo que ocupen la misma proporción de la imagen visual. Muchos paquetes de software permiten además el cálculo de la correlación entre curvas espectrales, de manera tal, que permite cuantificar el grado de similitud espectral.

Por otra parte, es posible la comparación del o de los espectros obtenidos en la muestra con bibliotecas (archivos con soporte magnético) en las cuales se puede almacenar los espectros de absorción de lo estándares puros, productos de degradación, intermediarios, etc. y el grado de correlación espectral permite, con ciertas limitaciones (tiempos de retención, influencia del pH sobre el espectro de absorción etc.) asumir la identidad.

Figura 14. Superposición de espectros. EL máximo de 285.1 nm es el espectro de sulfatiazol, el espectro con dos máximos (219 y 280 nm) es de un producto endógeno de plasma de cabra.

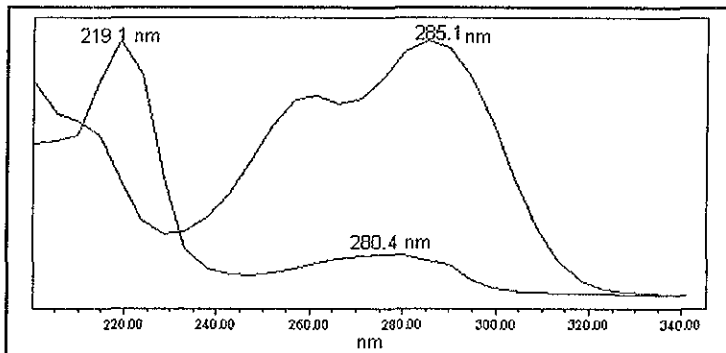
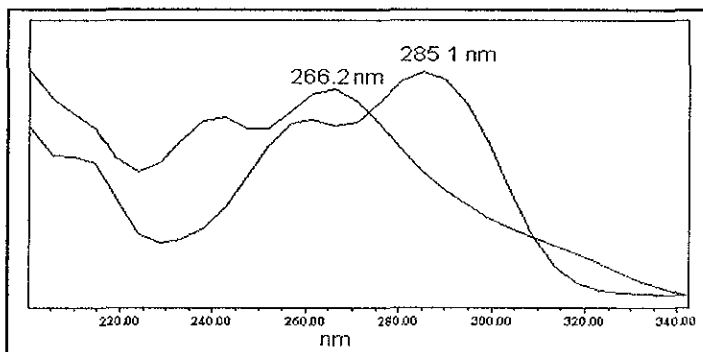


Figura 15. Superposición de espectros. EL máximo de 285.1nm es del espectro de sulfatiazol, el espectro con un máximo a 266.2 nm corresponde al espectro de sulfametazina.



Análisis de pureza de los picos de absorción. En este punto el software tiene la capacidad de determinar los ángulos de pureza para cada pico cromatográfico, el umbral de pureza y la máxima impureza.

Para un pico puro: ángulo de pureza < umbral de pureza.

Para un pico con impurezas: ángulo de pureza > umbral de pureza.

- El ángulo de pureza, indica la relativa homogeneidad espectral dentro del pico. Los valores validos del ángulo de pureza son de 0 a 90°. Un valor de 0 indica que existe una homogeneidad espectral dentro del pico.
- El umbral de pureza, indica la amplitud del ángulo de pureza que puede ser debido al ruido, al solvente, al error fotométrico y a las concentraciones de la muestra que contribuyen a las diferencias espectrales.
- La máxima impureza, identifica el tiempo de retención en donde se encuentra la máxima impureza.

Además otra información adicional que el software permite es observar el pico cromatográfico que se está analizando con las tendencias de pureza que se determinan.

Del software obtienen para cada pico cromatográfico, un máximo de cuatro ángulos de pureza, umbrales de pureza y máximas impurezas, debido a que realiza cuatro cortes en el pico obteniendo de estos sus espectros los cuales son comparados con el espectro que se presenta en el máximo del pico; la diferencia o similitud que encuentra entre ellos (considerando el ruido propio del sistema y el solvente) da como resultado el valor de cada ángulo.

Así para un pico cromatográfico puro del sulfatiazol los ángulos que determina el software son los siguientes:

Tabla IX. Análisis de pureza del pico de sulfatiazol

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
0.230	1.305	3.938
0.055	1.336	4.155
0.039	1.323	4.072
0.032	1.325	3.722

Como se observa los ángulos de pureza son menores al umbral de pureza, por lo cual se considera puro.

Mientras que para un pico cromatográfico impuro (Sustancia endógena del plasma de cabra) los ángulos que determina el software son los siguientes:

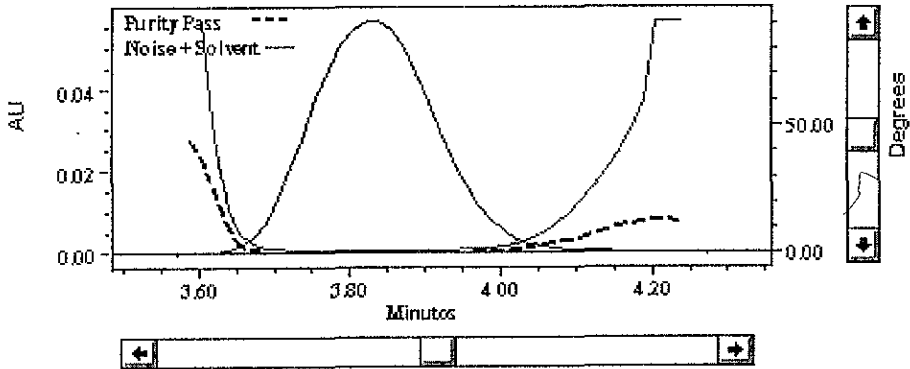
Tabla X. Análisis de pureza del pico de sustancia endógena del plasma de cabra

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
15.884	1.236	1.438
8.341	1.226	1.355
5.630	1.233	1.472
0.827	1.243	1.305

Como se observa los ángulos de pureza son menores que el umbral de pureza.

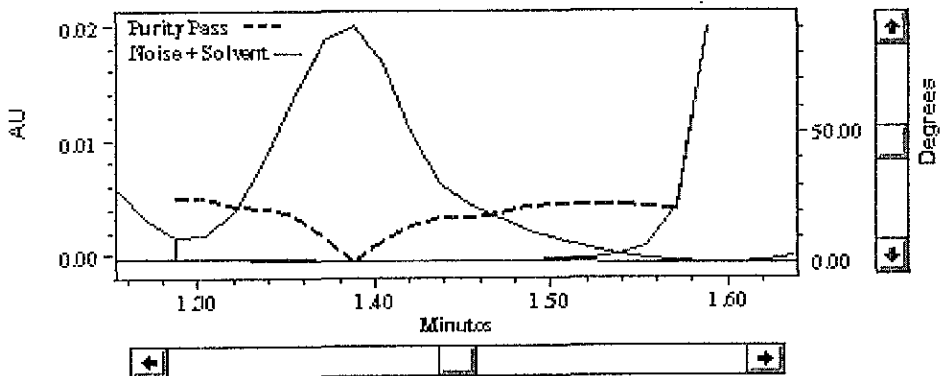
En la figura 16. Se muestra el pico cromatográfico que se analizó en la tabla IX. En éste se muestran dos líneas. La línea punteada indica el pase de pureza que se realizó, y si el pico es puro, entonces ésta debe de encontrarse por debajo de la línea continua que es debida al ruido del equipo y del solvente.

Figura 16.



En la figura 17 se muestra el pico cromatográfico que se analizó en la tabla X. En éste se muestran dos líneas. La línea punteada indica el pase de pureza que se realizó; el pico se encuentra impuro ya que ésta se encuentra por arriba de la línea continua que es debida al ruido del aparato y del solvente.

Figura 17.



7. ANÁLISIS CUANTITATIVO

(Quattrocchi O. 1992 p 251-253)

Después de la identificación de los componentes de la muestra, la siguiente etapa es la determinación de la cantidad presente de algunos de ellos (o de todos ellos), y es a lo que se llama análisis cuantitativo.

La señal generada por el detector se transmite a los registradores o integradores. En los primeros se llevan a un gráfico el pico y su área y se mide manualmente, mientras que, los segundos calculan el área o la altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente el reporte analítico.

La integración automática se realiza actualmente con el uso de los modernos integradores electrónicos con computadoras, aunque existen otros dispositivos como los planímetros y los integradores de disco.

Los integradores de disco eran las mejores opciones para medir el área de los picos antes del advenimiento de los integradores digitales.

Los integradores digitales procesan la señal proveniente de los detectores de manera tal que se obtiene tanto el dibujo del cromatograma como las áreas de los picos.

La cuantificación de los picos cromatográficos puede realizarse midiendo su área o su altura. La mayor parte de los cromatografistas acostumbran a medir el área, aunque se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura en lugar del área siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes.

Como la concentración de un analito es directamente proporcional al área que genera, cualquier factor que modifique el valor del ancho del pico influirá sobre la cuantificación por altura. A eficiencia constante, un aumento en los tiempos de retención va acompañado de un aumento en el valor del ancho del pico, y consecuentemente, de una disminución de la altura. Asimismo, cualquier parámetro que modifique la eficiencia de la columna modificará el valor del ancho del pico (Ver tabla XI)

En contrapartida, las mediciones de área resultan poco precisas cuando no se puede definir exactamente la línea base. Así, resulta más conveniente medir altura en el caso de picos parcialmente resueltos, de picos con tailing (coleo) muy severo (que no puede corregirse cromatográficamente), y en el análisis de trazas si la línea de base es muy ruidosa.

Tabla XI. Factores que influyen en la cuantificación de los picos.

Variable	Se modifican			
	Factor de capacidad (k')	Ancho del pico (w)	Altura del pico (h)	Área del pico (A)
Composición del solvente	si	si	si	no
Temperatura	si	si	si	no
Compresión en la cabeza de la columna	no	si	si	no
Contaminación en la cabeza de la columna	no	si	si	no

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE ANALITO

Después de la obtención del área de cada uno de los picos, la siguiente etapa consiste en establecer la cantidad o la concentración de los componentes de la muestra que corresponden a estos picos. Según sea el problema analítico, el cromatografista puede estar interesado en todos los componentes de la muestra presentes en el cromatograma o bien sólo en alguno (s) de ellos.

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:

- 7.1 Normalización interna.
- 7.2 Estándar interno.
- 7.3 Estándar externo.
- 7.4 Estándar agregado.

7.1 NORMALIZACIÓN INTERNA.

(Yost r. 1908 p 214)

En este caso se calcula la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y se considera que:

Cada componente de la muestra da lugar a un pico

El detector da una misma área para cada componente de la muestra si están presentes en la misma concentración.

Si existe un pico debido al disolvente se suele no considerar el área de este pico cuando se calcula el total de las áreas, y tener en cuenta solamente las áreas de los picos que corresponden a los componentes reales de la muestra.

Si la respuesta del detector es la misma para cantidades (concentraciones) iguales de los componentes de la muestra, puede suponerse que las llamadas áreas relativas de los picos (A%) son iguales a las concentraciones de los respectivos componentes de la muestra.

La normalización se efectúa dividiendo el área de cada pico por el área total (o la total menos el área del pico del disolvente) y multiplicando por cien:

$$A_1 + A_2 + \dots + A_i + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i$$

$$C_i \% = A_i \% = A_i / \sum_{i=1}^n A_i * 100$$

7.2 ESTÁNDAR INTERNO.

(Quattrocchi O. 1992 p 251-253)

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:

$$P = (R_m C_s / R_s) * D * 100$$

Ec. 7.2-1

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es el factor de dilución.

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

- No debe estar presente en la muestra
- Debe eluir a un valor de k' cercano al analito.
- Debe resolver completamente ($R \geq 1.5$).
- 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 ser dilución, extracción y derivatización.

La utilidad del estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, aunque en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado porque es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos.

El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en CG porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en CLAR donde éstos son mucho menores.

Por otro lado, se debe considerar que se agrega un pico más el cromatograma, por lo cual la separación se hace más compleja. De todas maneras, si se desea utilizar un estándar interno solamente para compensar los errores de inyección no es necesario aislar o adquirir sustancias semejantes al analito.

Para calcular la concentración de analito puede utilizarse la ecuación (7.2-1) o bien una curva de calibración. Para que el primer caso sea válido es necesario demostrar que la relación de áreas de analito a estándar interno es lineal y proporcional respecto de la concentración de analito.

7.3 ESTANDAR EXTERNO.

(Quattrocchi O. 1992 p 251-253)

El método del estándar externo es el método de cuantificación más utilizado en CLAR. Consiste en la comparación de estándares de la sustancia de interés, con la presente en la muestra, bajo el mismo ensayo cromatográfico y 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.

$$P = (A_m C_s / A_s) * D * 100 \quad \text{Ec. 7.3-1}$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_s son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, C_s 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 utilizando. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones, típicamente 3 inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestra y estándar después de un grupo de unas 5 ó 6 muestras.

La concentración de analito en la muestra puede obtenerse matemáticamente utilizando la ecuación (7.3-1), o bien gráficamente utilizando para ello una curva de calibración. En el primer caso para obtener resultados cuantitativos válidos es necesario que el método sea lineal y proporcional.

7.4 ESTÁNDAR AGREGADO.

(Quattrocchi O. 1992 p 251-253)

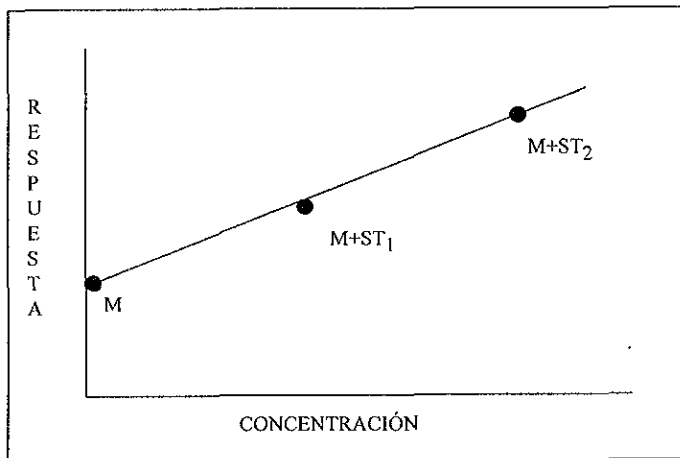
El método del Estándar Agregado consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{(A_m C_s)}{A_{ms} - A_m} * D * 100$$

donde P es el % de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito en la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método, como el del Estándar Externo, tiene dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos. En estos casos suele también agregarse la matriz de la muestra al estándar como alternativa al método del Estándar Agregado.

Con este método se puede, al igual que con los anteriores, efectuar directamente los cálculos o trabajar con una curva de calibración. La diferencia respecto de los otros métodos es que en este caso la curva de calibración no pasa por el origen y la ordenada al origen corresponde a la concentración de analito en la muestra.



8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Una vez desarrollado un método de análisis por CLAR, al igual que toda técnica analítica, debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

La validación de métodos bioanalíticos son importantes debido a que deben generar datos confiables para los estudios farmacocinéticos, de bioequivalencia y biodisponibilidad. La FDA (Food and Drug Administration) establece que para todo método analítico usado para cuantificar concentraciones de fármaco en un fluidos biológicos, deben ser especificadas características tales como: exactitud, linealidad, precisión, sensibilidad, especificidad y recuperación (Lang, J. 1991, p 357).

En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes características:

- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Especificidad.
- Estabilidad de la muestra.

8.1 LINEALIDAD.

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

Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco muestras con estándar comprendiendo las concentraciones mínimas y máximas esperadas en el estudio en que se aplicará.

Estas muestras se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión $Y = mx + b$ sobre los puntos individuales, sin promediar, por el método de los mínimos cuadrados.

En muchos casos es interesante comparar los resultados de la recta de regresión obtenida sobre el analito puro, con la correspondiente a analito + matriz biológica. La no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto de matriz y está relacionada con la exactitud del método en cuestión. Estos efectos de matriz pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza en aditivos y multiplicativos. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo o negativo del cero en presencia de la matriz y los multiplicativos a un cambio de la pendiente (Quattrocchi, O. 1992 p.313).

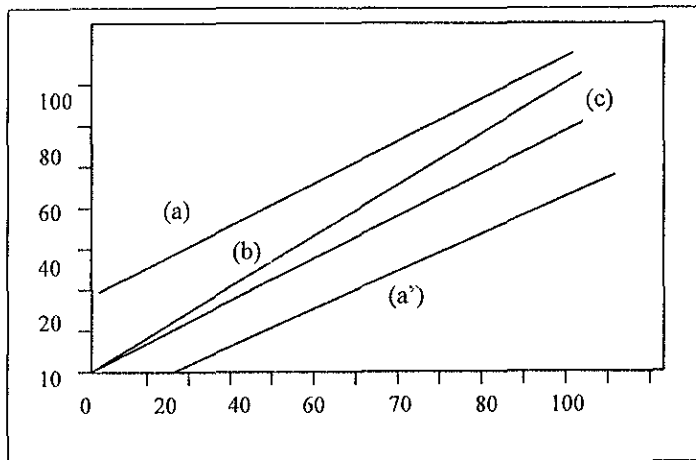


Figura 18. Efectos de matriz, (a y a') aditivos y (b) multiplicativos, en comparación con (C) el estándar puro.

8.2 PRECISIÓN

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor promedio y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión de un método analítico se debe estudiar sobre:

- El sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar
- El método, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la cuantificación del analito.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (C V.). La masa relativa del analito y la complejidad de la matriz es importante en el establecimiento de la precisión del método. Para el análisis de trazas o para el ensayo de fármacos en fluidos biológicos es apropiado un DER de 5% a 10% o mayores de acuerdo al nivel de concentración con el que se trabaje (tabla XII) (Quattrocchi, O. 1992 p 316-317).

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

Quattrocchi (Quattrocchi, O. 1992 p 318) menciona que Horwitz encontró una ecuación empírica que relaciona la DER de un método dado con la concentración de analito en la muestra. Para ello se recopiló resultados de unos 150 ensayos de interlaboratorios de la AOAC, por lo menos de 5 metodologías diferentes (cromatografía, absorción atómica, espectrofotometría, bioensayos).

La relación hallada fue la siguiente:

$$\text{DER} (\%) = 2^{(1-0.5\log C)}$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10. Así, si la concentración de analito es 1 ppm (10^{-6}), la DER será:

$$\text{DER} (\%) = 2^4 = 16\%$$

Si la concentración de analito es 1 ppb (10^{-9}), la DER será:

$$\text{DER} (\%) = 2^{5.5} = 45 \%$$

En la tabla XII se presentan la DER de acuerdo a la concentración de analito en la muestra

Tabla XII. Relación entre la concentración y la precisión (Crosby, N. 1995 p 80).

CONCENTRACIÓN	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
1 ppb	45
10 ppb	32
100 ppb	23
1 ppm	16

A. REPETIBILIDAD ENTRE DÍAS

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio) pero diferente día.

B. REPRODUCIBILIDAD.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones (diferentes analistas, en el mismo y/o en diferentes laboratorios , utilizando diferentes equipos, etc.)

8.3 EXACTITUD

(Quattrocchi, O. 1992 p 319-320)

La exactitud de un método corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor aceptado como referencia. La recuperación del analito se debe acercar al 100 %, para considerar que este sea exacto. Sin embargo en el análisis de trazas, no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran recuperaciones aceptables el 50, 80 y 90%. En el análisis de macrocomponentes, en general, se requiere que el valor medido no difiera significativamente del aceptado como referencia.

8.4 LÍMITE DE DETECCIÓN.

(Quattrocchi, O. 1992 p 322).

Es la menor concentración de analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (ppm, ppb, etc.).

8.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

(Quattrocchi, O. 1992 p 322).

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración.

Los límites de detección y cuantificación pueden ser estimados de la siguiente manera:

- Construir de una curva de calibración a bajas concentraciones del analito
- Determinar el intervalo de confianza para cada nivel de concentración considerando también la muestra que no contiene el analito de interés.
- El límite de detección: es la concentración estimada del límite superior de confianza del intercepto en la recta de regresión (respuesta en función de la concentración) Figura 19.
- Proponer concentraciones cercanas al límite de detección estimado y determinar sus intervalos de confianza.
- El límite de cuantificación será aquella concentración que tenga un límite inferior de confianza semejante al intervalo de confianza superior del intercepto. Figura 19. la intersección en

A continuación se muestra las determinaciones de ambos valores en el siguiente gráfico.

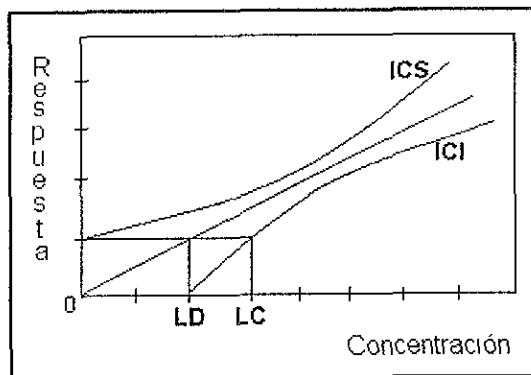


Figura 19. gráfico representativo de la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) con ayuda de los intervalos de confianza superior (ICS) e inferior (ICI)

8.6 ESPECIFICIDAD.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Éstos pueden ser productos de biotransformación del analito en fluido biológico u algunos componentes endógenos del mismo.

La determinación de la especificidad no puede seguir modelos y depende del ingenio del analista. El empleo de detectores de ordenamiento de fotodiodos es un apoyo que permite determinar con mayor confiabilidad la pureza de un pico cromatográfico (Quattrocchi, O. 1992 p 303).

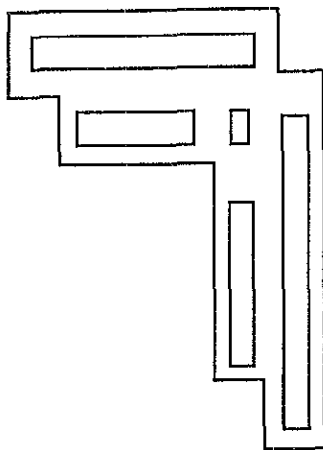
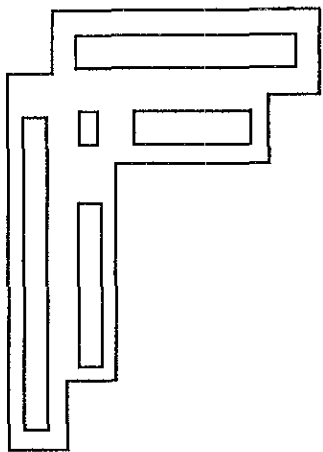
Si no es posible contar con este tipo de detectores se sugiere determinarla como sigue:

- Inyectar un blanco de la matriz biológica y demostrar que no existe ningún pico en el tiempo de retención donde se presenta la sustancia de interés.
- Determinar por medio de una prueba de t si la ordenada de la curva de calibración del método es significativamente diferente de cero.
- Analizar una muestra que contenga a la sustancia de interés con los posibles productos de biotransformación (Karnes, T. 1991 p 422).

8.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

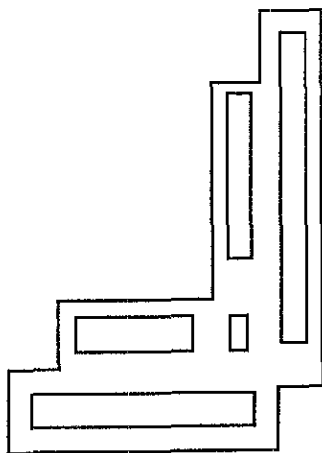
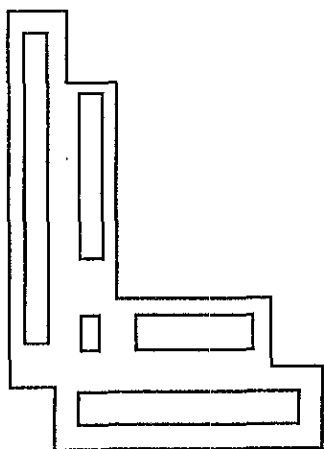
Es la propiedad de una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, en diferentes condiciones de almacenamiento tales como temperatura ambiente, refrigeración, congelación, protegidas de la luz, etc. durante un tiempo preestablecido por el analista. Se analizan bajo las mismas condiciones de operación, se utiliza una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a los establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.



CAPÍTULO II

DESARROLLO
DEL
MÉTODO ANALÍTICO



1. EQUIPO, MATERIAL, REACTIVOS Y SOLUCIONES.**• EQUIPO.**

Bomba de vacío con trampa para líquidos DGP 144. Mel de México.

Equipo cromatográfico marca Waters™.

- * Columna Symmetry™ C₁₈ de 3,9 x 150 mm. Part No. WAT054205
- * Bomba Cuaternaria Mod. 616™ Ser. No. MX6CM8678M
- * Controlador de la Bomba Mod. 600S. Ser. No. SX5KM0096M
- * Autoestrador Mod. 717plus. Ser. No. MX60M1948M
- * Detector de Fotodiodos Mod. 996. Ser. No. MX5NM6889M
- * Computadora DELL® con procesador 486.
- * Software Millennium Versión 2.1

Equipo para filtración por membrana Millipore.

Centrífuga con velocidad mínima de 3000 r.p.m., con rotor de capacidad para 8 tubos.

Equipo de Mili Q_{PLUS} Millipore.

• REACTIVOS

KH₂PO₄ Grado Reactivo Marca Monterrey.

Metanol Grado Cromatografico. Marca OmniSolv.

Acetonitrilo Grado Cromatografico. Marca OmniSolv.

NaOH Grado reactivo. Marca Merck.

Ácido acético Grado Reactivo. Marca Merck.

Ácido fosfórico Grado Reactivo. Marca

Agua con calidad de 18.2 MΩcm. Millipore.

Se tomará en cuenta el certificado de pureza que describe el fabricante.

- **SOLUCIONES:**

Hidróxido de sodio 1.5 N

Pesar 6.00 g. de NaOH G.R. Disolver con agua hervida fría, posteriormente filtrar y llevar a un volumen de 100 ml. Medir el valor de pH.

Búffer de fosfatos (pH 7.4)

Pesar 2.73 g de KH_2PO_4 disolver con 100 ml de agua, adicionar el suficiente NaOH 1.5 N hasta ajustar el pH deseado. Después llevar a un volumen de 200 ml con agua desionizada.

- **MATERIALES**

Matraces volumétrico de 200, 100, 50, y 10 ml

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 0.5 ml

Frascos ámbar limpios.

Tubos de centrifuga con chaquetas.

Jeringas PlastiPack de capacidad de 3 y 5 ml

Matraces Erlenmeyer de 250 ml.

- **ESTÁNDARES**

Sulfametazina base con pureza de 99.95%. HELM de México. Lote 0001

Sulfatiazol. Materia prima. HELM de México. Lote 12519

La fase experimental de este trabajo se desarrolló en dos etapas:

Etapa I. Desarrollo del método para preparar muestras de plasma.

Etapa II. Desarrollo del método cromatográfico para cuantificar sulfametazina en plasma

2. ETAPA I. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA PREPARAR MUESTRAS DE PLASMA.

Como el plasma contiene proteínas y otras sustancias endógenas y exógenas que pueden adherirse de manera permanente al empaque de la columna cromatográfica se buscó cómo separar estas sustancias de manera que no se altere las características de la columna del sistema cromatográfico. De los métodos reportados para preparar la muestra se encontró que el más adecuado para nuestras necesidades fue la extracción en fase sólida con Cartuchos de Octadecilsilano (Sep-Pak C₁₈)

2.1 Comportamiento de muestras de sulfametazina preparadas en agua en el proceso extracción.

En la extracción en fase sólida con Cartuchos de Octadecilsilano se estudió el efecto de los factores que a continuación se enlistan sobre el porcentaje recuperado de sulfametazina preparada en agua:

- pH del eluyente de lavado (Búfer).
- Proceso de acondicionamiento (orden de adición de los solventes)
- Volumen del solvente de elución (metanol).

El procedimiento que se siguió en cada uno de los ensayos para la extracción de la sulfametazina en fase sólida se describe en la tabla XIII

Tabla XIII. Procedimiento de la extracción en fase sólida para sulfametazina en agua.

PROCEDIMIENTO	VELOCIDAD DE FLUJO
<u>ACONDICIONAMIENTO</u> 4 ml de una mezcla 1:1 MeOH-Búfer de fosfatos (pH=7.4).	5 ml/min
<u>CARGA</u> 1 ml de solución estándar de SMZ de una concentración 151.2µg/ml más 1 ml de aire.	0.2ml/min
<u>LIMPIEZA</u> 2 ml de búfer de fosfatos a un valor de pH 7.4 más 2 ml de aire.	0.2ml/min
<u>ELUCIÓN DE SULFAMETAZINA</u> 1 ml de metanol más 1 ml de aire	0.2ml/min

Se realizaron seis ensayos los cuales se describen en la tabla XIV.

Tabla XIV. Factores estudiados en el comportamiento de muestras de sulfametazina preparada en agua en el proceso de extracción.

Ensayo	pH del eluyente de lavado	Acondicionamiento del cartucho	Volumen de metanol para eluir la sulfametazina
1	3.2	Método 1	1
2	5.3	Método 1	1
3	6.9	Método 1	1
4	7.4	Método 1	1
5	7.4	Método 2	2
6	7.4	Método 2	2

Los valores de pH estudiados fueron seleccionados por las siguientes características: Las constantes de disociación de la sulfametazina ($pK_a = 2.4$ y $pK_a = 7.4$). Valores de pH mayores a 7.5 se puede disolver la sílice contenida en los cartuchos de Sep Pak C18 y a pH menores de 2 se puede hidrolizar la unión entre la sílice y la fase enlazada (reporta Quattrocchi O. 1992 p 80)

En el proceso de acondicionamiento se estudió el efecto que tienen la forma de adicionar el metanol y el búfer de fosfatos para activar la fase estacionaria contenida en el Sep-Pak C18, para esto se establecieron 2 métodos:

Acondicionamiento del cartucho:

Método 1: Se eluye al cartucho Sep-Pak C₁₈ 4 ml de una mezcla de metanol y búfer de fosfatos (1:1).

Método 2. Se eluye al cartucho Sep-Pak C₁₈ 2 ml de metanol y después 2 ml de búfer de fosfatos.

El metanol fue elegido para recuperar la sulfametazina del cartucho Sep-Pak C18 debido a que éste presenta afinidad con el compuesto a extraer, tratando de minimizar la cantidad de metanol a utilizar en la recuperación por lo cual se seleccionó 1 ml y 2 ml.

En la tabla XV y la figura 20 se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos en los ensayos planteados. Observamos que hay una marcada diferencia en los porcentajes de recuperación de la sulfametazina cuando se aplican las siguientes condiciones de extracción de la sulfametazina en el cartucho Sep-Pak C18:

- Método 2 de acondicionamiento
- pH del búfer de fosfatos = 7.4
- 2 ml de metanol para recuperar sulfametazina

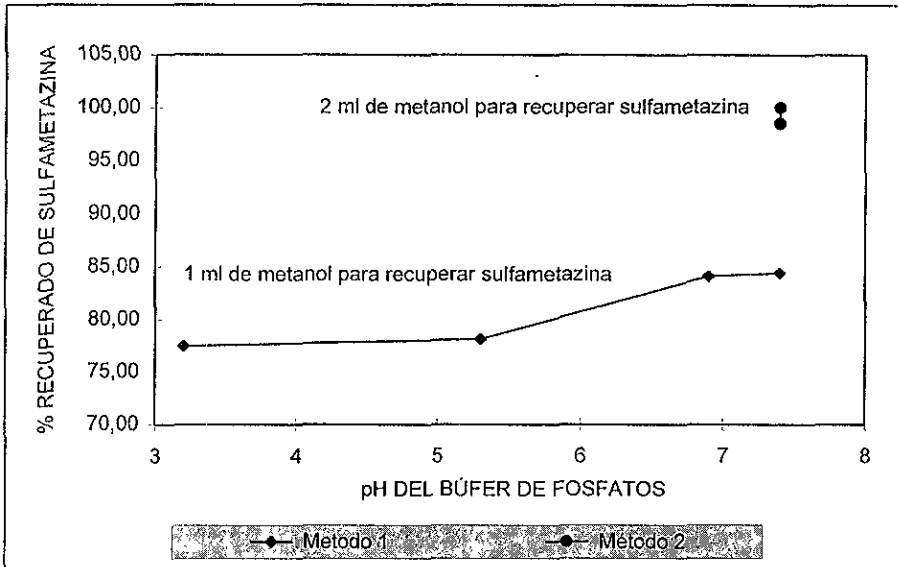
% recuperado de sulfametazina.
100.05
98.53

Tabla XV. Resultados obtenidos del estudio de los factores relacionados con el comportamiento de las muestras de sulfametazina preparada en agua.

N° de ensayo	pH del búfer de fosfatos	Método 1 de acondicionamiento	Método 2 de acondicionamiento
		1 ml de metanol*	2 ml de metanol*
1	3.2	77.47	
2	5.3	78.14	
3	6.9	84.09	
4	7.4	84.39	
5	7.4		100.05
6	7.4		98.53

* Para recuperar la sulfametazina.

Figura 20. Efecto del pH del búfer de fosfatos, el método de acondicionamiento y la cantidad de metanol sobre el porcentaje recuperado de sulfametazina disuelta en agua.



Con respecto a las demás condiciones de extracción estudiadas se obtienen porcentajes de recuperación de sulfametazina inferiores a 90% por lo cual se seleccionaron las condiciones de extracción que permitieron obtener porcentajes cercanos al 100% para el estudio en cuestión.

2.2 Comportamiento de muestras de sulfametazina preparadas en plasma de cabra en el proceso extracción.

Se estudio el efecto de las siguientes variables sobre el porcentaje recuperado de sulfametazina en muestras de plasma fortificado:

- Velocidad del flujo de los solventes través del cartucho.
- Volumen de plasma aplicado en el cartucho.
- Adición del estándar interno.

Se realizaron 19 ensayos a muestras de plasma fortificado, los cuales se describen en la tabla XVII y XVIII.

En cada uno de los ensayos las muestras de plasma fortificado fueron tratadas siguiendo el proceso descrito en la tabla XVI.

Tabla XVI Procedimiento de la extracción en fase sólida para sulfametazina en plasma

PROCEDIMIENTO
<u>ACONDICIONAMIENTO</u> 2 ml de metanol y después 2 ml de búffer de fosfatos (pH=7.4).
<u>CARGA</u> Un volumen de plasma fortificado a una concentración conocida más 1 ml de aire.
<u>LIMPIEZA</u> 2 ml de búffer de fosfatos a un valor de pH 7.4 más 2 ml de aire.
<u>ELUCIÓN DE SULFAMETAZINA</u> 2 ml de metanol más 1 ml de aire.

Se evaluó el efecto que tiene la velocidad de flujo de los solventes a través del cartucho Sep Pak C18 en el porcentaje de recuperación de la sulfametazina presente en plasma, con el fin de optimizar tiempo para el tratamiento de muestra. Por otro lado se trató de minimizar la cantidad de plasma utilizado en la extracción en fase sólida.

También se estudio el efecto que tiene el utilizar estándar interno en la extracción en fase sólida

Tabla XVII. Métodos de extracción* modificando la velocidad de flujo de los solventes y la presencia de estándar interno.

Procesos de extracción	Velocidad de flujo en el proceso de extracción			
	Acondicionamiento	Carga	Limpieza	Recuperación
Procedimiento 1*	5 ml/ 60 seg	0.2ml/60 seg	0.2ml/60 seg	0.2ml/60 seg
Procedimiento 2*	2 ml/60 seg	0.6 ml/60 seg	1,0 ml/60 seg	1 0 ml/60 seg
Procedimiento 3*	2 ml/10 seg	0.2ml/10 seg	0.2ml/10 seg	0.2ml/10 seg

Tabla XVIII. Efectos de los factores estudiados sobre el porcentaje recuperado de sulfametazina preparada en plasma en el proceso de extracción.

N° de ensayo	Cantidad de estándar interno (mg/ml)	ml de plasma utilizados	Procesos de extracción.	% recuperado de sulfametazina	
1	0	2	Procedimiento 1*	99.31	
2	0	2		98.94	
3	0	2		Procedimiento 2*	104.48
4	0	2	102.35		
5	0	2	97.56		
6	0	2	Procedimiento 3*		104.77
7	0	2			105.38
8	0	2		114.63	
9	0	2		107.47	
10	0	2		102.17	
11	0	2		99.89	
12	0	1		99.78	
13	0	1		99.96	
14	3.89	1		98.43	
15	3.89	1		100.31	
16	3.89	1	99.33		
17	3.89	1	99.46		
18	3.89	1	99.317		
19	3.89	1	100.97		

En la tabla XVIII y en la figura 21 se muestran los resultados de los 19 ensayos realizados. Observamos que las mejores condiciones de extracción para la sulfametazina en muestras de plasma son las correspondientes al procedimiento 3 con la adición de sulfatiazol, ya que los porcentajes recuperados se mantienen cercanos al 100%.

Con éste procedimiento de extracción se logra disminuir el tiempo de preparación de las muestras para el análisis cromatográfico con respecto al procedimiento 1 y 2 de extracción y además se disminuye la dispersión de los porcentajes recuperados por la adición del estándar interno (sulfatiazol) esto lo podemos constatar en la figura 22.

Figura 21. Relación entre el % de recuperación de sulfametazina con el procedimiento de extracción y el volumen de plasma utilizado.

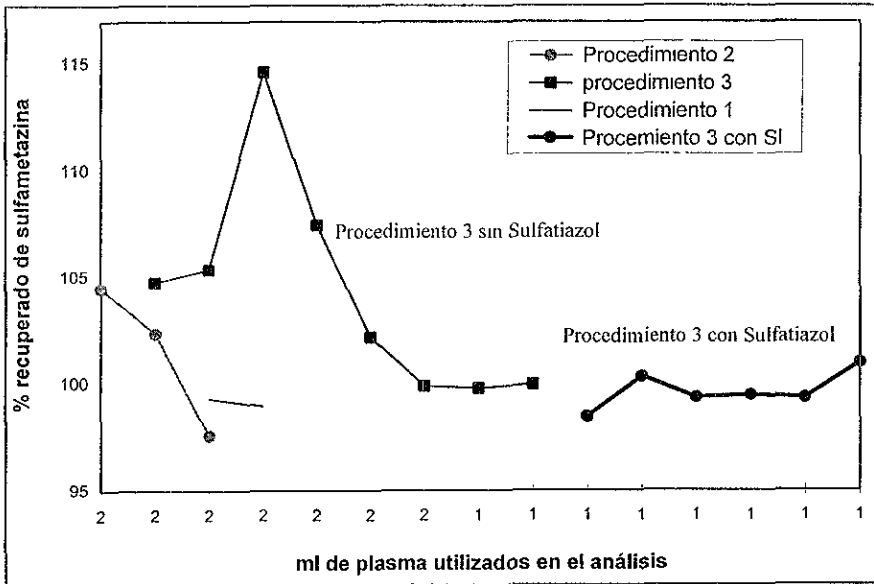
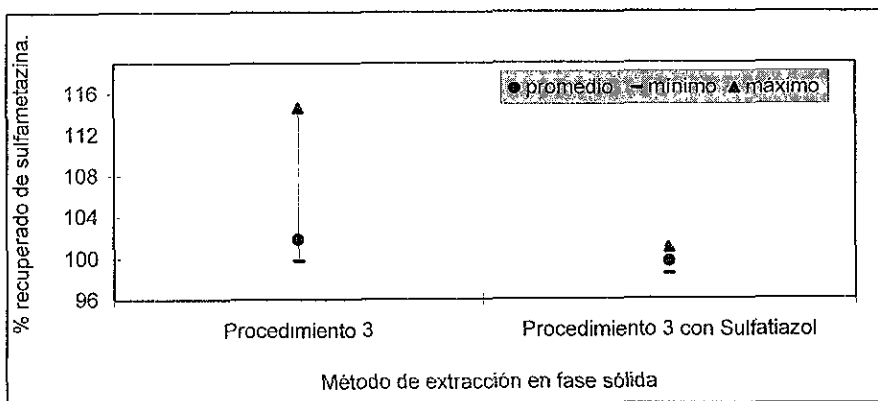


Figura 22. Comparación de la dispersión obtenida en los porcentajes recuperados de sulfametazina en función del método de extracción en fase sólida.



En base a los estudios realizados se establecieron las siguientes condiciones óptimas para el tratamiento de muestras de plasma con sulfametazina para realizar el análisis cromatográfico:

Tabla XIX. Condiciones óptimas para la extracción en fase sólida de muestras de plasma con sulfametazina.

MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE PLASMA		
PREPARACIÓN DEL PLASMA CON SULFATIAZOL.		
Tomar 1 ml de plasma y añadirle 0.5 ml de sulfatiazol a una concentración de 40 mg/ml Agitar gentilmente.		
PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA PARA LA SULFAMETAZINA		
PROCESO	SOLUCIONES	VELOCIDAD DE FLUJO (ml/10 seg)
Acondicionamiento	2 ml de metanol y después 2 ml de búfer de fosfatos pH=7.4 . Desechar el líquido que salga	2
Carga	Plasma fortificado con sulfatiazol más 1 ml de aire Desechar el líquido que salga	0.2
Limpieza	2 ml de búfer pH=7.4 + 2 ml de aire. Desechar el Líquido que salga.	0.2
Recuperación	2 ml de metanol + 1 ml de aire. Colectar el líquido que salga del cartucho.	0.2

3. ETAPA II. DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA CUANTIFICAR SULFAMETAZINA EN PLASMA.

Inicialmente se compararon los métodos en cromatografía líquida de alta resolución reportados para sulfametazina con el fin de elegir un método que presentará el menor tiempo de retención para la sulfametazina. Se encontró un método adecuado, que al implementarlo, se presentó en el mismo tiempo de retención de la sulfametazina una sustancia endógena del plasma, por ello se decidió estudiar diferentes condiciones respecto a la fase móvil con el fin de eliminar dicha interferencia. Se estudio el efecto de 7 fases móviles sobre el tiempo de retención y la pureza del pico cromatográfico de la sulfametazina, todas las fases probadas contenían búfer de fosfatos como principal componente. La fase móvil que permitió separar la sulfametazina de la interferencia fue: acetonitrilo-búfer de fosfatos (pH = 6.4) en un proporción 15:85 respectivamente. Como el uso de búfer en las fases móviles implica tiempos de lavado largos y cuidados especiales que aseguren la eliminación de sales en el sistema, ya que pueden precipitar dentro de las columnas, filtros o en tuberías del equipo cromatográfico, y además rayan los pistones y deterioran los sellos. Por consiguiente a pesar de ser adecuada la fase móvil encontrada se tuvo que proponer otra fase móvil. En la figura 23 se presenta el cromatograma obtenido a partir de la fase móvil Acetonitrilo - Búfer de fosfatos (pH 6.4) 15:85 y en la tabla XX se presenta la pureza de los picos cromatográficos correspondientes al sulfatiazol y a la sulfametazina al utilizar ésta fase móvil.

Figura 23. Cromatograma de la sulfametazina y sulfatiazol de una muestra de plasma con la fase móvil: Acetonitrilo: Búfer de fosfatos (pH=6.4) 15:85

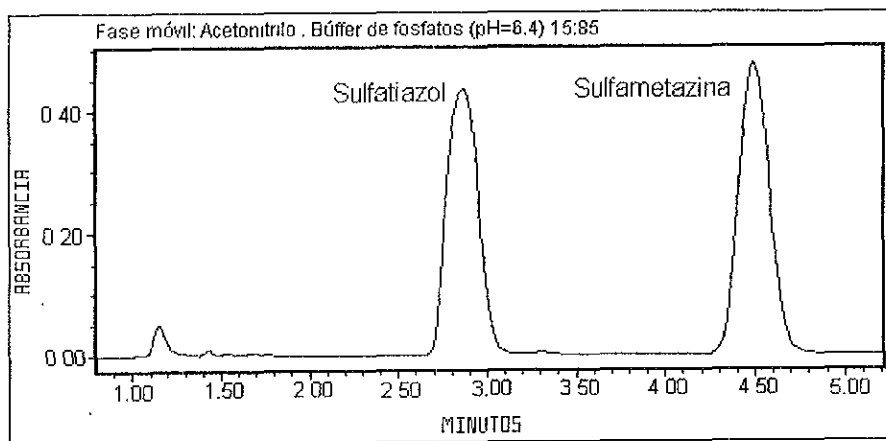


Tabla XX. Análisis de pureza de los picos cromatográficos de sulfatiazol y sulfametazina en fase móvil: Acetonitrilo - Búfer de fosfatos (pH=6.4) 15:85.

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.029	1.069	2.763	0.103	1.142	4.580
0.015	1.076	2.980	0.026	1.180	4.397
0.007	1.070	3.113	0.011	1.164	4.713
0.004	1.068	3.030	0.006	1.151	4.347

Fase móvil	T.R. (min)	Coleo	T.R. (min)	Coleo
	Sulfatiazol		Sulfametazina	
CH ₃ CN - K ₂ HPO ₄ (pH=6.4) 15:85	2.9	1.001	4.5	1.082

El ácido acético por no formar sales se uso como alternativa para eliminar los problemas que implica el uso de búfer de fosfatos. Además el ácido acético se reporta (pag) como fase móvil para muestras que contienen sulfametazina.

El ácido acético se estudio en diferentes proporciones con el metanol y el acetonitrilo

Las fases móviles con ácido acético estudiadas se muestran a continuación:

Acetonitrilo-Metanol-Ácido acético (0.5%) 15:10:75

Acetonitrilo-Ácido acético (0.5%) 15:85

Acetonitrilo-Ácido acético (0.25%) 15:85

Los cromatogramas obtenidos con cada fase móvil probada se muestran en las figuras 24, 25 y 26.

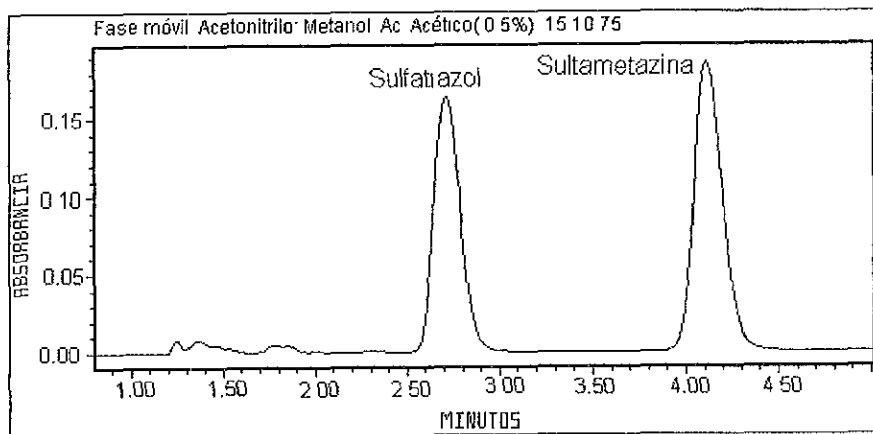
Figura 24. Cromatograma de la sulfametazina y sulfatiazol de una muestra de plasma fortificado en la fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Ácido acético 15:10:75.

Figura 25. Cromatograma de la sulfametazina y sulfatiazol de una muestra de plasma fortificado en la fase móvil: Acetonitrilo- Ácido acético 15:85 (0.25%)

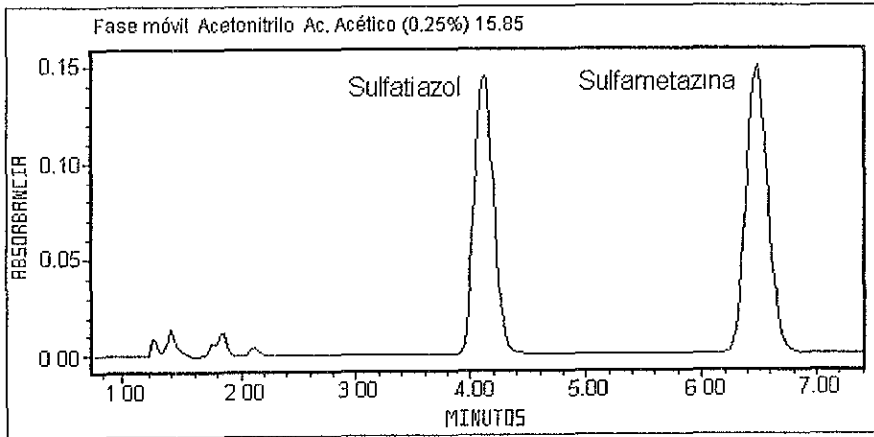
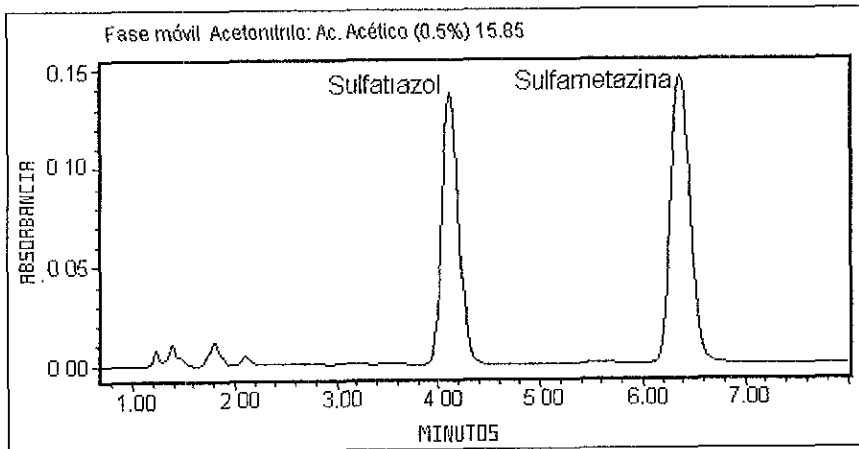


Figura 26. Cromatograma de la sulfametazina y sulfatiazol de una muestra de plasma fortificado en la fase móvil. Acetonitrilo-Ácido acético (0.5%) 15:85.



Los tiempos de retención y los coleos para los picos de sulfametazina y sulfatiazol en las fases móviles estudiadas se presenta en la tabla XXI. Se observa que la fase móvil acetonitrilo - metanol - ác. acético (0.5%) 15:10:75 genera el mayor coleo y el menor tiempo de retención para la sulfametazina. Para el resto de las fases móviles se puede apreciar que no existe gran diferencia en el coleo.

Por otro lado se realizó el análisis de pureza (tablas XXII, XXIII y XXIV) y espectral (figuras 27, 28 y 29), de los picos cromatográficos obtenidos de muestras de plasma fortificado en las fase móviles propuestas.

El análisis de pureza de la sulfametazina y sulfatiazol señalo que la única fase móvil que no generaba un pico puro para la sulfametazina fue acetonitrilo - ác. acético (0.25%)15:85, ya que se presenta un ángulo de pureza mayor al umbral de pureza (tabla XXIII) y su análisis espectral muestra un espectro diferente al de sulfametazina (señalado con una flecha en la figura 28), por consiguiente ésta fase no es adecuada para cuantificar sulfametazina.

Para las otras dos fases móviles se probó su adecuabilidad al utilizar muestras de cabras tratadas con sulfametazina. Se encontró una interferencia con la sulfametazina en la fase móvil metanol - acetonitrilo - ac. acético (0.5%) 10:15:75, mientras que la fase móvil acetonitrilo - ac. acético (0.5%) 15:85 que permitió obtener una adecuada pureza del pico de la sulfametazina. Por lo tanto ésta ultima fase móvil es adecuada para cuantificar sulfametazina en plasma de cabra.

Tabla XXI. fases móviles estudiadas con los respectivos tiempos de retención y coleo para la sulfametazina.

Fase móvil	Tiempo de retención (min)	Coleo	Tiempo de retención (min)	Coleo
	Sulfatiazol		Sulfametazina	
CH3CN - COOHCH3(.25%) 15:85	4.12	1.108	6.48	1.078
CH3CN - COOHCH3(0.5%) 15:85	4.12	1.100	6.34	1.087
CH3CN - MEOH - COOHCH (0.5%) 15:10:75	2.72	1.171	4.12	1.157

Tabla XXII. Análisis de pureza de los picos cromatográficos de sulfatiazol y sulfametazina en fase móvil: Metanol - Acetonitrilo - Ac. Acético (0.5%) 10:15:75 de muestras de plasma fortificado.

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.025	1.043	2.648	0.202	1.055	4.248
0.020	1.050	2.848	0.030	1.058	4.048
0.014	1.048	2.598	0.020	1.060	3.998
0.010	1.047	2.798	0.014	1.062	4.315

Figura 27. Análisis espectral de los picos cromatográficos de sulfatiazol y la sulfametazina de muestras de plasma fortificado en la fase móvil: Metanol - Acetonitrilo - Ac. Acético (0.5%) 10:15:75.

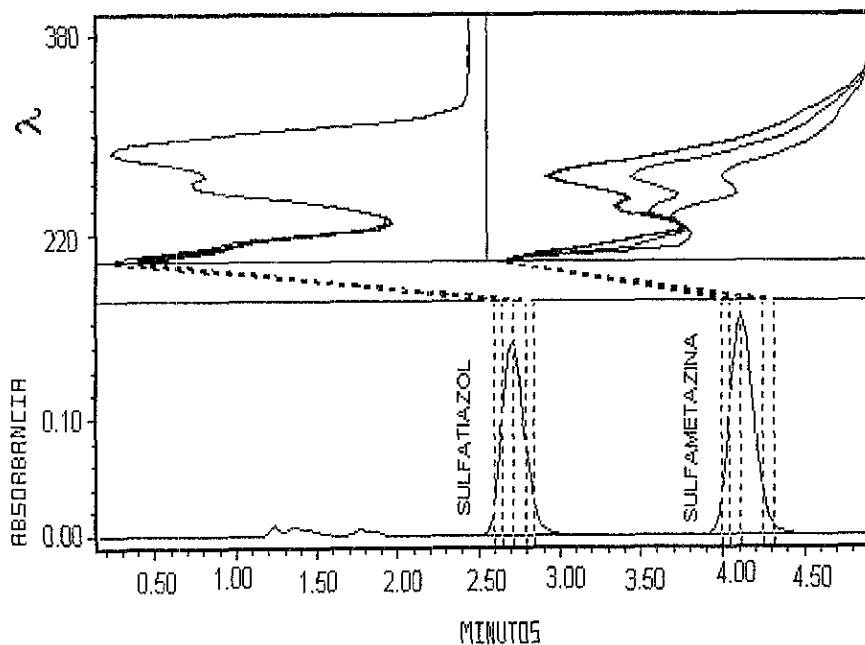


Tabla XXIII. Análisis de pureza de los picos cromatográficos de sulfatiazol y sulfametazina en fase móvil: Acetonitrilo - Ac. Acético (0.25%)15:85 de muestras de plasma fortificado.

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.804	1.132	4.015	1.308	1.140	6.382
0.127	1.144	4.232	0.307	1.156	6.265
0.074	1.157	4.315	0.080	1.152	6.332
0.061	1.162	3.965	0.058	1.167	6.948

Figura 28 Análisis espectral de los picos cromatográficos de sulfatiazol y sulfametazina de muestras de plasma fortificado en la fase móvil: Acetonitrilo - Ac. Acético (0.25%) 15:85.

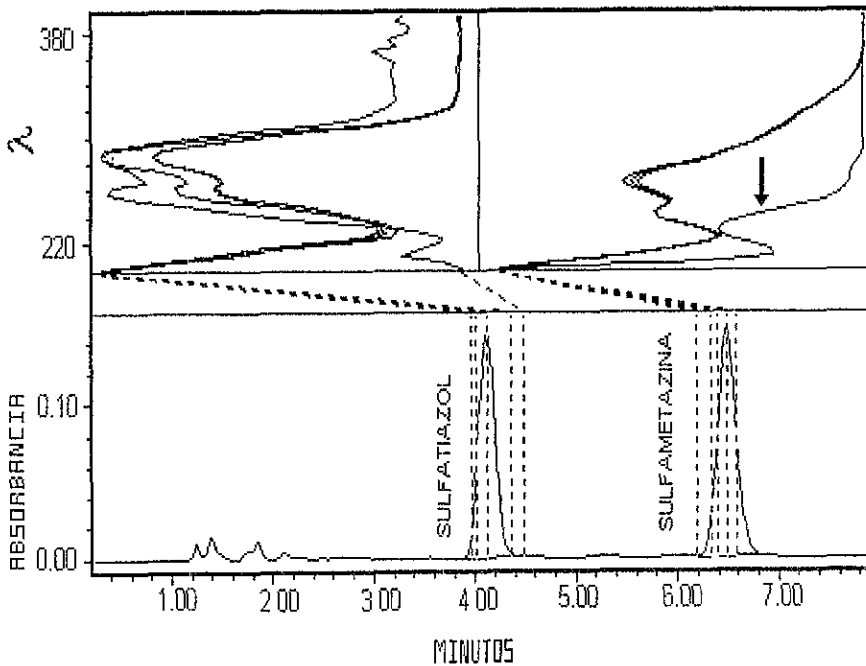
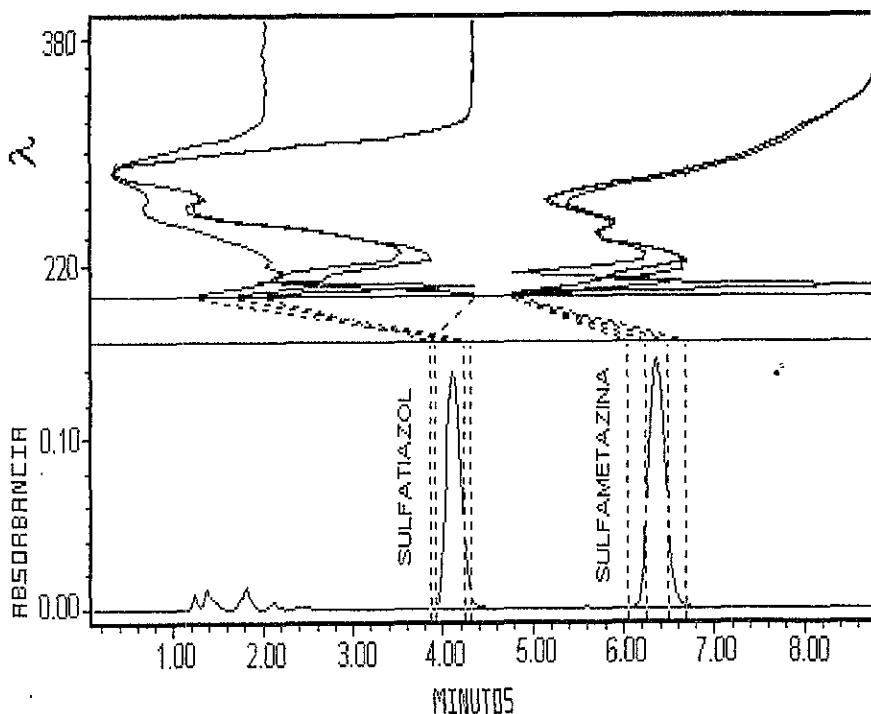
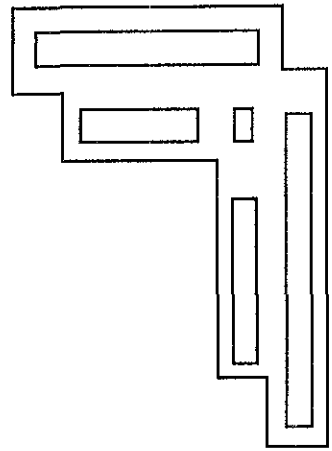
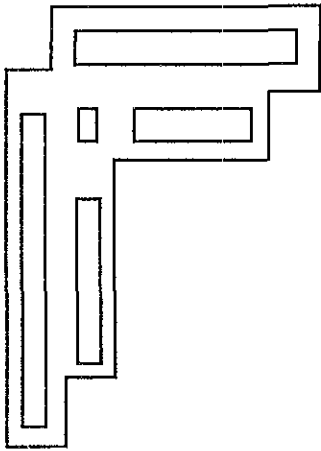


Tabla XXIV. Análisis de pureza de los picos cromatográficos de sulfatiazol y sulfametazina en fase móvil: Acetonitrilo - Ac. Acético (0.5%)15:85 de muestras de plasma fortificado.

Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.059	1.061	4.322	0.075	1.081	6.505
0.042	1.063	4.238	0.046	1.085	6.255
0.035	1.066	3.872	0.037	1.085	6.055
0.031	1.067	3.922	0.035	1.087	6.122

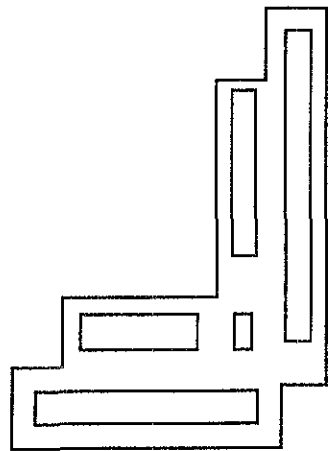
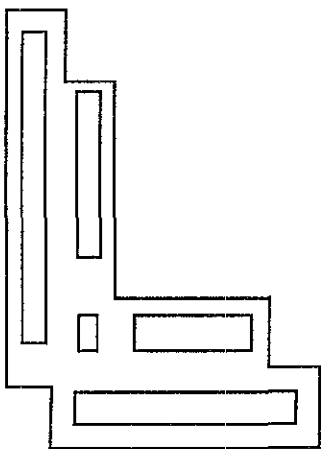
Figura 29. Análisis espectral del sulfatiazol y la sulfametazina en la fase móvil: Acetonitrilo - Ac. Acético (0.5%)15:85 de muestras de plasma fortificado





CAPÍTULO III.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO



1 EQUIPO, MATERIAL, REACTIVOS Y SOLUCIONES.

• EQUIPO:

El equipo usado se encuentra descrito en el capítulo II del desarrollo del método analítico (página 48).

• MATERIAL:

Matraces volumétrico de 500, 200, 100, 50 y 10 ml.

Pipetas volumétricas de 10, 5, 4, 3, 2, 1 y 0.5 ml.

Fascos vial limpios de 5 ml.

Jeringas plastipack de 3 y 5 ml.

• REACTIVOS:

KH_2PO_4 Grado Reactivo. Marca Monterrey.

Metanol Grado cromatográfico. Marca OmniSolv.

Acetonitrilo Grado cromatográfico. Marca OmniSolv.

NaOH Grado reactivo. Marca Merck.

Agua con calidad de 18.2 M Ω cm. Millipore.

Se tomará en cuenta el certificado de pureza que describe el fabricante.

• SOLUCIONES:

Hidróxido de sodio 1.5 N

Pesar 6.00 g de NaOH Grado Reactivo. Disolver con agua hervida fría, posteriormente filtrar y llevar a un volumen de 100 ml. Medir el valor de pH.

Búffer de fosfatos (pH 7.4)

Pesar 2.73 g de KH_2PO_4 disolver con 100 ml de agua, adicionar suficiente NaOH 1.5 N hasta ajustar el pH a 7.4. Después llevar a un volumen de 200 ml con agua desionizada.

Preparación de solución de sulfatiazol (40 $\mu\text{g/ml}$) (estándar interno)

Pesar 40 mg de sulfatiazol en vaso de precipitado de 15 ml, adicionarle 0.5 ml de NaOH 1.5 N

Adicionar lo anterior a un matraz volumétrico de 50 ml. Llevar al volumen de aforo con agua.

Tomar 5 ml de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml.

Llevar al volumen de aforo.

Preparación de 500 ml de ácido acético al 0.5%

Tomar 2.5 ml de ácido acético con una pipeta graduada de 5 ml.
 Adicionarlos a un matraz volumétrico de 500 ml.
 Llevar al aforo con agua desionizada con la calidad de 18.2 MΩcm.

Nota. Las soluciones deben ser transparentes. Si presentan algún precipitado o color, deseche y prepare nuevamente.

- **ESTÁNDARES:**

Sulfametazina base con pureza de 99.95%. HELM de México. Lote 0001
 Sulfatiazol. Materia prima. HELM de México Lote 12519

- **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:**

Columna:	C ₁₈ Smmetry 3.9 x 150 mm
Detección:	UV, λ = 266.2 nm.
Temperatura:	Medio ambiente.
Fase Móvil:	Acetonitrilo - Acido acético (0.05M) 15.85
Volumen de inyección:	20 µl

2. ENSAYO ANALÍTICO PARA SULFAMETAZINA EN PLASMA.

2.1 Preparación de plasma con estándar interno (sulfatiazol):

- Tomar 1 ml de muestra de plasma con una pipeta volumétrica y llevar a un frasco vial limpio de capacidad de 5ml.
- Adicionarle 0.5 ml de estándar interno (sulfatiazol) de una concentración de 40 µg/ml.
- Agitar ligeramente.

2.2 Extracción en fase sólida del plasma con sulfatiazol:

- Proceso de acondicionamiento:

Medir 2 ml de metanol con una jeringa de capacidad de 5 ml.
 Adaptar la jeringa al cartucho Sep-pak como se muestra en la figura 30
 Percolar el metanol al cartucho a una velocidad de 0.2 ml/ seg.
 Posteriormente medir 2 ml de buffer de fosfatos (pH =7.4) con una jeringa de capacidad de 5 ml.
 Adaptar la jeringa al cartucho Sep-pak.
 Percolar el buffer al cartucho a una velocidad de 0.2 ml/seg.
 El líquido que salga del cartucho Sep-pak de los anteriores pasos desecharlo.

- Proceso de carga.

Tomar todo el plasma con sulfatiazol que se encuentra en el frasco (del paso 2.1) con una jeringa limpia de 3 ml.

Hace pasar aproximadamente 1 ml. de aire por la jeringa.

Adaptar la jeringa que contiene el plasma fortificado al cartucho Sep-pak.

Percolar el plasma y el aire succionado al cartucho a una velocidad de 0.2 ml/10seg.

Deseche el líquido que salga del Cartucho Sep-pak.

- Proceso de limpieza.

Medir 2 ml de búffer de fosfatos pH = 7.4. con una pipeta volumétrica de 2 ml.

Vaciarlos a un frasco limpio de 10 ml. Tomarlos con una jeringa limpia de 5 ml.

Pasar aproximadamente 2 ml. de aire por la jeringa.

Adaptar la jeringa al cartucho Sep-pak y eluir su contenido a una velocidad de 0.2ml/10seg.

Desechar el líquido que salga.

- Proceso de recuperación.

Medir 2 ml de metanol con una pipeta volumétrica de 2 ml vaciarlos a un frasco limpio de 10 ml

Posteriormente tomarlos con una jeringa limpia de 3 ml

Pasar aproximadamente 1 ml de aire por la una jeringa

Adaptar la jeringa al cartucho Sep-pak anterior y eluir su contenido (metanol y aire) a una velocidad de 0 2 ml / 10min.

Colectar el líquido que salga

2.3 Cuantificación de la sulfametazina:

- Filtrar el líquido resultante de la extracción en fase sólida del plasma fortificado (del paso 2 2) como se muestra en figura 31.
- Colectar el líquido filtrado del paso anterior en un vial de capacidad de 1ml (especial para el automuestreador).
- Colocar el vial en el equipo cromatográfico.
- Inyectar la solución filtrada.
- Determinar la concentración a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Sulfametazina} = \frac{(R_m)}{(R_s)} * \text{CSMZ} * 2$$

Donde:

Rm = Relación de áreas de la sulfametazina entre el sulfatiazol presentes en la muestra

Rs = El promedio de las relaciones de áreas de la sulfametazina entre el sulfatiazol presentes en el estándar.

CSTZ = Concentración de sulfametazina en el estándar.

Figura 30. Adaptación del cartucho en la jeringa

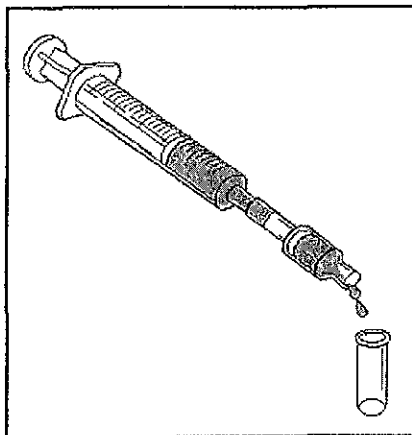
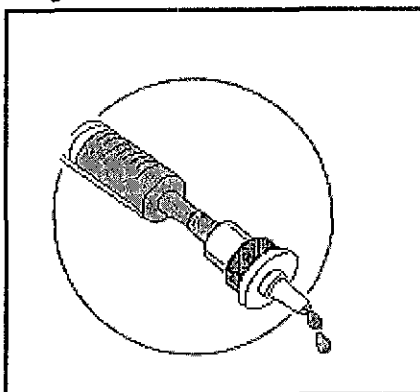


Figura 31. Filtración de muestras.



3. PLAN DE VALIDACIÓN

En la validación se evaluaron las siguientes características:

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

- Linealidad.
- Precisión.



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

- Especificidad.
- Linealidad del método.
- Precisión.
- Exactitud.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Reproducibilidad
- Repetibilidad.
- Estabilidad de la muestra en el disolvente de elución.
- Estabilidad del fármaco en la matriz biológica.

3.1 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

Linealidad del sistema:

Se determinó por medio de la preparación de una curva de calibración a partir de dos soluciones "stock" de Sulfametazina base preparadas en agua a diferente concentración, una a 50 µg/ml y otra a 200 µg/ml. Con la primera se prepararon soluciones de 0.25, 0.5 y 1 µg/ml y con la segunda solución stock se obtuvieron soluciones de 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 40 µg/ml. Se les adicionó sulfatiazol a cada una de las soluciones preparadas para obtener una concentración de sulfatiazol de 10 µg/ml. La curva de calibración fue preparada por duplicado en dos diferentes días.

Precisión del sistema:

Se prepararon por sextuplicado soluciones a tres concentraciones (1, 8 y 20 µg/ml), a partir de una solución stock de sulfametazina de 200 µg/ml. Se adicionó sulfatiazol a cada una de las soluciones preparadas para obtener una concentración de sulfatiazol de 10 µg/ml. Posteriormente se inyectó al sistema cromatográfico cada una de las soluciones preparadas.

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En cada uno de los criterios de validación evaluados se utilizó plasma de cabras no tratadas y las muestras se analizaron de acuerdo con el ensayo analítico para sulfametazina en plasma (Pag. 65).

Linealidad del método:

Se prepararon soluciones de sulfametazina en agua de 40, 80, 160, 240, y 400 µg/ml a partir de una solución stock de 4000 µg/ml. Se tomó una alícuota de 1 ml de cada una y diluyó a 10 ml con plasma. Las concentraciones de sulfametazina en estas soluciones de plasma fueron de 4, 8, 16, 24 y 40 µg/ml. Se dejaron reposar las soluciones de plasma durante 12 horas a temperatura ambiente. Después cada una de estas soluciones fueron analizadas por triplicado.

Precisión y Exactitud del método:

Se prepararon soluciones de sulfametazina en agua de 80, 240, y 400 µg/ml a partir de una solución stock de 4000 µg/ml. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de cada una y se diluyó a 10 ml con plasma. Las concentraciones finales de sulfametazina fueron de 8, 24 y 40 µg/ml. Después se analizaron por sextuplicado.

Reproducibilidad y Repetibilidad:

Se evaluó con los resultados obtenidos por 2 analistas y en dos días distintos de la siguiente manera:

Los analistas efectuaron de manera independiente el análisis por triplicado de muestras con concentraciones de 8, 24, y 40 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina preparadas con plasma.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

Se prepararon muestras con concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, y 4 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina en plasma. Las concentraciones 0.5 y 4 $\mu\text{g/ml}$ se analizaron por triplicado, mientras que, las concentraciones 1, 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$ se analizaron por sextuplicado.

Estabilidad de la sulfametazina

• *En el Disolvente de Elución (Metanol):*

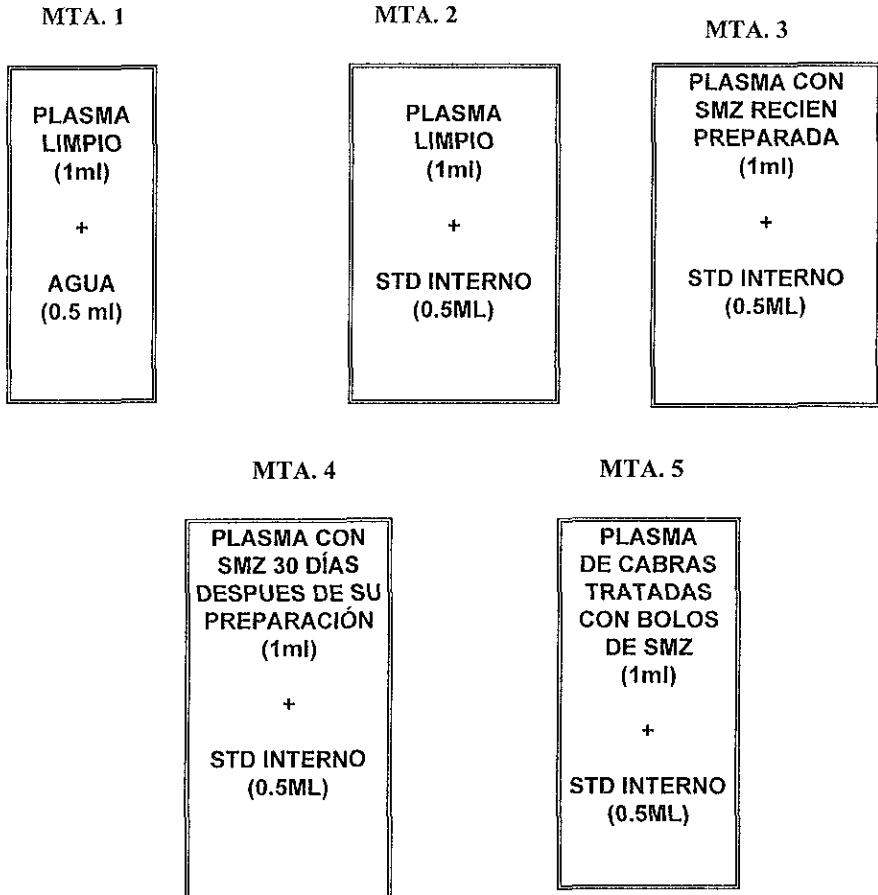
Se estudio la estabilidad de 27 muestras tres niveles de concentración de sulfametazina (4, 16, y 40 $\mu\text{g/ml}$) obtenidas después de haberlas eluido a través de columnas Sep-pak C_{18} . Se determinó el contenido de sulfametazina de cada una de las muestras antes de almacenarlas a 4°C. Se analizó 3 muestras de cada concentración a los 5, 15 y 30 días de almacenamiento a 4°C.

• *En plasma:*

Se estudio la estabilidad de 27 muestras a tres niveles de concentración de sulfametazina (4, 16, y 40 $\mu\text{g/ml}$) preparadas en plasma. Se determinó el contenido de sulfametazina de 3 muestras de cada nivel de concentración de sulfametazina el día de su preparación, mientras que las 6 muestras restantes de cada concentración se almacenaron a 4°C. Se analizaron 3 muestras de cada nivel de concentración a los 15 y 30 días de almacenamiento.

Especificidad:

Para determinar la especificidad del método analítico se analizó el comportamiento cromatográfico de 5 muestras de plasma con las siguientes características:



Se verificó la pureza de los picos de interés en las muestras de plasma con ayuda del software millennium

3.3 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Los criterios especificados para que el método analítico sea confiable se muestran en la tabla XXV.

Tabla XXV. Especificaciones para la evaluación de las características del método.

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	CRITERIO DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN.
Linealidad del sistema	C.V. (coeficiente de variación) r^2 (coeficiente de determinación) r (coeficiente de correlación)	C.V. \leq 2.00% $r^2 \geq$ 0.999 $r \geq$ 0.999
Precisión del sistema	C.V.	C.V. \leq 2.00%
Especificidad	Angulo de pureza y Umbral de pureza	Angulo de pureza menor al umbral de pureza.
Linealidad del método	C.V. (coeficiente de variación) r^2 (coeficiente de determinación) r (coeficiente de correlación)	C.V. \leq 15.00% $r^2 \geq$ 0.999 $r \geq$ 0.999
Precisión del método.	C.V.	C.V. \leq 15.00%
Exactitud.	Prueba de " t de student "	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha, gl)$ $t_{crítica} (0.05,5) = 2.57058$
Reproducibilidad y Repetibilidad	Modelo factorial jerárquico	Analista: $F_{cal} < F_{crítica} (\alpha, GL_{analista}, GL_{día})$ $F_{crítica} (0.05,1,2)=5.3177$ Día: $F_{cal} < F_{crítica} (\alpha, GL_{día}, GL_{error})$ $F_{crítica} (0.05,2, 8)=4.4590$
Estabilidad de SMZ	Modelo factorial jerárquico	Concentración: $F_{cal} < F_{crítica} (\alpha, GL_{Conc}, GL_{tiempo\ de\ almacenamiento})$ Tiempo de almacenamiento. $F_{cal} < F_{crítica} (\alpha, GL_{tiempo\ de\ almacenamiento}, GL_{error})$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

4.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la tabla XXVI se muestran las respuestas obtenidas de los ensayos para evaluar la linealidad del sistema.

Tabla XXVI. Respuestas para la determinación de la linealidad del sistema de sulfametazina base

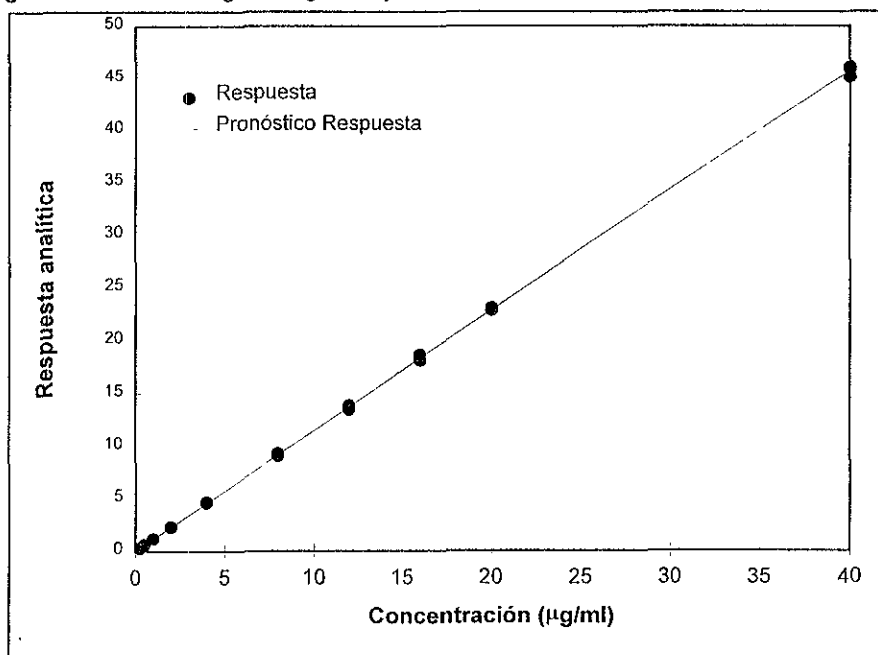
CONCENTRACIÓN µg/ml	RESPUESTA ANALÍTICA (ÁREA.SMZ /ÁREA STA)*CONC. STA	
Curva 1		
0.25028	0.29519	0.28927
0.50056	0.58275	0.57529
1.00112	1.14547	1.14882
1.00112	1.14079	1.13813
1.00112	1.14942	1.13327
1.99140	2.31600	2.26425
3.99828	4.64579	4.63291
7.99656	9.03170	9.10583
7.99656	9.09230	8.96280
7.99656	8.95771	9.07117
11.99484	13.83030	13.53138
15.99312	18.22176	18.62095
19.99140	23.03117	23.06257
19.99140	22.99369	23.16667
19.99140	23.08799	22.91903
39.98280	45.93052	46.03977
Curva 2		
0.25067	0.29724	0.29461
0.50153	0.58922	0.59251
1.00270	1.17801	1.16947
1.00270	1.17820	1.16736
1.00270	1.17341	1.17217
2.00000	2.31457	2.27081
4.00000	4.63750	4.56158
8.00000	9.13213	8.97752
8.00000	9.18723	9.19239
8.00000	9.20840	9.27049
12.00000	13.46983	13.47730
16.00000	18.14693	18.07109
20.00000	22.83855	23.09892
20.00000	23.05460	23.71057
20.00000	22.91747	22.74477
40.00000	45.08695	45.86347

El análisis estadístico se realizó aplicando el software Excel versión 7.0

Las ecuaciones obtenidas de ambas curvas a partir de un análisis de regresión se muestran a continuación.

CURVA	MODELO DETERMINADO
Curva 1	Respuesta Analítica = 1.15147*Concentración de SMZ -0.03839
Curva 2	Respuesta Analítica = 1.14064*Concentración de SMZ +0.03204
Global	Respuesta Analítica = 1.14605*Concentración de SMZ -0.00316

Figura 32. Curva de regresión global ajustada.

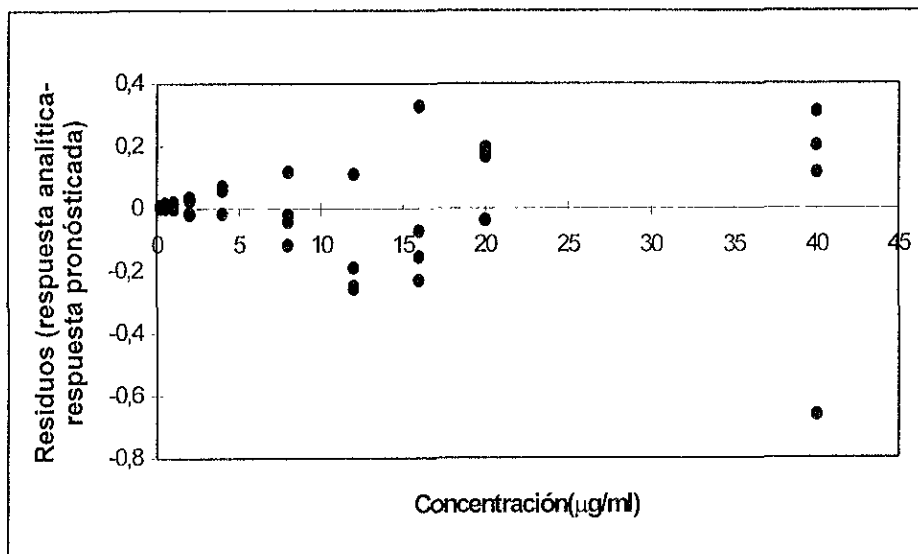


PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN	CURVA 1	CURVA 2	GLOBAL
Coefficiente de correlación (r)	0.99996	0.99984	0.99989
Coefficiente de determinación (r ²)	0.99992	0.99968	0.99978
Coefficiente de variación (C.V.)	1.17944	1.65445	1.45349

De acuerdo a los datos del regresión obtenidos las ecuaciones de regresión observamos que el 99.9% de la variación de la respuesta analítica está explicada por los cambios en la concentración de sulfametazina

Por otro lado los criterios de aceptación para métodos cromatográficos el C.V. debe ser menor al 2% por lo que se puede apreciar que los valores obtenidos son menores al establecido.

Figura 33. Gráfico de residuales global.



El gráfico de residuales nos permite observar cuánto se desvían los datos experimentales con respecto a los valores estimados por la recta de regresión. En el análisis de residuales observamos que a la concentración de 40 µg/ml se presenta la mayor desviación con un residuo de 0,79, correspondiente a un error relativo de 3,3%.

Con el fin de demostrar si existe una relación entre las variables en estudio se realizó un análisis de variancia y se estableció la siguiente hipótesis.

Hipótesis:	
Ho:	No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica .
Ha:	Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica .
Criterio de aceptación:	
Si $F_{cal} < F_{critica}$	no se rechaza.
Si $F_{cal} > F_{critica}$	se rechaza.

Tabla XXVII. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema (nivel de significancia seleccionado para la prueba $\alpha = 0.05$)

	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F _{cal.}	F crítica
Curva 1					
REGRESIÓN	1	4716.4024	4716.4024	386443.4958	4 17089
RESIDUOS	30	0.3661	0.0122		
TOTAL	31	4716.7686			
Curva 2					
REGRESIÓN	1	4631.5778	4631.5778	93738.7483	4.17089
RESIDUOS	30	1.4823	0 0494		
TOTAL	31	4633 0601			
Global					
REGRESIÓN	1	9347.7650	9347.7650	278436.4700	3.9959
RESIDUOS	62	2 0815	0.0336		
TOTAL	63	9349.8465			

De acuerdo a la hipótesis establecida y a los resultados obtenidos en el análisis de variancia, se rechaza Ho, por lo tanto existe evidencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 que la variación de la respuesta está explicada por la variación de la concentración.

Por otro lado se observa que existen diferentes valores de ordenadas al origen y pendientes por lo que se evaluó si eran significativamente diferentes del valor de cero con un nivel de significancia (α) de 0.05. Para ello se estableció la siguiente hipótesis:

Hipótesis.

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho.

Tabla XXVIII. Valores obtenidos para la ordenada al origen y para la pendiente

	COEFICIENTE	t_{cal}	$t_{crítica}$	LCI AL 95%	LSC AL 95%
Curva 1					
Ordenada al origen	-0.03839	-1.41936	2.03951	-0.09364	0.0168
Pendiente	1.15147	621.64580		1.14769	1.1552
Curva 2					
Ordenada al origen	0.03204	0.58867	2.03951	-0.07912	0.1432
Pendiente	1.14064	306.16784		1.13303	1.1482
Global					
Ordenada al origen	-0.00316	-0.09976	1.99834	-0.06658	0.0602
Pendiente	1.14605	527.67080		1.14171	1.1503

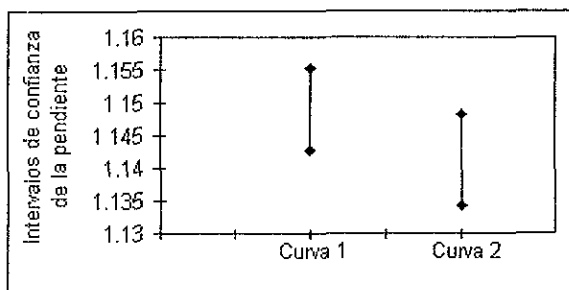
LCI = límite de confianza inferior

LSC = Límite de confianza superior.

De acuerdo a los resultados obtenidos y la hipótesis establecida, existe evidencia estadística que la ordenada al origen de la recta de regresión pasa por cero con una probabilidad del 95%.

La pendiente puede adquirir diversos valores como se aprecia en la tabla XXVIII. En la figura 34 se observa el gráfico que representa los intervalos de confianza para las curvas. En dicho gráfico se observa que los intervalos de confianza de las pendientes correspondientes a la curva 1 y curva 2 se traslapan, por consiguiente se concluye que los puntos de las rectas de regresión satisfacen la misma ecuación.

Figura 34. Gráfico representativo de los intervalos de confianza para las curvas de regresión



4.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar si las respuestas del sistema dentro del intervalo de trabajo son precisas se analizaron por sextuplicado soluciones a diferentes concentraciones de sulfametazina y se les trató estadísticamente. La tabla XXIX muestra los datos obtenidos a partir de los ensayos realizados.

Tabla XXIX. Resultados obtenidos para determinar la precisión del sistema

CONCENTRACIÓN DE SULFAMETAZINA µg/ml	RESPUESTA ANALÍTICA (ÁREA.SMZ /ÁREA STA)*CONC. STA		
	Primer día		
1.00112	1.14547	1.14882	1.14079
	1.13813	1.14941	1.13327
7.99828	9.03170	9.10583	9.09230
	8.96280	8.95771	9.07117
19.99140	23.03117	23.06257	22.99369
	23.16667	23.08799	22.91903
Segundo día			
1.00270	1.17801	1.16947	1.17820
	1.16736	1.17341	1.17217
8.00000	9.13213	8.97752	9.18723
	9.19239	9.20840	9.27049
20.01400	22.83855	23.09892	23.05460
	23.71057	22.91747	22.74477

Se determinó la desviación estándar, el promedio y el coeficiente de variación de las respuestas analíticas (Ver tabla XXX).

Tabla XXX. Resultados del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada concentración.

CONCENTRACION	PROMEDIO	DESVIACION ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACION
Resultados del primer día			
1.00112	1.14265	0.00638	0.55872
7.99828	9.03692	0.06447	0.71344
19.9914	23.04352	0.08443	0.36638
Resultados del segundo día			
1.0027	1.17311	0.00441	0.37571
8.0000	9.16136	0.10041	1.09596
20.0000	23.06081	0.34453	1.49401

En todos los casos el coeficiente de variación es menor de 2, valor límite establecido para la aceptación de los datos cromatográficos por lo tanto el sistema es preciso

ESTE TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

5.1 ESPECIFICIDAD

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para evaluar la especificidad del método cromatográfico.

Figura 35. Muestra de plasma limpio con 0.5 ml de agua.

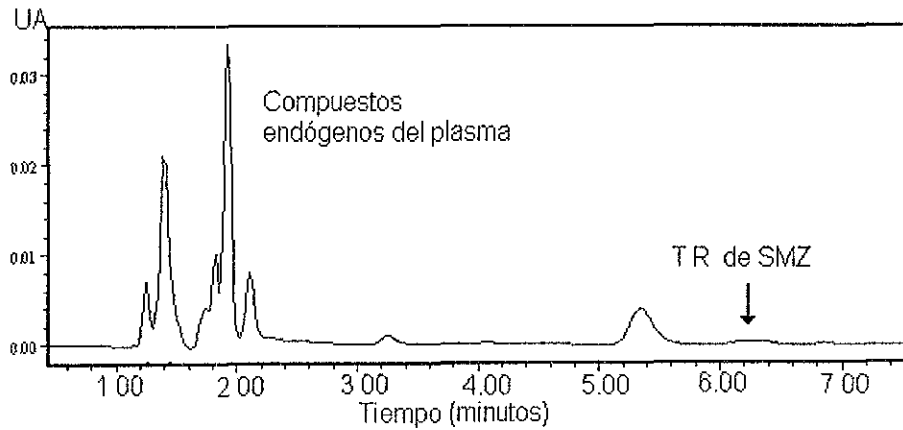


Figura 36. Plasma limpio adicionado con 10 µg/ml sulfatiazol.

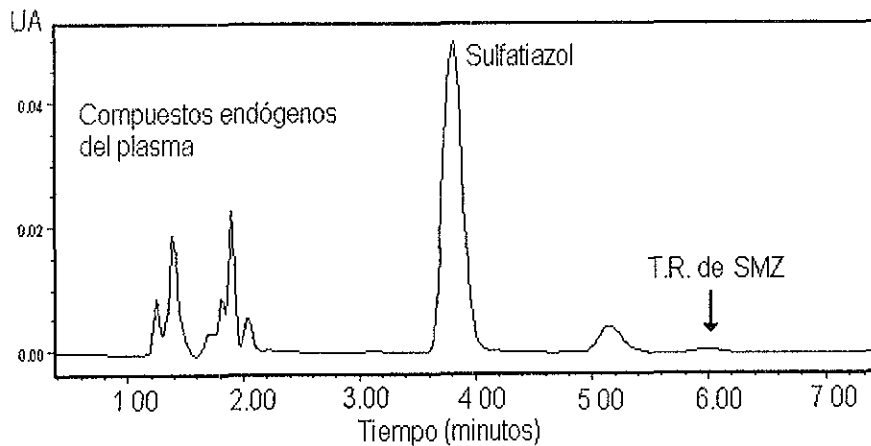


Figura 37. Plasma limpio adicionado con 24 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de sulfatiazol.

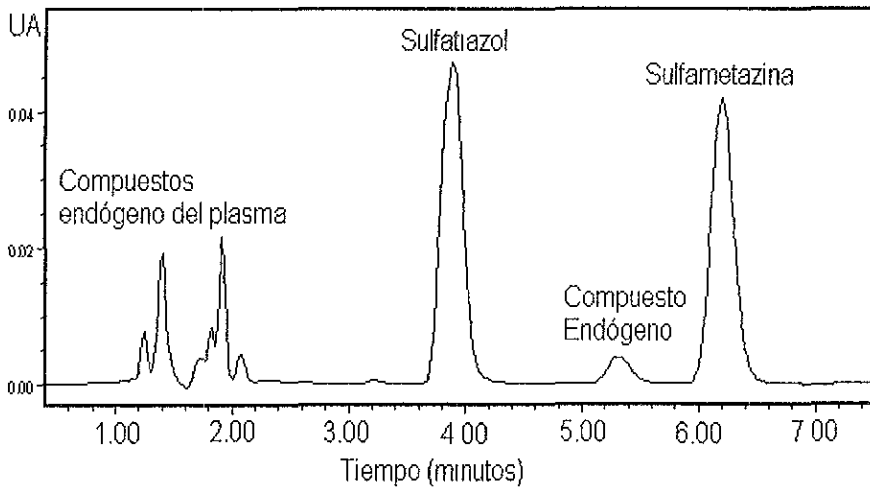


Figura 38. Plasma de cabra después de 144 horas de ser administrado un bolo de sulfametazina sódica. P.B productos de biotransformación.

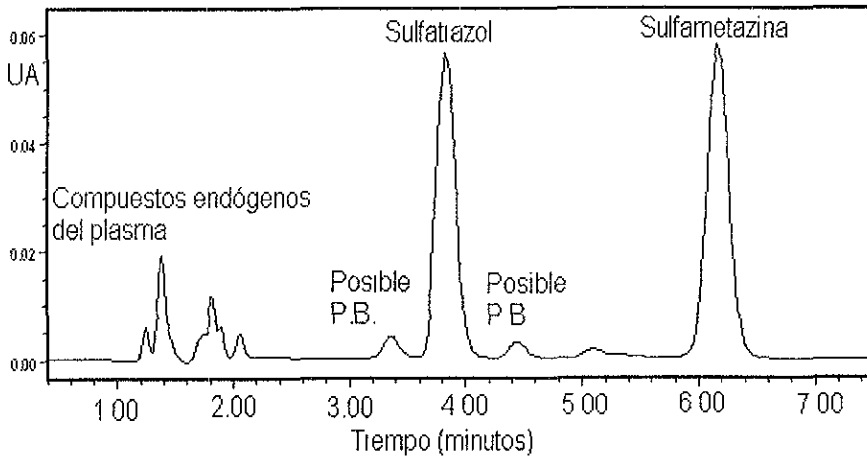
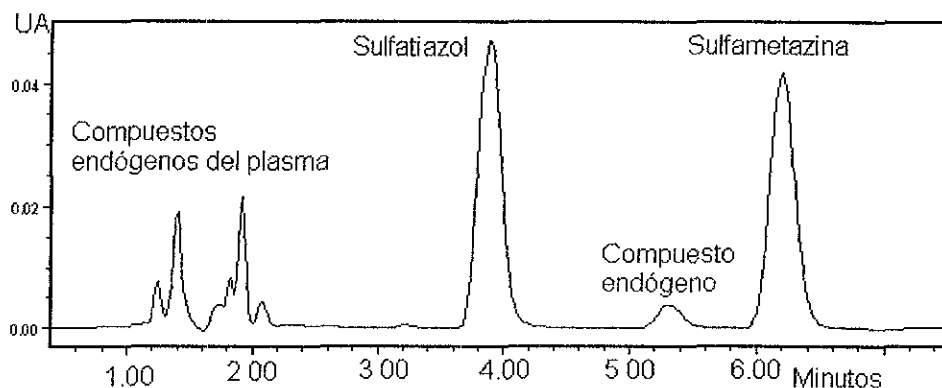


Figura 39. Plasma adicionado con sulfametazina después de 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4°C).



Como se observa en los cromatogramas de la figura 35 y 36, al tiempo de retención de la sulfametazina (señalado con flecha) se encuentra presente un pequeño pico de alguna sustancia endógena del plasma. Sin embargo al realizar el estudio de pureza u homogeneidad del pico de sulfametazina de los cromatogramas de las figuras 37, 38 y 39 con ayuda del software millennium (ver tablas XXXI, XXXII y XXXIII). Se determinó que el ángulo de pureza es menor al umbral de pureza para los picos cromatográficos, lo que indica que se encuentran puros. Además se observa que las características espectrales no cambian y que únicamente corresponden a los compuestos de interés. Por lo tanto el método se considera específico para la determinación de sulfametazina en plasma de cabra.

Tabla XXXI. Análisis de pureza de la muestra de plasma después de 144 horas de ser administrado con bolos de sulfametazina sódica a la cabra.

Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.309	1.255	3.943	0.259	1.319	6.010
0.049	1.294	4.227	0.068	1.336	6.293
0.051	1.299	4.043	0.041	1.328	6.577
0.029	1.292	4.110	0.031	1.429	6.077

Tabla XXXII. Análisis de pureza de la muestra de plasma fortificado (con sulfametazina) después de 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4°C).

Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.264	1.155	4.098	0.076	1.225	6.032
0.038	1.161	4.332	0.039	1.241	6.098
0.033	1.173	3.632	0.032	1.236	6.298
0.026	1.200	3.965	0.024	1.230	6.132

Tabla XXXIII. Análisis de pureza de la muestra de plasma limpio adicionado con 24 µg/ml de sulfametazina con 10mcg/ml de sulfatiazol.

Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Máxima impureza
Sulfatiazol			Sulfametazina		
0.299	1.233	4.032	0.209	1.211	6.065
0.103	1.267	3.815	0.047	1.222	5.865
0.054	1.262	4.182	0.039	1.256	6.448
0.032	1.251	3.715	0.025	1.234	6.265

5.2 LINEALIDAD DEL METODO

Para evaluar la linealidad del método se determinó la respuesta analítica (Área de SMZ/Área de STA* Conc. de STA) para cada concentración analizada, así como la correspondiente concentración recuperada. En la tabla XXXIV se muestran las respuestas analíticas obtenidas de diferentes concentraciones, así como su correspondiente ecuación de regresión. En la tabla XXXV se presentan los resultados de las concentraciones adicionadas con sus correspondientes concentraciones recuperadas.

Tabla XXXIV. Respuesta analíticas obtenidas para cada concentración.

CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/ml)	RESPUESTA ANALÍTICA (Área de SMZ/Área de STA) *Conc. STA		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
4.00260	2.19781	2.31808	2.37565
8.00520	4.58102	4.62867	4.68688
16.01040	9.42105	9.53448	9.62449
24.01560	13.96002	13.98538	14.26891
40.02598	23.26525	23.48489	23.50207

La ecuación obtenida a partir del análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la concentración adicionada es la siguiente:

$$\text{Respuesta analítica} = (\text{Concentración adicionada}) * 0.58616 - 0.00346$$

Tabla XXXV. Resultados para determinar la linealidad del método de sulfametazina.

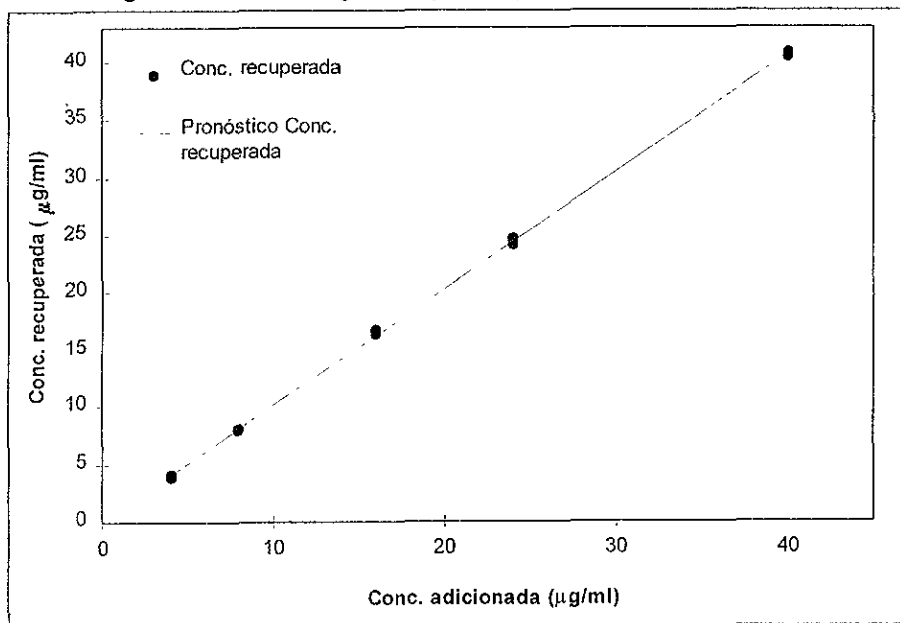
CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/ml)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/ml)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
4.00260	3.81293	4.02158	4.12146
8.00520	7.94750	8.03017	8.13115
16.01040	16.34436	16.54114	16.69729
24.01560	24.21891	24.26289	24.75478
40.02598	40.36231	40.74336	40.77316

Por otro lado se determinó el modelo que explica la variación de la concentración recuperada en función la concentración adicionada por medio de un análisis de regresión lineal.

En la figura 40 se observa una relación lineal entre la concentración recuperada y la concentración adicionada explicada por la ecuación :

$$\text{Concentración recuperada} = (\text{Concentración adicionada}) * 1.01692 - 0.00600$$

Figura 40. Curva de regresión ajustada para la linealidad del método.



Para demostrar si existe una relación lineal entre las variables en estudio se estableció la siguiente hipótesis.

Hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ se no se rechaza Ho.

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza Ho.

Tabla XXXVI. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del método (nivel de significancia seleccionado para la prueba $\alpha = 0.05$)

	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F_{cal}	$F_{crítica}$
Regresión	1	2544 78273	2544 78273	49755.95981	4.6671
Residuos	13	0.6648887	0.05114528		
Total	14	2545 44761			

Se calcularon los coeficientes de regresión:

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN	
Coefficiente de correlación (r)	0.99987
Coefficiente de determinación (r^2)	0.99974
Coefficiente de variación (C.V.)	2.09289

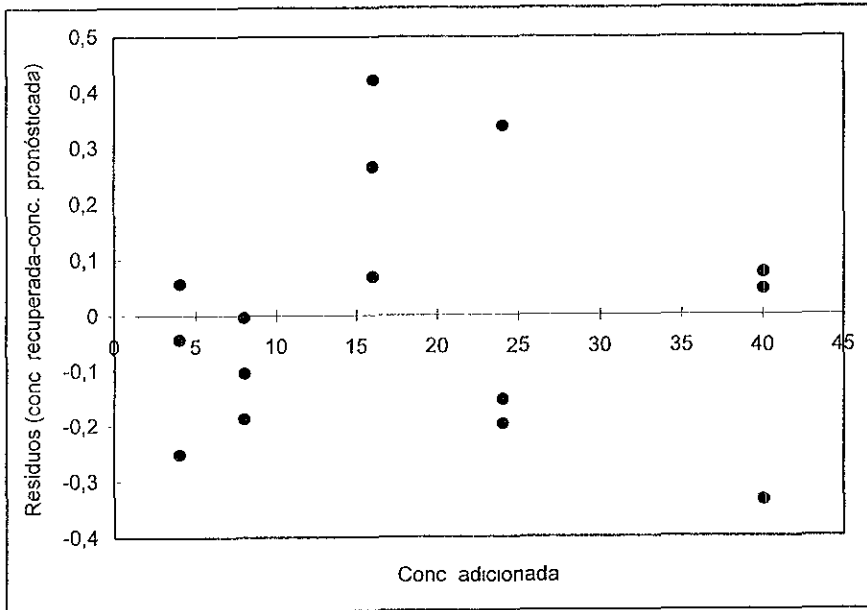
Los resultados del análisis de variancia muestran que H_0 se rechaza. Se establece con un nivel de significancia (α) de 0.05 que la variación de la concentración recuperada está relacionada linealmente con la variación de la concentración adicionada.

De acuerdo al valor del coeficiente de determinación, la regresión explica el 99.97% de la variación de la concentración recuperada en función del cambio en la concentración adicionada.

El coeficiente de variación para la recta de regresión tiene un valor menor al criterio de aceptación recomendado (Crosby, N. 1995:80) para métodos bioanalíticos ($\leq 15\%$) por lo tanto el método tiene una precisión adecuado para los fines de su aplicación.

En la figura 41 se muestra el gráfico de residuales obtenido a partir de los residuos contra la concentración adicionada. Dicho gráfico permite observar cuánto se están desviando las concentraciones pronosticadas por la ecuación de regresión con respecto a las concentraciones determinadas experimentalmente. La mayor desviación que se observa es el residuo de -0.3350 correspondiente a la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, el error relativo para éste residuo es de 2.64 %.

Figura 41. Curva de residuales para la linealidad del método.



Como se aprecia en la ecuación de regresión obtenida de los resultados de la tabla XXXV, el valor de la ordenada al origen es distinto a cero, por ello se realizó el análisis estadístico correspondiente para determinar si es significativamente diferente de cero con un $\alpha = 0.05$ para ello se estableció la siguiente hipótesis

Hipótesis.

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} > t_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $t_{cal} < t_{crítica}$ se rechaza Ho.

Tabla XXXVII. Prueba de "t de student" e intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente.

	COEFICIENTES	t cal.	t crítica	LCI AL 95%	LCS AL 95%
Ordenada al origen	-0.00600	-0.05866	2.14479	-0.22690	0.21490
Pendiente	1.01692	223.06044		1.00707	1.02677

LCI = límite de confianza inferior

LSC = Límite de confianza superior.

De acuerdo a la hipótesis establecida y los resultados obtenidos existe la probabilidad del 95 % de confianza que la recta de regresión pase por el origen.

Se evalúa mediante la pendiente de regresión que el método puede recuperar el 100 % de la cantidad adicionada debido a que el valor de 1 entra dentro del intervalo de confianza.

5.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

La precisión y exactitud fue evaluada a tres niveles de concentración de sulfametazina. El porcentaje determinado para cada nivel de concentración analizado se obtuvo por medio de la interpolación de las respuestas analíticas (Área de SMZ / Área de STA * Conc. de STA) en la curva de calibración del método de la tabla XXXIV. Los resultados obtenidos para evaluar la exactitud y precisión se muestran en la tabla XXXVIII.

Tabla XXXVIII. Resultados obtenidos a partir del análisis por sextuplicado de muestras a 3 concentraciones diferentes para determinar la exactitud y precisión.

CONCENTRACIÓN AÑADIDA DE SMZ (µg/ml)	% DETERMINADO DE SMZ			
8	98.75	99.76	101.00	
	101.89	102.57	103.47	
24	96.21	96.71	99.21	
	98.30	99.03	101.22	
40	98.03	100.34	101.37	
	99.54	101.29	106.71	

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (Tabla XXXIX) de los porcentajes determinados a partir de muestras con sulfametazina.

Tabla XXXIX. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes obtenidos de cada concentración analizada.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	*N	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	C.V.
8	6	101.24	1.76723	1.74555
24		98.45	1.82405	1.85283
40		101.21	2.96447	2.92892

*N = Número de repeticiones.

Los coeficientes de variación obtenidos son menores al recomendado como criterio de aceptación para métodos bioanalíticos ($C.V. \geq 15$) por lo tanto nuestro método se considera preciso.

Por medio de la prueba de "F" se determinó que las variaciones correspondientes a los porcentajes adicionados y recuperados son diferentes con un nivel de significancia $\alpha > 0.05$. Por consiguiente la exactitud del método se determinó por una prueba de "t" con variancias desiguales, en la tabla XL se muestran los resultados obtenidos.

Hipótesis.

Ho. El promedio del % adicionado es igual al promedio del % determinado.

Hi: El promedio del % adicionado es diferente al promedio del % determinado

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{crítica}}$ no se rechaza Ho

Si $t_{\text{cal}} > t_{\text{crítica}}$ se rechaza Ho.

Tabla XL. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método.

NIVEL DE CONCENTRACIÓN AÑADIDA DE SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	PARÁMETROS			INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%	
	X	s	t cal.	LCI	LCS
8	101.24	3.12310	1.72117	93.21	109.27
24	98.45	3.32716	-2.08561	89.89	107.00
40	101.21	8.78810	1.00298	78.62	123.80
$t_{\text{crítica}} (0.05, 5) = 2.57058$					

LCI = Límite de confianza inferior.

LCS = Límite de confianza superior.

El método es exacto a un nivel de confianza del 95 % debido a que el valor de t_{cal} es menor al valor $t_{critica}$ como se muestra en la tabla XL por lo tanto es apto para determinar la sulfametazina en plasma de cabra.

5.4 REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD.

Se estableció la reproducibilidad y repetibilidad por medio de los resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de sulfametazina para cada concentración, analizados por diferente analista, en diferentes días (Tabla XLI).

Tabla XLI. Resultados de porcentajes de recuperación de sulfametazina para determinar la reproducibilidad y repetibilidad.

% DE RECUPERACIÓN DE LA SULFAMETAZINA A PARTIR DEL ANÁLISIS OBTENIDO EN EL PRIMER DÍA						
Concentración de SMZ añadida ($\mu\text{g/ml}$)	Analista 1			Analista 2		
8	99.8812	99.9237	101.8220	103.5970	102.692	103.5500
24	95.5923	96.1237	96.7512	95.7146	96.8603	102.3530
40	100.8566	96.9087	97.4693	99.8910	100.2040	98.3709
% DE RECUPERACIÓN DE LA SULFAMETAZINA A PARTIR DEL ANÁLISIS OBTENIDO EN EL SEGUNDO DÍA						
Concentración de SMZ añadida ($\mu\text{g/ml}$)	Analista 1			Analista 2		
8 m/ml	98.5828	102.7340	106.3250	98.7488	99.7640	101.0040
24 m/ml	95.7146	96.8603	102.3530	96.2145	96.7114	98.2969
40 m/ml	98.5607	99.0944	100.3460	98.0294	99.5390	100.3433

Para determinar si existe diferencia entre los porcentajes de recuperación obtenidos para cada concentración entre días y analistas se realizó un análisis de variancia anidado o jerárquico estableciendo la siguiente hipótesis:

Hipótesis.

H_0 : No existe efecto del analista y el día en el % de recuperación

H_1 : Existe efecto del analista y/o el día en el % de recuperación.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0 .

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0 .

Tabla XLII. Análisis de variancia anidado para evaluar repetibilidad y reproducibilidad.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F_{cal}	$F_{\text{Crítica}}$
8	ANALISTA	1	0.00064	0.00064	5.3485E-05	5.31764
	DIA	2	23.79047	11.8952	2.67675	4.45897
	ERROR	8	35.55123	4.4439		
	TOTAL	11	59.34233			
CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F_{cal}	$F_{\text{Crítica}}$
24	ANALISTA	1	0.63284	0.63284	0.13691	5.31764
	DIA	2	9.24473	4.62237	0.69242	4.45897
	ERROR	8	53.40527	6.67566		
	TOTAL	11				
CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F_{cal}	$F_{\text{Crítica}}$
40	ANALISTA	1	0.82281	0.82281	1.24056	5.31764
	DIA	2	1.32651	0.66326	0.34262	4.45897
	ERROR	8	15.48683	1.93585		
	TOTAL	11				

Como se observa en la tabla XLII el análisis de variancia demostró que no existe evidencia estadística para rechazar H_0 por lo tanto no hay diferencia significativa en las determinaciones realizadas entre días diferentes y para distintos analistas. La variación observada en la respuesta analítica está explicada sólo por el cambio en la concentración. Por consiguiente el método es repetible entre días y reproducible entre analistas.

5.5 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para determinar el límite de detección y cuantificación del método se analizaron muestras a niveles de concentración bajos de sulfametazina y se determinó su respuesta analítica correspondiente. En la tabla XLIII se muestran los respuesta analíticas obtenidas.

Tabla XLIII. Repuestas obtenidas del análisis de muestras a niveles de concentración bajos de sulfametazina para determinar los límites de detección y cuantificación.

CONCENTRACIÓN ADICIONADA ($\mu\text{g/ml}$)	RESPUESTA ANALÍTICA (Área de SMZ/Área de STA* Conc. de STA)		
	0.50015	0.28582	0.27224
1.00030	0.53014	0.51700	0.54990
	0.52984	0.50892	0.52193
2.00060	1.01776	1.00586	1.00876
	1.01404	1.02164	1.01682
3.00090	1.50083	1.51743	1.46075
	1.46995	1.46338	1.48468
4.00120	2.01262	1.99449	2.01105

La ecuación obtenida a partir de un análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la concentración adicionada es la siguiente.

$$\text{Respuesta analítica} = \text{Concentración de SMZ} * 0.58752 + 0.04130 \text{ (Ecuación 3.1)}$$

Por otro lado las respuesta analítica correspondientes a cada concentración se les determinó sus respectivos intervalos de confianza (ver tabla XLIV). En el gráfico (figura 42) se muestran los intervalos de confianza de las respuesta analíticas así como la recta de regresión obtenida

Tabla XLIV. Límites de confianza de las muestras de sulfametazina a niveles de concentración bajos.

CONCENTRACIÓN DE SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	X DE LA RESPUESTA ANALÍTICA	LCI AL 95% DE LA RESPUESTA ANALÍTICA	LCS AL 95% DE LA RESPUESTA ANALÍTICA
0.0000		0.02312	0.05714
0.50015	0.33414	0.32003	0.34793
1.00030	0.62583	0.61661	0.63905
2.00060	1.22001	1.20734	1.22371
3.00090	1.78384	1.79260	1.81385
4.00120	2.41326	2.37470	2.40715

LCI = Límite de confianza inferior

LCS = Límite de confianza superior.

El valor de la respuesta analítica de **0.05714** correspondiente al límite de confianza superior de la concentración 0.0 $\mu\text{g/ml}$ se interpoló en la curva de regresión obtenida de los resultados de la tabla XLIII (respuesta analítica vs Concentración de SMZ). La concentración estimada fue **0.02896 $\mu\text{g/ml}$** la cual corresponde al límite de detección.

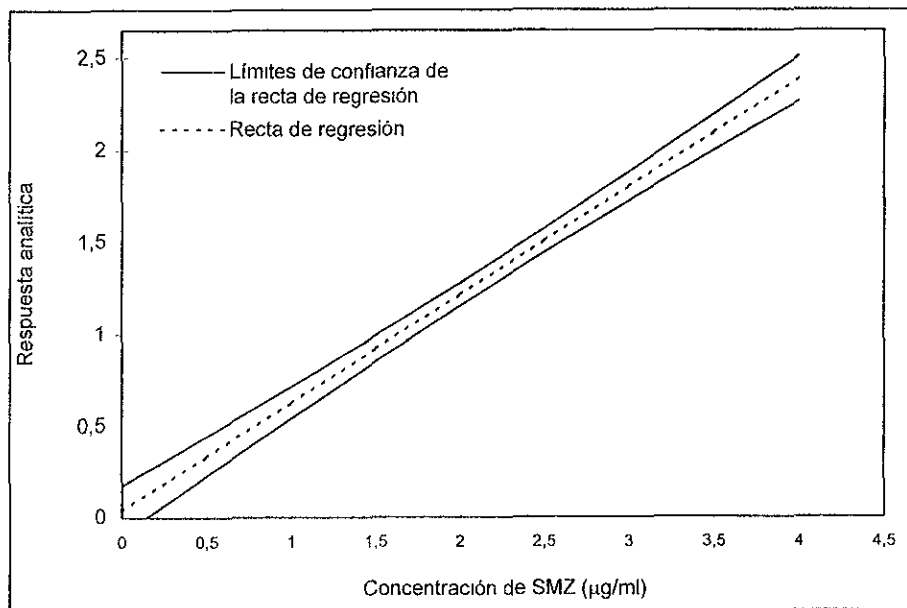
Para evaluar el límite de cuantificación se propusieron 3 concentraciones cercanas al límite de detección y se determinaron sus repuestas analíticas correspondientes al aplicar la ecuación 3.1. Posteriormente se calcularon los límites de confianza de dichas repuestas. En la tabla XLV se muestran los datos correspondientes.

Tabla XLV. Límites de confianza para respuesta analíticas pronosticadas por la ecuación de regresión.

CONCENTRACIÓN DE SMZ $\mu\text{g/ml}$	RESPUESTA ANALÍTICA PRONOSTICADA	LCI DE LA RESPUESTA ANALÍTICA	LCS DE LA RESPUESTA ANALÍTICA
0.032	0.05893	0.04212	0.07574
0.060	0.07538	0.05875	0.09202
0.900	0.56890	0.55717	0.58063

La concentración **0.060 $\mu\text{g/ml}$** corresponde al **límite de cuantificación** debido a que su límite de confianza inferior (**0.05875**) es el que más cerca al límite de confianza superior del intercepto (0.05714).

Figura 42. Gráfico de los intervalos de confianza de las respuesta analíticas en función de la concentración de sulfametazina.



Los límites de detección y cuantificación determinados con la recta de regresión no se verificaron. En base al intervalo de concentraciones de 0.5 a 4 $\mu\text{g/ml}$ se determinó experimentalmente el límite de cuantificación. Para esto se evaluó el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación de la sulfametazina en cada nivel de concentración. En la tabla XLVI se observa que el menor coeficiente de variación corresponde a la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. En este nivel de concentración se obtiene la mejor precisión y un mejor acercamiento al 100 % de recuperación (tablas XLVI y XLVII) por consiguiente el límite de cuantificación que se determinó experimentalmente es de 2.0 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla XLVI. Porcentajes de recuperación a concentraciones bajas de sulfametazina con sus respectivos coeficiente de variación (C.V.).

CONCENTRACIÓN AÑADIDA DE SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	% DE RECUPERACIÓN			C.V.
0.50015	114.29203	108.86442	110.05389	2.56859
1.00030	105.99595	103.36986	109.94797	2.67616
	105.93664	101.75447	104.35503	
2.00060	101.74552	100.55588	100.84574	0.58169
	101.37408	102.13304	101.65168	
3.00090	100.02534	101.13185	97.35437	1.52476
	97.96765	97.52976	98.94925	
4.00120	100.60062	99.69448	100.52234	0.50072

Tabla XLVII. Datos estadísticos obtenidos de la prueba de t para los porcentajes de recuperación de las concentraciones bajas de sulfametazina.

NIVEL DE CONCENTRACIÓN AÑADIDA DE SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	PARÁMETROS			INTERVALO DE CONFIANZA	
	X	s	t cal	LIC	LSC
1.00030	105.22665	2.81603	-4.54634	84.84188	125.61143
2.00060	101.38433	0.58975	-5.74973	100.49027	102.27837
3.00070	98.82637	1.50687	1.90780	91.54191	106.11082
t crítica (0.05, 5) = 2.22813					

5.6 ESTABILIDAD DE SULFAMETAZINA EN PLASMA.

Debido a la aplicación que se le daría al método fue necesario evaluar la estabilidad de la sulfametazina en plasma de cabra a temperatura de refrigeración (4°C). En la tabla XLVIII se presentan los resultados de los porcentajes de recuperación de la sulfametazina, obtenidos para muestras almacenadas en refrigeración a 4°C durante 15 y 30 días.

Tabla XLVIII. Resultados de porcentajes de recuperación de la estabilidad de sulfametazina en plasma.

CONCENTRACIÓN DE SULFAMETAZINA (µg/ml)	% DE RECUPERACIÓN DE SMZ		
	DÍAS DE ALMACENAMIENTO		
	0	15	30
4	102.96946	95.15412	101.79203
	100.47409	94.20884	104.65750
	95.26089	99.09913	100.96887
16	104.29035	102.00042	101.79822
	102.08594	100.38917	102.85077
	103.31504	100.45861	102.67736
40	100.51228	100.92630	103.97606
	101.14697	101.87759	106.55957
	100.68719	102.24185	103.89387

Se determinó la existencia de diferencias entre los porcentajes de recuperación obtenidos para cada concentración entre las muestras almacenadas a 4°C durante 15 y 30 días, se realizó un análisis de variancia estableciendo la siguiente hipótesis:

Hipótesis:

Factor día:

$$H_0: X_{\text{día cero}} = X_{\text{día 15}} = X_{\text{día 30}}$$

Hi: Al menos un par de medias es diferente.

Factor concentración:

$$H_0: X_{4\mu\text{g/ml}} = X_{16\mu\text{g/ml}} = X_{40\mu\text{g/ml}}$$

Hi: Al menos un par de medias es diferente

Criterio de aceptación.

Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítica}}$ no se rechaza H_0 .

Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítica}}$ se rechaza H_0 .

Tabla XLIX. Análisis de variancia para determinar la estabilidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F _{cal}	F _{crítica}
CONCENTRACIÓN	2	51.28862	25.64431	1.62154	3.55456
DÍA	6	94.88861	15.81477	4.56431	2.66130
ERROR	18	62.36771	3.46487		
TOTAL	26				

El análisis de variancia (tabla XLIX) nos muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de la tres concentraciones consideradas. Sin embargo, observamos que al menos un par de medias con respecto a los días de almacenamiento es diferente. Por consiguiente se realizó una comparación de medias con la finalidad de determinar qué par de medias presentaban dicha diferencia, los resultados de este análisis se muestran en la tabla L. Determinamos que las medias diferentes son, la del día cero y día 30 a una concentración de 40 µg/ml, en los demás niveles de concentración no existe diferencia entre días de almacenamiento, ni entre niveles de concentración. Por lo tanto dado que existe un valor extremo de 106.6 por ciento de recuperación se puede considerar que las muestras son estables en el intervalo de concentración y días de almacenamiento estudiados.

Tabla L. Prueba de t para comparación de medias.

CONCENTRACIÓN DE SMZ (µg/ml)	PRUEBA DE T PARA COMPARAR DOS MEDIAS (X)	
	Ho: $X_{\text{día cero}} = X_{\text{día 15}}$ Hi: $X_{\text{día cero}} \neq X_{\text{día 15}}$	Ho: $X_{\text{día cero}} = X_{\text{día 30}}$ Hi: $X_{\text{día cero}} \neq X_{\text{día 30}}$
4	t _{cal.} : 1.25506 t _{crítica} : 2.77646	t _{cal.} : -1.14757 t _{crítica} : 2.77646
16	t _{cal.} : 2.75947 t _{crítica} : 2.77646	t _{cal.} : 1.10075 t _{crítica} : 2.77646
40	t _{cal.} : -2.06628 t _{crítica} : 2.77646	t _{cal.} : -4.49808 t _{crítica} : 2.77646

5.7 ESTABILIDAD DE SULFAMETAZINA EN METANOL

Con el fin de evaluar cuánto tiempo es posible almacenar en refrigeración las muestras de sulfametazina en el solvente de elución (metanol) sin que el resultado analítico sea alterado, se analizaron extractos de metanol que contenían sulfametazina obtenidos a partir de la extracción en fase sólida. En las tablas LI, LII y LIII se presentan los resultados para los porcentajes de recuperación de la sulfametazina obtenidos de los extractos de metanol almacenados en refrigeración a 4°C durante 5, 15 y 30 días.

Tabla LI. Resultados para la estabilidad de sulfametazina en metanol almacenada durante 5 días.

CONCENTRACIÓN DE SULFAMETAZINA ($\mu\text{g/ml}$)	% DE RECUPERACIÓN	
	DÍAS DE ALMACENAMIENTO	
	0	5
4	102.93803	102.44283
	100.44342	99.31485
	95.23181	103.00190
16	104.25845	103.01638
	102.05471	101.00954
	103.28344	102.38714
40	107.18566	106.91029
	101.76123	101.68598
	100.00404	100.12554

Tabla LII. Resultados para la estabilidad de sulfametazina en metanol almacenada durante 15 días.

CONCENTRACIÓN DE SULFAMETAZINA ($\mu\text{g/ml}$)	% DE RECUPERACIÓN	
	DÍAS DE ALMACENAMIENTO	
	0	15
4	101.79203	96.88671
	104.65750	104.19547
	100.96887	106.02432
16	101.79822	97.64026
	102.85078	100.78004
	102.67736	99.41318
40	100.92630	94.16026
	101.87759	100.11435
	102.24186	102.23773

Tabla LIII. Resultados para la estabilidad de sulfametazina en metanol almacenada durante 30 días.

CONCENTRACIÓN DE SULFAMETAZINA ($\mu\text{g/ml}$)	% DE RECUPERACIÓN	
	DÍAS DE ALMACENAMIENTO	
	0	30
4	95.15412	99.82626
	94.20884	106.05983
	99.09913	102.87057
16	102.00042	104.38825
	100.38917	102.08632
	100.45861	102.01115
40	100.51229	100.81446
	101.14697	102.10606
	100.68719	100.93750

Para evaluar la estabilidad de sulfametazina en metanol se realizó un análisis de variancia para cada uno de los intervalos de 5, 15 y 30 días de almacenamiento. En las tablas LIV, LV y LVI se presentan los análisis de variancia de los resultados. Se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos para los extractos de metanol en los 5 y 15 días de almacenamiento. Sin embargo para los extractos de metanol almacenados durante 30 días existe diferencia significativa. Por ello, se determinó el intervalo de confianza de los extractos del día cero y 30 días de almacenamiento para cada concentración (ver tabla LVII), observándose que los intervalos de confianza para ambos días se traslapan por lo tanto es posible almacenar a la sulfametazina en metanol hasta 30 días sin la presencia de alguna alteración en el resultado

Tabla LIV. Análisis de variancia de los resultados estabilidad de 5 días almacenamiento en metanol

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F _{cal}	F _{critica}
CONCENTRACIÓN	2	20.38569	10.19285	3.82514	3.88529
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	3	7.99411	2.66470	0.33085	3.49030
ERROR	12	96.64927	8.05411		
TOTAL	17				

Tabla LV. Análisis de variancia de los resultados estabilidad de 15 días de almacenamiento en metanol

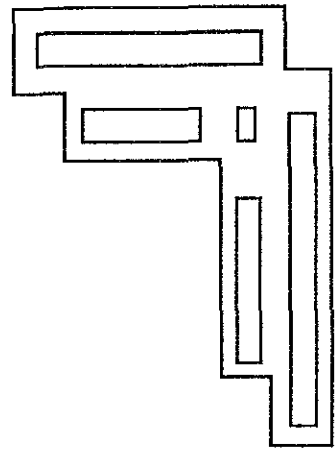
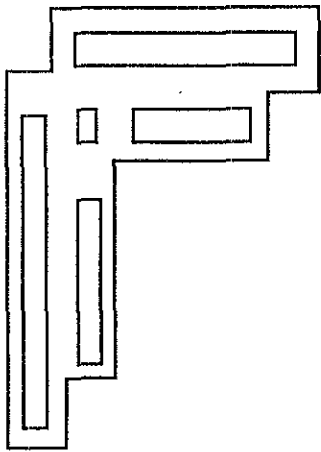
FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F _{cal}	F _{critica}
CONCENTRACIÓN	2	20.34128	10.1706	1 10428	3.88529
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	3	27.63056	9.21019	1.44334	3.49030
ERROR	12	76.57391	6.38116		
TOTAL	17				

Tabla LVI. Análisis de variancia de los resultados estabilidad de 30 días de almacenamiento en metanol

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	SC	CM	F _{cal}	F _{critica}
CONCENTRACIÓN	2	17.01621	8.50811	0.34343	3.88529
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	3	74 32279	24.7742	7.53939	3.49030
ERROR	12	39.43170	3.28598		
TOTAL	17				

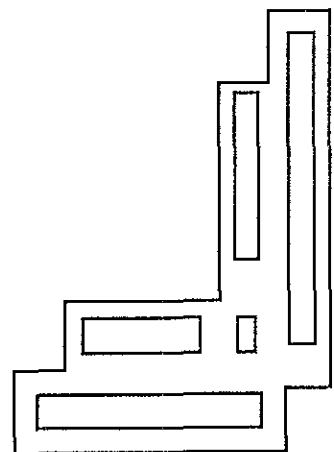
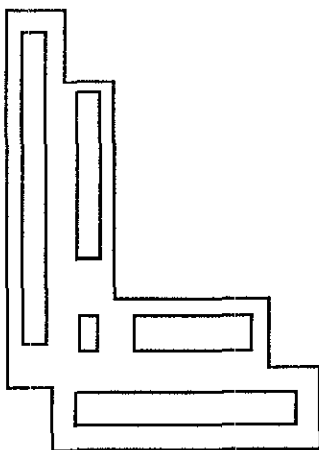
Tabla LVII. Intervalos de confianza de los % de recuperación del día cero y del día 30 de almacenamiento

CONCENTRACIÓN DE SMZ (µg/ml)	INTERVALOS DE CONFIANZA DEL DÍA CERO		INTERVALOS DE CONFIANZA DEL DÍA 30	
	ICI	ICS	ICI	ICS
4	67.20325	125.10481	61.11385	144.72393
16	97.37952	104 51928	94 97254	110 68460
40	100.31974	101.24455	99.09961	103.47240



CAPÍTULO IV.

CONCLUSIONES



1. CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para tratar las muestras de plasma con sulfametazina son:

- ⇒ El tiempo del tratamiento del plasma en 8 minutos.
- ⇒ Porcentajes recuperados de sulfametazina de 101.3 ± 2.12 .
- ⇒ El uso de cantidades pequeñas de plasma y solventes 1 y 2 ml respectivamente, más 0.5ml de sulfatiazol como estándar interno.

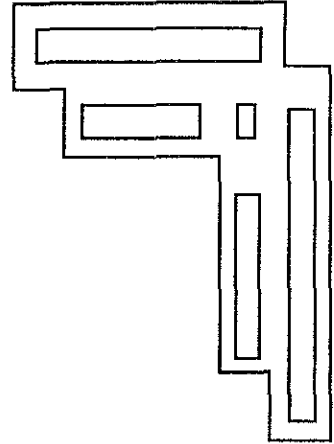
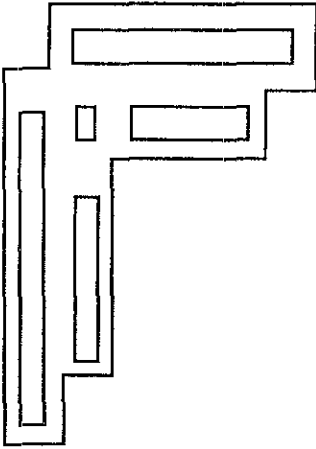
Las condiciones cromatográficas establecidas para el método analítico son:

- ⇒ Columna Octadecilsilano
- ⇒ Velocidad de flujo 1ml/min
- ⇒ Volumen de inyección: 20 μ l
- ⇒ Fase móvil: Acetonitrilo : Ácido acético 0.5% (15:85).

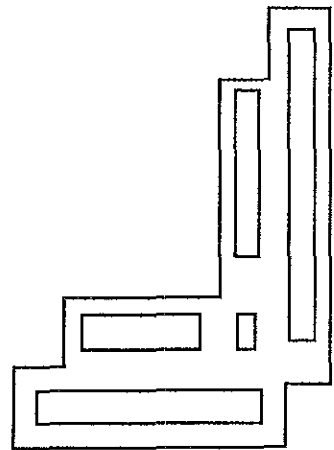
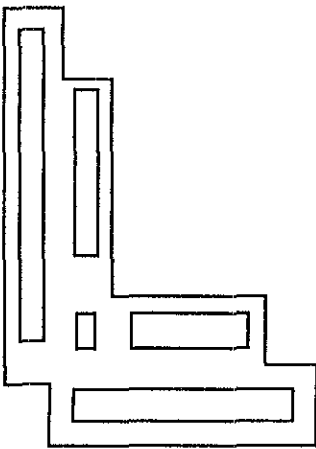
El método desarrollado es:

- ⇒ Capaz de cuantificar sulfametazina en plasma de cabra a partir de 2.0 μ g/ml con coeficientes de variación de 0.5 al 3%.
- ⇒ Específico para sulfametazina capaz de discriminar los productos de biodegradación y sustancias endógenas contenidas en el plasma de cabra.
- ⇒ Reproducible y lineal en el intervalo de concentraciones de sulfametazina de 4 a 40 μ g/ml.
- ⇒ Exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de sulfametazina de 4 a 40 μ g/ml.
- ⇒ Por su estabilidad, las muestras de sulfametazina en plasma y metanol se pueden almacenar hasta por 30 días en el caso de que no se pudieran procesar inmediatamente.

El método es confiable para medir niveles de sulfametazina en cabras bajo tratamiento. Por lo que se recomienda el empleo del método analítico en los estudios de farmacocinética y biodisponibilidad.



ANEXOS.



ANEXO 1.ABREVIATURAS

AcN.....	Acetonitrilo
HCl.....	Ácido Clorhídrico
TCA.....	Ácido Tricloroacético.
r.....	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
C.V.....	Coefficiente de variación.
Pka.....	Constante de disociación
CLAR.....	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
s.....	Desviación estándar.
Id.....	Diámetro interno
EFS.....	Extracción en Fase Sólida
ELL.....	Extracción Líquido - Líquido
GL.....	Grados de libertad
NaOH.....	Hidróxido de sodio.
H ₁	Hipótesis alterna.
H ₀	Hipótesis nula.
LCL.....	Límite de confianza inferior al 95%.
LCS.....	Límite de confianza superior al 95%.
PH.....	-Log de la concentración de los protones.
MeOH.....	Metanol.
μl.....	Micrólitros
ml.....	Mililitros
μm.....	Micrómetros
nm.....	Nanómetros
N ₂	Nitrógeno
α.....	Nivel de significancia
C ₁₈ y ODS.....	Octadecilsilano
Pp de proteínas	Precipitación de proteínas
X.....	Promedio aritmetico
Rpm.....	Revoluciones por minuto.
SMZ.....	Sulfametazina.
STA.....	Sulfatiazol.
Σ.....	Sumatoria.
t _{1/2}	Tiempo de vida media.
AU.....	Unidades de absorbancia

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.Preparación de solución stock de 200 µg/ml de sulfametazina (solución A).

- Pesar 1 g de sulfametazina base en un vaso precipitado de 15 ml y adicionar 0.5 ml de NaOH 1.5 N.
- Vaciar lo anterior a un matraz volumétrico de 50 ml. Llevar al volumen de aforo con agua.
- Tomar 1 ml de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml. Llevar al volumen de aforo.

Preparación de solución stock de 50 µg/ml de sulfametazina (solución B)

- Pesar 250 g de sulfametazina base en un vaso de precipitado de 15 ml y adicionar 0.5 ml de NaOH 1.5 N.
- Vaciar lo anterior a un matraz volumétrico de 50 ml. Llevar al volumen con agua.
- Tomar 1 ml de la solución anterior, llevarlo a un matraz volumétrico de 100ml. Llevar al volumen con agua.

Preparación de solución de Sulfatiazol (estándar interno) 500µg/ml.

- Pesar 50 mg de sulfatiazol en un vaso de precipitado de 15 ml, disolver con 1 ml de NaOH 1.5 N.
- Adicionar la solución anterior en un matraz volumétrico de 100 ml. Llevar al volumen con agua.
- De cada una de las soluciones preparadas se toman diferentes alícuotas con sus correspondientes diluciones para obtener diferentes concentraciones de sulfametazina.
- En la tabla LVIII se presentan las diferentes diluciones realizadas, así como las concentraciones finales de sulfametazina obtenidas.

Tabla LVIII. Se presentan las diferentes diluciones realizadas a partir de soluciones stock para obtener diferentes soluciones estándares de sulfametazina.

Solución stock a utilizar.	Alicuota a tomar de la solución stock (ml)	Alicuota a tomar de la solución stock de 500 µg/ml de sulfatiazol (ml)	Volumen final a llevar (ml)	Concentración final de sulfametazina (µg/ml)
B	0.5	2.0	100	0.25
B	1.0	2.0	100	0.50
B	2.0	2.0	100	1.00
A	0.5	1.0	50	2.00
A	1.0	1.0	50	4.00
A	2.0	1.0	50	8.00
A	3.0	1.0	50	12.00
A	4.0	1.0	50	16.00
A	5.0	1.0	50	20.00
A	10.0	1.0	50	40.00

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PLASMA FORTIFICADO:

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Preparación de solución stock de 4000 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina.

- Pesar 400 mg de sulfametazina en un vaso de precipitado de 15 ml, disolver con 0.5 ml de NaOH 1.5 N.
- Vaciar lo anterior a un matraz volumétrico de 100 ml . Llevar al volumen con agua.

A partir de la solución stock de sulfametazina preparada se realizaron varias diluciones en agua y se obtuvieron diferentes concentraciones de soluciones estándares de sulfametazina. En la tabla LIX se muestran la diluciones realizadas con las respectivas concentraciones finales obtenidas de sulfametazina.

Tabla LIX. Diluciones de la solución stock para obtener diferentes soluciones estándar de sulfametazina.

Alicuota a tomar de la solución stock de SMZ de 4000 $\mu\text{g/ml}$	Volumen final (ml)	Concentración final de SMZ en agua ($\mu\text{g/ml}$)
0.5	50	40
1.0	50	80
2.0	50	160
3.0	50	240
5.0	50	400

PREPARACIÓN DE PLASMA FORTIFICADO CON SULFAMETAZINA.

De las soluciones estándar preparadas de sulfametazina se toma una alícuota 1 ml de cada y diluye a 10 ml con plasma limpio. La concentración final de sulfametazina en plasma es: 4.0, 8.0, 16.0, 24.0 y 40.0 $\mu\text{g/ml}$

ANEXO 3. PROGRAMACIÓN DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD PARA MUESTRAS DE SULFAMETAZINA.

PREPARACION DE PLASMA FORTIFICADO CON SULFAMETAZINA PARA SER SOMETIDO AL ESTUDIO DE ESTABILIDAD.

- Preparar 10 ml de plasma fortificado con sulfametazina a las concentraciones de 4, 16 y 20 µg/ml (preparación de plasma fortificado -Pag. 100 -)
- Para cada concentración de plasma fortificado dividir en 9 frascos viales de capacidad de 5 ml.
- Etiquetar los viales con el siguiente código:
 - Primer número = Concentración.
 - Segundo número = Número de repetición.
- Almacenar a temperatura de refrigeración.
- Analizar las muestras el día que les correspondía. En la tabla LX se muestra la programación realizada para el análisis de las muestras de plasma para ser sometidas al estudio de estabilidad.

Tabla LX. Programación del análisis de plasma fortificado con sulfametazina para el estudio de estabilidad.

Concentración de SMZ en el plasma de cabra.	Días de almacenamiento en refrigeración								
	0			15			30		
4	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	4-6	4-7	4-8	4-9
16	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5	16-6	16-7	16-8	16-9
40	40-1	40-2	40-3	40-4	40-5	40-6	40-7	40-8	40-9

PREPARACION DE EXTRACTO DE METANOL CON SULFAMETAZINA PARA SER SOMETIDO AL ESTUDIO DE ESTABILIDAD.

- Preparar 10 ml de plasma fortificado con sulfametazina a las concentraciones de 4, 16 y 20 µg/ml (anexo de preparación de plasma fortificado -Pag. 100 -).
- De cada concentración preparada tomar 9 alícuotas de 1 ml y analizarlas de acuerdo al ensayo analítico (pagina 62). Éste análisis corresponderá al día cero.
- Etiquetar con el siguiente código los extractos de metanol analizados:
 - Primer número = Concentración.
 - Segundo número = Número de repetición.
- Almacenarlos a una temperatura de refrigeración. Analizarlos nuevamente el día que les corresponda de acuerdo a la tabla LXI.

Tabla LXI. Programación del análisis de extractos de metanol con sulfametazina para el estudio de estabilidad.

Concentración de SMZ en el extracto de metanol.	Días de almacenamiento en refrigeración								
	5			15			30		
4	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	4-6	4-7	4-8	4-9
16	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5	16-6	16-7	16-8	16-9
40	40-1	40-2	40-3	40-4	40-5	40-6	40-7	40-8	40-9

ANEXO 4. FÓRMULAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

LINEALIDAD:

Tabular los resultados en base al siguiente formato:

Concentración Adicionada (x)	Concentración recuperada (y)
X1	Y11 , Y12,....., Y1n
X2	Y21 , Y22,....., Y2n
.	.
.	.
Xt	Yt1 , Yt2 ,....., Ytn

t = número de diluciones

n = número de replicas (propiedad medida) de cada dilución de la solución stock.

Calcular el valor de la pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum xy - (\sum x)^2}$$

Calcular el valor de la ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Calcular el coeficiente de determinación y correlación (r) por medio de las siguientes ecuaciones:

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x)^2 - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

$$r = \sqrt{r^2}$$

Determinar los intervalos de confianza y la prueba de t para la pendiente y la ordenada al origen se usan las siguientes fórmulas que se encuentran en la siguiente tabla:

	Prueba de t	Intervalos de confianza
Intercepto	$t = \frac{ b-B }{S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\sum \bar{Y}^2}{\sum X^2 - (\sum X)^2}}}$	$b = B \pm t_{(\alpha/2, n-2)} S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\sum \bar{Y}^2}{\sum X^2 - (\sum X)^2}}$
Pendiente	$t = \frac{ m-M }{S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - (\sum X)^2}}}$	$m = M \pm t_{(\alpha/2, n-2)} \frac{S_{y \cdot x}}{\sqrt{\sum X^2 - (\sum X)^2}}$

B y M = valor obtenido de la regresión
b y m = valor de cero.

Donde $S_{y \cdot x}$ se calcula de la siguiente manera:

$$S_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} (S_y^2 - b^2 S_x^2)}$$

PRESICIÓN

Tabular los resultados de los porcentajes de recuperación:

Calcular la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación con las siguientes ecuaciones:

Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación
$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$	$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}$	$C.V. = \frac{\bar{X}}{s} * 100$

EXACTITUD

Tabular los resultados de los porcentajes de recuperación

Calcular su media aritmética y su desviación estándar como se muestra en la precisión.
Calcular el valor de t y el intervalo de confianza para los datos con las siguientes ecuaciones

t cal	Intervalo de confianza
$t \text{ cal} = \frac{\bar{X} - 100}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$	$\bar{X} \pm t (\alpha/2, n-2)^s$

REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD.

Tabular los porcentajes de recuperación bajo el siguiente formato:

Día	Analista	
1	Y111	Y211
	Y112	Y212
	Y113	Y213
2	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

Determinar la suma de cuadrados:

Suma de cuadrados del analista (SC_A).	$\frac{\sum [Y_i]^2}{br} - \frac{Y^2}{abr}$
Suma de cuadrado de los días (SC_D).	$\frac{\sum [Y_{ij}]^2}{r} - \frac{[Y]^2}{br}$
suma de cuadrados del error (SC_B).	$[Y_{ijk}]^2 - \frac{[Y_{ij}]}{r}$

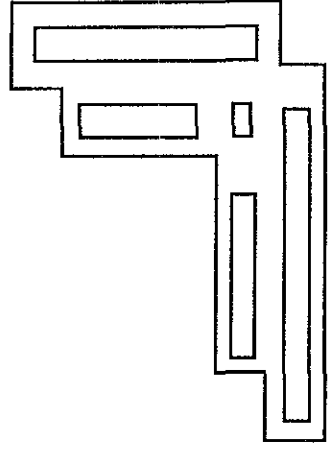
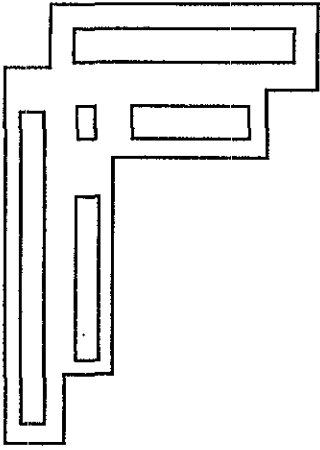
a = Total de analistas.

b = total de días.

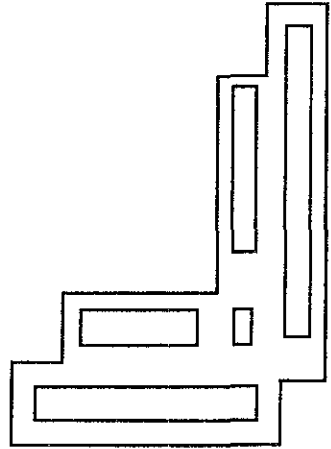
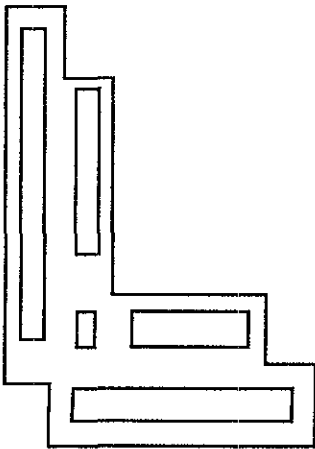
r = Número de repeticiones

Tabla de ANADEVIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Analista	$GL_A = a - 1$	SC_A	$CM_A = SC_A / GL_A$	CM_A / CM_D	-----
Día	$GL_D = (b - 1) a$	SC_D	$CM_D = SC_D / GL_D$	CM_D / CM_E	-----
Error	$GL_E = (r - 1) ab$	SC_E	$CM_E = SC_E / GL_E$		



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Anderson L. Robert. Practical statistics for Analytical Chemists
Van. Nostrand Reinhold, New York.
- Bevill F. Richard Schemske M. Kathleen
1978 Determination of sulfonamides in swine plasma. J. Agric. Food Chem. Vol. 26, n. 5 1200-1203.
- Blanchard James
1981 Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis; Journal of Chromatography, Biomedical Applications; 226; 455-460
- Boison O. Joe and keng J.Y.Lily
1994 Determination of sulfamethazine in bovine and porcine tissues by reversed-phase liquid chromatography., J. of The A.O.A.C. International, Vol.77. n.3. 558-564.
- Boison O. Joe and keng J.Y.Lily
1995 Determination of sulfadimethoxine and Sulfamethazina residues in animal Tissues by Liquid Chromatography and Thermospray Mass Spectrometry. J. of The A.O.A.C. International., Vol. 78, 3, 987-993.
- Booth, Nicolas, Leslie E. Mc. Donald
1988 Veterinary Pharmacology and Therapeutics;6th. Edition; Edit. Iowa State University Press/Ames. E.E.U.U.
- Brander G.C. and Pugh D.M.
1971 Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics; Seond Edition; Edit Bailliere Tindall-Londo, E.E:U.U.369.
- Carignan Germain and Carrier Karen
1991 Carignan Germain and Carrier Karen Quantitation and confirmation of sulfamethazina residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS., J. of The A.O.A.C. International vol.74. n.3 474-487
- Cox Byron et al.
1982 High Pressure Liquid Chromatographic determinaton of Sulfametazine in pork Tissue; J. of The A.O.A.C; Vol. 65. No.6, 1311-1315.
- Crosby, Neil; Day John A. et al.
1995 Quality in the Analytical Chemistry Laboratory. Edit. ACOL. Pag. 80.
- Cuellar O.A.
1986 Parasitosis del Aparato digestivo. Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. Pijoán. p. Tórtora, J. México. pp 103-118.

- Florey, Klaus
1978 Analytical Profiles of Drug Substances; Vol. 7 Edit. Academic Press; New York, United States of America. Pp. 403-419.
- French, M. H
1985 Observaciones sobre las cabras; FAO: Estudios Agropecuarios, 2da. Edición, No. 80; Roma, Italia
- Gennaro B. Alfonso et al.
Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th De. Mack Publishing Company Easton, Pennsylvania, pp 1173-1174.
- Goehl Thomas, Mathur K. Lalit, et al.
1978 Simple high pressure liquid chromatographic determination of trisulfapyrimidines in human serum Journal of pharmaceutical Sciences, Vol. 67. N. 3, March, pp 404-406.
- Horil, Shozo, Momma Chie et al
1990 Liquid Chromatographic Determination of Three Sulfonamides in Animal Tissue and Egg. J. of The A.O.A.C. International; Vol. 73. n 6, 990-992.
- Hubert, Ph et al.
1993 Fully automated determination of sulfamethazine in ovine plasma using solid phase extraction on disposable cartridges and liquid chromatography. Journal of chromatography Biomedical Applications 622, 53-60
- Johnson, L. Karl, Jeter T. Delbert
And Claiborne C. Robert.
1975 High pressure liquid chromatographic determination of sulfamethazine residue in bovine tissue., Journal of Pharmaceutical Science., Vol 64, No.10, 1657-1660.
- Katzung, Beltram G.
1984 Farmacología Básica y Clínica; Editorial El manual Moderno, México p 539
- Lang, J.R; and Bolton S.
1991 A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry- 1 Experimental considerations, Vol. 9 No.5 pp 357-361.
- Larocque Lyse, Carignan Germain
and Sved Stephen
1990 1. Sulfamethazine (sulfadimidine) residues in Canadian consumer milk. J. of The A.O.A.C. International., Vol. 73 No.3 365-367
- Long R. Austin, Hsieh C. Lily et al
1990 Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue., J Agric. Food Chem. Vol. 38. n.2 423-426.

- McDonald, D. Patrick, Bouvier, P. S. Edouard
1995 Solid Phase Extraction Applications Guide and Bibliography . A Resource for Sample Preparation Methods Development ISBN 1-879732-06-8. Sixth Edition. Waters; Milford , Massachusetts, 43,51.
- McDowall R. D.
1989 Review Sample Preparation for biomedical analysis. Journal of Chromatography, Biomedical Applications, 462, p 3-58.
- McGary D. Eddie.
1986 Quantitative determination of sulphamethazine and carbadox in animal feeds by paired ion high performance liquid chromatography, Analyst. november, Vol 3, 1341-1342.
- Nouws J. Et al.
1985 Dose dependent disposition of sulphadimidine and of its N4-acetyl and hydroxy metabolites in plasma and milk of dairy cows; Vol 7, No.3, July. 177-186.
- Parasramduria Jagdish and Gupta Das V
1986 Quantitation of sulfacetamide, sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in various combinations using High performance liquid chromatography., Drug Developmet and Industrial Pharmacy, 12 (14) 2511-2519.
- Parks. W. Owen
1982 Screening test for sulfamethazine and sulfathiazole in swine liver. J. of The A.O.A.C. International; Vol. 65. n.3, 632-634
- Quattrocchi Oscar, Abeaira S et al.
1992 Introducción a la HPLC Aplicación y práctica. Edit Farro; Buenos Aires Argentina p 203-217.
- Quiroz, R H
1984 Quiroz, R H Parasitología y Enfermedades Parasitarias de animales Domésticos. Limusa, México. 130, 135.
- Riley C. et al.
1994. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatography; First Edition, Edit Pergamon; Great Britain. P139.
- Seymour David et al
1980 High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Sulfamethazine Residues in beef Tissues; Journal of Pharmaceutical Sciences; Vol. 69, No. 6 June p 701-703
- Sharma J.Perkins,E. Bevill R.
1976 High-pressure Liquid Chromatographic Separation, Identification, and Determination of Sulfa Drug and Their Metabolites in Urine, Journal of Pharmaceutical Science; Vol. 65, No. 11, 1606-1608.

- Shetty S.N. and Asuzu I.U.
1989
Distribution and excretion of Sulphacetamide, Sulphadimidine and sulphanilamide in west African dwars goats; Indian Vet. Journal; October; 928-932.
- Smedley D. Michael.
1994
Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk: Collaborative study. J. of The A.O.A.C. International., Vol 77 n.5 1112-1122.
- Smedley D. Michael.
1990
Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk: J. of The A.O.A.C. International., Vol. 73 No.6, 875-879.
- Tsai En-Chin and Kondo Fusao
1995
Liquid chromatographic determination of fluorescent derivates of six sulfonamides in bovine serum and milk, J. of The A.O.A.C. International, Vol. 78, N 3 674-678.
- Van'Tklooster G et al
1991: 157-168
Hig-performance liquid chromatographic method for the routine determination of sulphadimidine, its hydroxy metabolites and N4-acetylsulphadimidine in body fluids and cell culture media; Journal of chromatography Biomedical Applications; 557; 157-168.
- Weber D. John and Smedley D.
Michael.
1993
Liquid chromatographic method for determination of sulfamethazine residues in milk: Collaborative Study. J. of The A.O.A.C. International, Vol. 76, N.4, 725-729.
- Weber D. John and Smedley D.
Michael.
1989
Liquid chromatographic method for determination of sulfamethazine in milk J. of The A.O.A.C, Vol. 72, No.3, 445-446.
- Witkamp, R:F., Van 'Tklooster, et al
1993
Hormonal regulation of oxidative drug metabolism in the dwarf goat. The effect of sex and hormonal treatment on plasma disposition and metabolite formation of sulphadimidine, Journal Vet. Pharmacol Therap 16, 55-62,
- Yost r. et al
1980
Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica, 1era. Edición, Perkin -Elmer, E.E.U.U. p
- Zomer Eliezer, Savi Steve and
Charm E. Stanley.
1992
HPLC receptorgram: A method for confirmation and identification of antimicrobial drugs by using liquid chromatography with microbial receptor assay. I sulfonamides in milk. J. of The A.O.A.C. International., Vol 75, n.6, 987-998.