

26/1/2010
NO PDX

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**" DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE CLONIXIN EN FLUIDOS BIOLOGICOS
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
A ALTA PRESION "**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA. CONTROL DE MEDICAMENTOS)**

**PRESENTA LA QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO:
MA. CARMELINA PEREZ MUÑOZ**

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE: DOCTOR ARMANDO MANJARREZ
1er. VOCAL: DOCTOR CARLOS RAMON GARCIA
SECRETARIO: DOCTOR RAFAEL CASTILLO B.
SUPLENTE: QUIMICO SANTIAGO CAPELLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

SYNTEX, S. A. DIVISION FARMACEUTICA
MEXICO, D. F.

SUSTENTANTE: MARIA CARMELINA PEREZ MUÑOZ

DIRECTOR DEL TEMA: Q.F.B RAMON ULACIA ESTEVE

ASESOR DEL TEMA: DOCTOR CARLOS RAMON GARCIA

CARIÑOSAMENTE A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI ESPOSO JEAN PIERRE
POR SU COMPRESION Y CARIÑO

CON APRECIO
A MIS AMIGOS QUE ME HAN ESTIMULADO

A MI MAESTRO Q.F.B. RAMON ULACIA ESTEVE
POR SU APOYO CONSTANTE Y POR QUE CON SU
EJEMPLO ME IMPULSO A SUPERARME.

CON GRATITUD:

AL Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA
POR SU VALIOSA AYUDA

AL DR. CARLOS RAMON GARCIA
POR SU AYUDA Y DEDICACION

CON AGRADECIMIENTO A:
LABORATORIOS SYNTEX, S.A.
DIVISION FARMACEUTICA.

Indice	No. Página
Capítulo I. PRESENTACION Y OBJETIVO	1
Capítulo II. GENERALIDADES	
2.1 Introducción	3
2.1 Monografía de clonixín	9
2.3 Cromatografía de líquidos a alta presión	13
Capítulo III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Determinación de clonixín en plasma	24
3.1.1 Instrumentos	
3.1.2 Reactivos	
3.1.3 Método	
3.1.4 Linealidad	
3.1.5 Reproducibilidad y recobro	
3.1.6 Especificidad	
3.2 Determinación de clonixín en orina	30
3.2.1 Instrumentos	
3.2.2 Reactivos	
3.2.3 Método	
3.2.4 Linealidad	
3.2.5 Reproducibilidad y recobro	
3.2.6 Especificidad	
3.3 Valoración estadística	33
Capítulo IV. RESULTADOS	
4.1 Clonixín en plasma	35
4.1.1 Linealidad	
4.1.2 Reproducibilidad y recobro. Análisis estadístico	
4.1.3 Especificidad	
4.2 Clonixín en orina	48
4.2.1 Linealidad	
4.2.2 Reproducibilidad y recobro. Análisis estadístico	52
4.2.3 Especificidad	

Capítulo V.	DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	62
5.1	Discusión de resultados	64
5.1.1	Clonixín en plasma	
5.1.1.1	Linealidad del método en plasma	
5.1.1.2	Reproducibilidad y recobro del método en plasma	
5.1.1.3	Especificidad del método en plasma	
5.1.2	Clonixín en orina	67
5.1.2.1	Linealidad del método en orina	
5.1.2.2	Reproducibilidad y recobro del método en orina	
5.1.2.3	Especificidad del método en orina	
5.2	Conclusiones	70
Capítulo VI.	BIBLIOGRAFIA	72

Figura No. 1	Estructura química de clonixín y sus metabolitos	5
Figura No. 2	Esquema interno de un cromatógrafo de líquidos	17
Figura No. 3	Cromatograma de clonixín en plasma	36
Figura No. 4	Linealidad del método en plasma	37
Figura No. 5	Linealidad del método en plasma/area de los picos	39
Figura No. 6	Cromatograma de 4'-OH clonixín en plasma	44
Figura No. 7	Cromatograma de 5-OH clonixín en plasma	45
Figura No. 8	Cromatograma de 2'-hidroximetil clonixín en plasma	46
Figura No. 9	Cromatograma de clonixín y sus tres metabolitos en plasma	47
Figura No. 10	Cromatograma de clonixín en orina	49
Figura No. 11	Linealidad del método en orina	50
Figura No. 12	Linealidad del método en orina/area de los picos	53
Figura No. 13	Cromatograma de 4'-OH clonixín en orina	58
Figura No. 14	Cromatograma de 5-OH clonixín en orina	59
Figura No. 15	Cromatograma de 2'-hidroximetil clonixín en orina	60
Figura No. 16	Cromatograma de clonixín y sus tres metabolitos en orina	61

Tabla No. I	Linealidad del método en plasma	35
Tabla No. II	Linealidad del método en plasma/area de los picos	38
Tabla No. III	Recobros de clonixín en plasma	41
Tabla No. IV	Análisis estadístico del método en plasma	42
Tabla No. V	Linealidad del método en orina	48
Tabla No. VI	Linealidad del método en orina/area de los picos	51
Tabla No. VII	Recobros de clonixín en orina	54
Tabla No. VIII	Análisis estadístico del método en orina	55

Capítulo I. PRESENTACION Y OBJETIVO,

Con objeto de efectuar las pruebas de disponibilidad biológica en el desarrollo y evaluación de medicamentos, es necesario disponer de métodos analíticos específicos, precisos y rápidos, que permitan la valoración del fármaco en plasma, orina y otros fluidos humanos.

En la actualidad no existe ningún método "a-priori" completamente satisfactorio para precedir la biodisponibilidad del principio activo en el hombre a partir de determinaciones IN VITRO o de estudios en animales. La biodisponibilidad de un fármaco a partir de una forma medicamentosa es una medida relativa; se determina midiendo la rapidez y la magnitud de la absorción del medicamento en la sangre (plasma) o de su excreción en orina, comparadas con los de un producto de referencia del mismo fármaco.

Sin embargo, cuando el producto de referencia es una solución intravenosa, la biodisponibilidad determinada indica la medida " absoluta" del fármaco que llega a la circulación general a partir del producto en estudio. Los niveles sanguíneos deben estudiarse mediante métodos analíticos precisos y específicos para el fármaco en cuestión. Para el caso concreto de la determinación cuantitativa de clonixín, ácido 2-(3-cloro-o-toluidín) nicotínico¹ en plasma y en orina existe un método publicado en

1. Previamente descrito como Sch 10304 (Watnick et al, 1968) y CBA 93626 (Finch y Dekornfeld, 1968).

la literatura para su valoración en fluidos biológicos basado en la extracción del ácido libre mediante disolvente orgánico y posterior extracción de la sal de sodio mediante la alcalinización respectiva. La determinación cuantitativa se realiza mediante espectrofotometría ultravioleta⁷.

Los resultados obtenidos al emplear este método carecen de la especificidad y precisión requerida para esta determinación.

OBJETIVO. De acuerdo a los resultados obtenidos al emplear el único método publicado en la literatura, se hizo necesario el considerar el desarrollo de un método más rápido, preciso y reproducible, para la determinación de clonixín (ácido 2-(3-cloro-o-toluidín) nicotínico). El objetivo de este trabajo consiste en presentar la experimentación realizada, resultados y conclusiones logradas en el desarrollo de un método analítico basado en la cromatografía de líquidos a alta presión.

2.1 Introducción.

De acuerdo a los resultados de las pruebas farmacológicas efectuadas en animales de laboratorio³, el clonixín, ácido 2-(3-cloro-o-toluidín) nicotínico, que es un nuevo compuesto antiinflamatorio no esteroide, muestra propiedades satisfactorias en su actividad como analgésico¹, antiinflamatorio² y antipirético.

Ha sido estudiada su actividad analgésica en monos y en humanos^{4,5}, así como su metabolismo en ratas, perros, monos y humanos^{6,7}.

El metabolismo de los ácidos anilino-nicotínicos en humanos era desconocido hasta 1972, cuando se publicó el primer estudio con ácido niflúmico⁸, siguiéndole en 1973 el estudio del metabolismo de clonixín⁷.

Las propiedades analgésicas de clonixín se han puesto de manifiesto en una serie de estudios^{1-3,9} observándose que su actividad analgésica es equivalente a 120 mg de codeína, sin presentar efectos secundarios significativos⁹.

En cuanto a sus propiedades antiinflamatorias se ha encontrado que en la prueba de la carragenina, la actividad antiinflamatoria de este fármaco era mayor que la de la aspirina, igual que la de la fenilbutazona, pero menor que

la del ácido flufenámico e indometacina^{10,11}.

En la prueba del eritema con rayos UV, el clonixín es más activo que la fenilbutazona, el ácido flufenámico y la indometacina¹¹.

La secuencia de actividad como analgésico para estos fármacos es la siguiente:

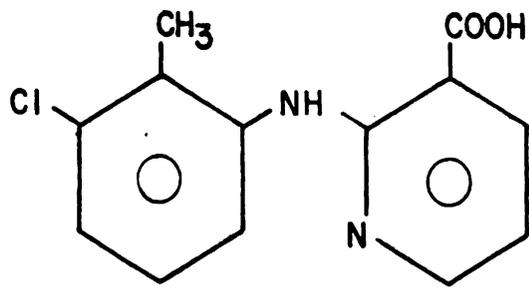
Indometacina > clonixín - fenilbutazona > aspirina. El ácido flufenámico mostró una actividad nula o escasa¹¹.

En cuanto a su toxicidad¹⁰ y tolerancia¹¹, se han obtenido buenos resultados en comparación con otros antiinflamatorios no esteroideos^{5,12}. En comparación con la indometacina y el ácido flufenámico, el clonixín exhibe una mejor relación como ulcerogénico-antiinflamatorio.

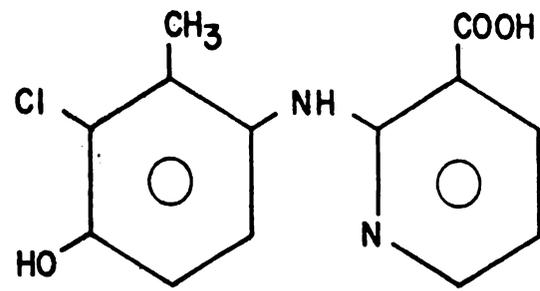
El clonixín es bien absorbido por ratas, monos y perros, siendo rápidamente metabolizado por las tres especies en los siguientes derivados: 4'-hidroxi, 5-hidroxi y 2'-hidroximetil⁶; en la figura No. 1 se muestran sus estructuras.

El clonixín es rápidamente absorbido y excretado en humanos⁷.

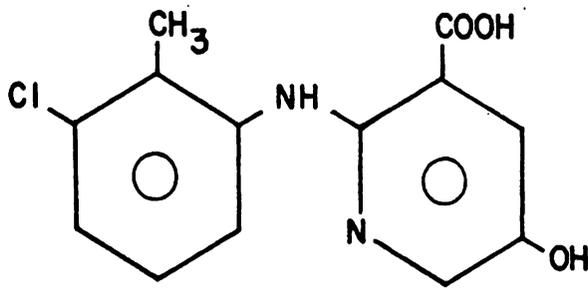
Después de una dosis oral de 500 mg, los niveles máximos en plasma se observan en una hora: el 62% de la dosis es excretado en la orina y menos del 1% en las heces⁷.



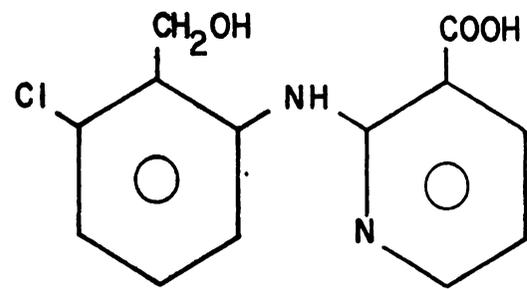
CLONIXIN



4' - OH - CLONIXIN



5 - OH - CLONIXIN



2' - CH₂OH CLONIXIN

ESTRUCTURAS QUIMICAS DE CLONIXIN Y SUS METABOLITOS.

FIGURA No. 1

En 120 hrs. el 86% es excretado en la orina y heces. Las especies químicas detectadas en plasma, a las 6 hrs. después de la administración oral de 500 mg de clonixín son: fármaco inalterado y sus tres principales metabolitos, 4'-OH, 5-OH y 2'-CH₂OH; el clonixín es el compuesto encontrado en mayor proporción⁷.

Según Katchen, Buxbaum y Ning⁷, los niveles de clonixín en plasma humano se describen mediante un modelo abierto de un compartimiento², con parámetros: $K_a = 1.35 \text{ h}^{-1}$, $K_e = 0.48 \text{ h}^{-1}$ y $V_d = 0.122 \text{ l/Kg}$, donde K_a es la constante de velocidad de absorción, K_e es la constante de velocidad de eliminación y V_d es el volumen de distribución; además, los mismos autores indican que los niveles plasmáticos no son medibles después de transcurridas 16 hrs. de la administración del fármaco.

El procedimiento ideal para el ensayo cuantitativo de fármacos con acción analgésica y antiinflamatoria (no esterooidales) será aquel que provea una cuantificación confiable, reproducible, rápida y económica de los fármacos con esta acción farmacológica.

La frecuencia con que son publicados nuevos métodos para ensayos en flúidos biológicos indican el alto grado de interés en lograr esta meta, misma que aún no se ha alcanzado.

2. Un compartimiento es un espacio fisiológico real o virtual que presenta un comportamiento cinético.

El análisis por cromatografía gas-líquido de fármacos en fluidos biológicos requiere de una muestra inicial relativamente grande, generalmente 1 ml, lo que implica un período significativo de tiempo en la extracción y preparación de la muestra inicial.

Además no se ha descrito un solo juego de condiciones analíticas que sea aplicable a más de uno de los anti-inflamatorios comunes.

Por otro lado en la literatura estudiada^{8,13-16} solo se encontró un informe del uso de la cromatografía de líquidos a alta presión para el análisis de estos fármacos. En dicho estudio que trata de la valoración de indometacina, se incluye el ácido flufenámico como referencia interna¹³.

El método anteriormente utilizado^{6,7} para cuantificar clonixín en 1 ml de plasma, incluye la adición de 4 ml de una solución reguladora de citratos a pH 4.0, subsiguiente extracción con 8 ml de éter etílico, centrifugación, tratamiento de la fase etérea (6 ml) con 1 ml de solución al 2% de carbonato de sodio, nueva extracción y centrifugación, eliminación de la capa etérea y finalmente la determinación de la concentración del clonixín extraído en la fase alcalina por medio de su absorción en el ultravioleta.

La separación y cuantificación de los metabolitos (derivados 4'-hidroxi, 5-hidroxi y 2'-hidroximetil) fue realizada previa hidrólisis de los glucurónidos y sulfatos

de clonixín y sus metabolitos, por cromatografía en placa fina⁷. La hidrólisis se efectuó incubando la orina y el plasma respectivamente con la enzima glucosidasa y una solución reguladora de acetato a pH 5, a 37°C durante 16 hrs, no observándose degradación de los productos.

La mezcla de incubación de los fluidos fué posteriormente extraída con éter, recuperándose los metabolitos con metanol. Su posterior separación se logró mediante cromatografía en placa fina en dos sistemas sucesivos diferentes.

Mediante este método se informa una recuperación de 95[±] 5% de clonixín y un coeficiente de variación de 5%,⁶.

Todas las manipulaciones anteriores consumen bastante tiempo y el proceso viene a ser laborioso para pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

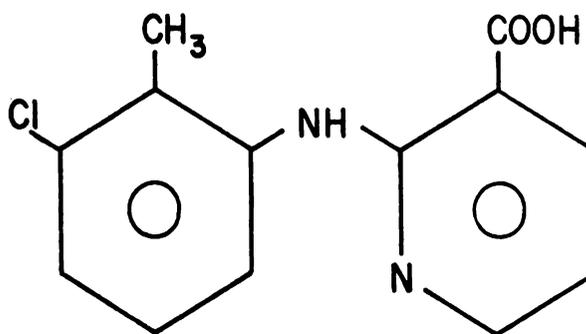
2.2 Monografía del clonixín¹⁸.

Nombre químico: Acido 2-(3-cloro-o-toluidín) nicotínico,
ácido 2-(3-cloro-o-toluidino) nicotínico,
ácido 2-(2'metil-3'-cloro anilino)-3-ni-
cotínico.

Nombre común: Clonixín

Otras denominaciones: CBA 93626, SCH 10304.

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada: $C_{13}H_{11}N_2O_2Cl$

Peso molecular : 262.7

Descripción : Polvo blanco o ligeramente amarillento,
inodoro, sabor característico extrema-
damente amargo.

Solubilidad : Muy soluble en alcohol, soluble en
soluciones ácidas o alcalinas modera-
das, soluble en éter y en cloroformo,

poco soluble en benceno, muy poco soluble en agua, soluble en acetonitrilo¹⁸,

Obtención : Los ácidos 2-anilínicos son preparados por calentamiento del ácido 2-cloro-nicotínico con 2-metil-3-cloroanilina a 120-130°C¹⁷.

Reacciones de identificación:

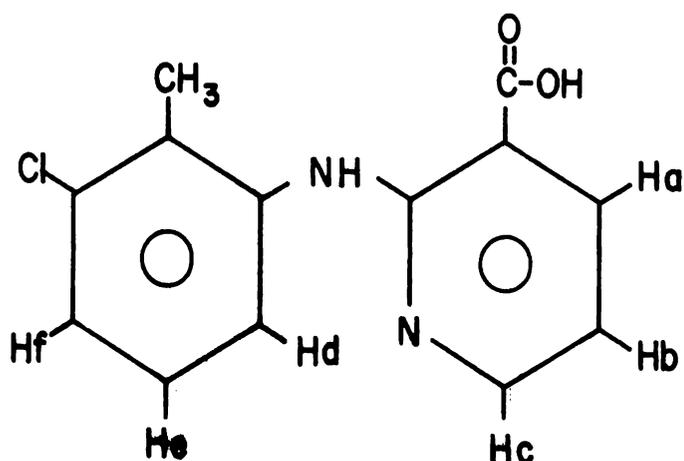
- a) Responde a la reacción del reinekato de amonio en medio ácido^{18,25}.
- b) Responde a la reacción del ácido pícrico. El picrato de clonixín funde entre 195-198°C^{18,25}.

Identidad: El espectro de infrarrojo (corrido en una pastilla de bromuro de potasio) presenta bandas a las siguientes longitudes de onda¹⁸:

Asignación	Longitud de onda cm ⁻¹
Banda ancha (ν $\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}$, O-H)	3300 - 2300
Banda fuerte (ν ≥ 0)	1680
Banda fina (amina)	1600
Vibración anillos aromáticos	1580, 1500, 1450
C-H aromáticos δ	770-720

donde: ν = alargamiento
 δ = doblamiento

Espectro de resonancia magnética nuclear en base al siguiente esquema^{1 8}:



ppm frecuencia	Asignación
2.4	Singulete 3H (CH ₃)
6.2	Señal ancha 2H (NH y OH)
6.85	Doblete de doblete (J=7.5 y J=4.5) H _F
7.2	Multiplete 2H (H _d y H _e)
8,2	Doblete de doblete (J=5, J=3H, 1H) H _c
8,35	Multiplete 2H (H _a y H _b).

Absorción al Ultravioleta: Una solución de 10 mcg/ml en NaOH 0.1 N presenta máximo de absorción a 284 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 515$) y mínimo a 242 nm^{1 8}.

Punto de fusión: Funde entre 228 - 231°C, con descomposición^{1 8},

Ensayo de pureza: Por titulación: Neutralizar 50 ml de alcohol utilizando solución 0.1 N de NaOH y fenolftaleína como indicador. Pesar una muestra de aproximadamente 200 mg y titular con solución 0.1N de NaOH. Cada ml de NaOH 0.1N equivale a 26.27 mg de clonixín^{1 8}.

Metales pesados: No más de 20 ppm.

Pérdida al secado: Secado a 105°C durante 2 hrs. en vacío no debe perder más de 1% de su peso.

Cloruros: No más de 20 ppm.

2.3 Cromatografía de líquidos a alta presión.

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación en donde se realiza la partición de cada uno de los componentes de una mezcla entre dos fases: una fase estacionaria que tiene una gran área de superficie y una fase móvil líquida que se percola sobre la fase estacionaria.

En esta técnica la fase estacionaria del sistema está empacada dentro de una columna y la fase móvil circula a través de ella.

Si los componentes de una mezcla presentan diferencias entre sus coeficientes de partición, cada uno de ellos se distribuirá y desplazará a lo largo de la columna a velocidades distintas, permitiéndolo así su separación²¹.

En el caso que nos ocupa, la cromatografía de líquidos puede comprender los siguientes tipos²⁴:

Diversos tipos de cromatografía de líquidos

Fase móvil	Fase estacionaria	Tipos de cromatografía
Líquido	Sólido	Cromatografía líquido/sólido
	Líquido	Cromatografía líquido/líquido

Mediante esta técnica la separación se lleva a cabo en una columna tubular empacada con un sólido poroso finalmente dividido, el cual puede actuar como fase estacio-

naria líquida.

La fase móvil es un líquido que fluye a través del empaque de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla que son selectivamente retenidos por la fase estacionaria. El flujo de la fase móvil se mantiene constante a través de todo el proceso y de esta manera se logra que cada componente de la mezcla sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil.

La cromatografía de líquidos a alta presión utiliza columnas de diámetro reducido (2 mm) que están empacadas con fases estacionarias de partículas con un tamaño entre 10-40 μ de diámetro.

Estas columnas son bastante eficaces pero ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea que presentan una gran caída de presión.

Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10 mg.

Si la presión de entrada no es muy elevada (100 atm ó menos) la muestra se introduce al sistema mediante una jeringa de alta presión; a presiones más elevadas se utilizan válvulas de inyección.

La detección a la salida de la columna de cada uno de los componentes se realiza mediante detectores específicos que proporcionan un registro continuo de la composición del eluato, lo que permite obtener cromatogramas que se utilizan para identificar y cuantificar los componentes de la mezcla.

A la fecha, los detectores más empleados en esta técnica están basados en la absorción de radiación ultravioleta o visible de los compuestos eluidos, o en el índice de refracción de los mismos.

La cromatografía de líquidos permite el análisis de compuestos líquidos y sólidos de muy variada naturaleza: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes.

A continuación se mencionan las características de la cromatografía de líquidos a alta presión²⁴:

Requerimientos de la muestra	Soluble
Tipo de muestra	Sólidos y líquidos, solubles en la fase móvil seleccionada.
Cantidad mínima detectable	10^{-9} g
Tiempo de análisis práctico	minutos.
Resolución	5000 platos teóricos por metro de columna

Instrumentos.

Un sistema cromatográfico de líquidos a alta presión consiste de las siguientes partes:

- a. Un depósito para la fase móvil.
- b. Bomba.
- c. Aparato gradiente (programador de la fase móvil).
- d. Sistema de inyección (entrada de la muestra).
- e. Columna.
- f. Detector.
- g. Registrador.
- h. Termostato para la columna y el detector.

En la figura No. 2 se muestra el diagrama de un sistema cromatográfico de líquidos a alta presión²¹.

Fase móvil.

La fase móvil se controla en cuanto a su presión, flujo y composición. Las características que debe presentar toda fase móvil para cromatografía de líquidos son²⁴:

- Disolver la muestra
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

Son componentes deseables en el instrumento, si bien no esenciales, los siguientes²⁴:

- Controles de temperatura para la columna y el detector

DIAGRAMA INTERNO DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS

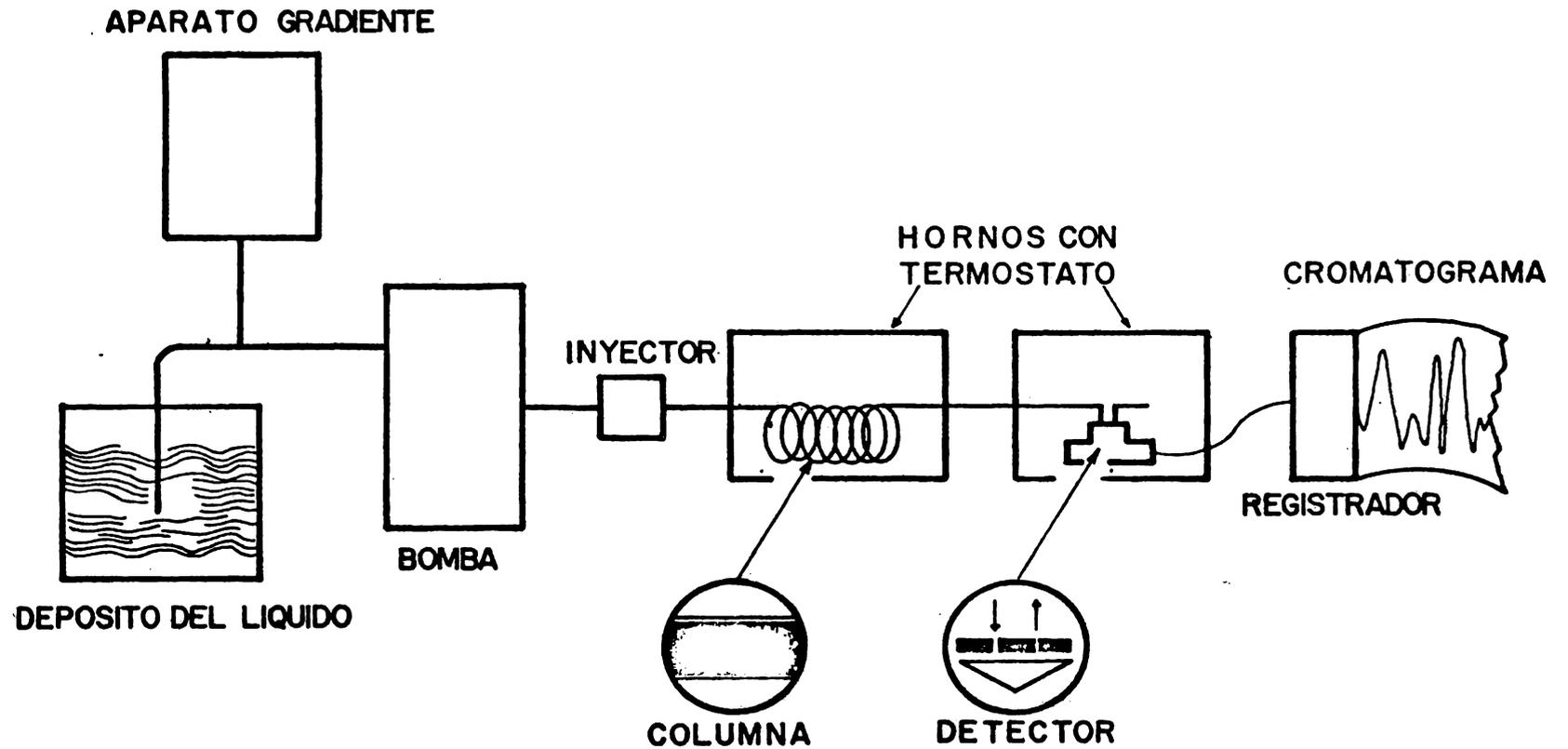


FIG. 2

- Recolectores de fracciones
- Programadores de fase móvil
- Medidores de flujo

Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una marcada tendencia de oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido.

Si estos gases se desgasifican dentro del instrumento forman burbujas que pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Por este motivo es necesario eliminar previamente los gases disueltos en la fase móvil.

Sistema de bombeo.

Las columnas actuales utilizadas en la cromatografía de líquidos a alta presión, están empacadas con materiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevado. Por esta razón se requiere de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación
- Intervalo de volúmenes obtenibles
- Reproducibilidad y constancia del flujo
- Características del flujo.

De acuerdo a las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas²⁴:

- Bombas mecánicas y
- Bombas neumáticas

En las bombas mecánicas hay dos tipos distintos:

- Bombas recíprocas (pistón o diafragma)
- Bombas de desplazamiento continuo.

Cámara de inyección.

Esta parte del sistema requiere de un diseño cuidadoso, puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil. Es en esta cámara donde se introduce la muestra que luego es arrastrada a la columna. Hay tres modalidades de introducir la muestra:

- Por medio de jeringas de alta presión
- Por medio de válvulas inyectoras y
- Por medio de jeringas comunes, suspendiendo el flujo momentáneamente.

Columnas.

Es en la columna donde se efectúa la separación de los componentes de la mezcla, básicamente es un segmento de tubo de un material inerte (vidrio, acero inoxidable, etc.) de

diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. La longitud de la columna varía entre 15 cm y varios metros; el diámetro en la mayoría de los casos es de 2 a 3 mm aunque puede llegar a 9 mm. En general las columnas más eficaces son de diámetro pequeño (2-3 mm) y efectúan análisis muy rápidos.

Fases estacionarias.

Los empaques para las columnas en cromatografía de líquidos a alta presión se dividen en dos categorías; porosas y superficialmente porosas o peliculares. Los materiales que se utilizan son generalmente gel de sílice y alúmina. Pueden ser de forma esférica o irregular, pueden utilizarse como fases estacionarias per-se o bien pueden estar soportando una fase estacionaria líquida químicamente unida^{21, 24}.

Detectores.

El detector ideal será aquel que satisfaga los siguientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal. Actualmente los detectores disponibles solo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular. Existen dos tipos de detectores de uso muy generalizado que son el detector de índice de refracción y el detector de radiación ultravioleta y visible (el detector de radiación ultravioleta es el que se utilizó en esta investigación).

Detector de radiación ultravioleta: Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al

pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

La respuesta de este detector es selectiva ya que solo se detectan los compuestos que absorben radiación de la longitud de onda a la que opera el detector. Actualmente este es el detector más sensible en cromatografía líquida y utiliza como fuente de radiación ultravioleta una lámpara de mercurio de baja presión; la intensidad es medida por una fotocelda doble que genera una señal que es amplificada y representada gráficamente por el registrador. Este detector no es sensible a los cambios de temperatura²⁴.

Análisis cualitativo.

La cromatografía de líquidos es esencialmente una técnica de separación y no de identificación, aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo; en general se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación de un compuesto determinado.

Hay algunos parámetros o técnicas puramente cromatográficos que en muchas ocasiones pueden servir de guía para la identificación de un compuesto como lo es el tiempo de retención.

Tiempo de retención: El volumen de la fase móvil requerido para eluir un compuesto de la columna se llama volumen de retención y se conoce como tiempo de retención el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra en la columna hasta que eluye el compuesto y que corresponde

al máximo del pico en la gráfica trazada por el registrador.

Cuando las condiciones de operación son constantes el tiempo de retención será característico de una sustancia dada.

Análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo de mezclas de sustancias en cromatografía de líquidos a alta presión se puede dividir en varias etapas²⁴:

- Muestreo (obtención y tratamiento de la muestra)
- Separación y detección (no debe haber descomposición de la muestra en la columna)
- Integración de las señales (medición de la altura del pico, triangulación, cortar y pesar, integración, etc.)
- Cálculo de la composición (normalización de las áreas, calibración externa, uso de un estándar interno).
- Interpretación estadística.

La cromatografía líquido/líquido normal utiliza fases estacionarias polares y fases móviles no polares, mientras que la cromatografía líquido/líquido en fase inversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar, de

tal manera que los compuestos no-polares o poco polares interaccionarán selectivamente con la fase líquida y serán retenidos más fuertemente que los que son polares²¹.

La cromatografía en fase inversa es especialmente útil para compuestos poco polares²¹.

3.1 Determinación de clonixín en plasma.

El método utilizado para la cuantificación de clonixín en plasma fué por cromatografía de líquidos a alta presión, en un sistema cromatográfico en fase inversa.

Los resultados obtenidos en este capítulo se presentan en el capítulo siguiente.

3.1.1 Instrumentos.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión Varian, modelo 8500. Columna para cromatógrafo de líquidos MCH-10 de 25 cm de longitud y 2.2 mm de D.I. (empacada con octadecilsiloxano unido a partículas de gel de sílice de 10 μ m de diámetro). Detector Varian U.V./Vis.; agitador mecánico Vortex-Mixer, Lab. Line Inst.; centrífuga MSE múltiple; Microprocesador Hewlett Packard modelo 3380 A.

3.1.2 Reactivos.

.Acido acético glacial, reactivo analítico (J. T. Baker).

.Acetonitrilo, reactivo analítico (J. T. Baker).

.Solución de ácido acético 2M: Diluir 115 ml de ácido acético glacial a 1 L con agua destilada.

.Solución de acetato de sodio 2M: Disolver 164 g de acetato de sodio anhidro, reactivo analítico (J. T. Baker) en agua destilada y diluir a 1 L.

.Metanol, grado espectro (Merck México, S.A.).

.Solución de referencia interna de ácido mefenámico, ácido N-(2,3-xilil)-antranílico, (Labs. La Campana, S.A). Pesar con exactitud alrededor de 10 mg de la muestra tipo de ácido mefenámico en un matraz volumétrico de 50 ml y disolver con metanol, llevar al aforo (concentración aproximada 0.2 mg/ml).

.Solución de referencia de clonixín, ácido 2-(3-cloro-toluidín)-nicotínico. (Inst. Franco Tossi, Italia). Pesar con exactitud alrededor de 10 mg de clonixín en un matraz volumétrico de 50 ml y disolver con metanol, llevar al aforo (concentración aproximada 0.2 mg/ml).

.Solución reguladora de acetato pH 3.2: mezclar 6.4 ml de acetato de sodio 2M con 93.6 ml de la solución de ácido acético 2M y diluir a 1L con agua destilada.

.Soluciones de referencia de los metabolitos de clonixín: ácido 2(2-metil-3-cloro-anilino)-5-hidroxi-nicotínico; ácido 2(2-metil-3-cloro-4-hidroxi-anilino) nicotínico; ácido 2(2-hidroxi metil-3-cloro-anilino) nicotínico, (Schering Corp. New Jersey U.S.A.). Pesar con exactitud alrededor de 10 mg de cada uno de los metabolitos en matraces volumétricos de 50 ml, por separado y disolver con metanol, llevar al aforo (concentración aproximada 0.2 mg/ml).

3.1.3 Método

En tubos de ensayo con tapón de rosca se adicionó con microjeringa (Hamilton, Reno Nev. U.S.A.) los siguientes volúmenes de la solución de referencia de clonixín: 30, 50, 100, 150, 200, 300 mcl; se añadió a cada uno de los tubos 1 ml de la solución de referencia interna de ácido mefenámico con pipeta volumétrica, proporcionando las siguientes concentraciones de clonixín: 6, 10, 20, 30, 40, 60 mcg/ml, respectivamente.

Se evaporó el disolvente en baño de agua con ayuda de una corriente suave de nitrógeno, recuperando con 50 mcl de metanol.

Se agregó 1 ml de plasma, se agitó manualmente; se adicionó 1 ml de acetonitrilo y se agitó vigorosamente en el agitador mecánico durante 2 min; se centrifugó a

4000 rpm durante 5 min, transfiriendo el sobrenadante claro a un nuevo tubo de ensayo con ayuda de una pipeta Pasteur con bulbo. Se inyectó 10 µl de cada una de las soluciones en el cromatógrafo de líquidos bajo las siguientes condiciones de operación:

Columna:	MCH-10
Fase móvil:	Solución de ácido acético 0.1 M: Acetonitrilo, 60:40, pH 4.5
Presión:	1750 psi
Detector:	U.V., 287 nm, sensibilidad: 0.05 AUSF
Microprocesador:	Atenuación: 256
	Vel. de la carta: 0.5 cm/min

3.1.4 Linealidad.

Con el fin de determinar si la relación entre las concentraciones de clonixín y el área de los picos del cromatograma resultante era lineal, se efectuó el estudio de la linealidad del método, determinando cantidades conocidas adicionadas a 1 ml de plasma. Se efectuaron determinaciones por duplicado de cada concentración (6, 10, 20, 30, 40, 60 µg/ml).

3.1.5 Reproducibilidad y recobro.

Con objeto de determinar la reproducibilidad del método se efectuaron 36 determinaciones de clonixín cuando se adicionaron diferentes cantidades conocidas a 1 ml de plasma.

Se estudió la influencia del plasma en la recuperación de clonixín adicionado, siguiendo el método ya descrito, para ello se preparó al mismo tiempo que los problemas una referencia externa de la misma concentración que los problemas, en la cual se omitió la adición de 1 ml de plasma y en su lugar se adicionó 1 ml de la fase móvil, continuándose el procedimiento de extracción explicado en la sección 3.1.3. Se calculó el área relativa del clonixín de la referencia externa a partir del cromatograma resultante de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área del pico de clonixín en la referencia externa}}{\text{Área del pico del ácido mefenámico en la ref. externa}} = \text{Ar Ref.}$$

Donde: Ar Ref. = Área relativa Clonixín de referencia.

Para los recobros se adicionó 1 ml de plasma y se eliminó la adición de la fase móvil, continuándose el procedimiento de extracción explicado en la sección 3.1.3. Se procedió a calcular el área relativa de clonixín de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área del pico de clonixín en el problema}}{\text{Área del pico del ác. mefenámico en el problema}} = \text{Ar Problema}$$

Donde: Ar Problema = Área relativa de Clonixín del problema

Se calculó la cantidad de clonixín recuperado con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Ar Clonixín problema}}{\text{Ar Clonixín referencia}} (100) = \% \text{ Clonixín recuperado}$$

3.1.6 Especificidad.

Para determinar si los metabolitos interferían con la determinación de clonixín, se efectuó el cromatograma de cada uno de los metabolitos por separado a concentraciones de 50 mcg/ml respectivamente y se determinó su tiempo de retención.

Posteriormente se efectuó la extracción en 1 ml de plasma de todos ellos en presencia de clonixín, a concentraciones de 50 mcg/ml y 20 mcg/ml respectivamente, de acuerdo al método de extracción descrito en la sección 3.1.3.

Se analizó la variación en la respuesta de clonixín.

3.2 Determinación de clonixín en orina

3.2.1 Instrumentos.

Los instrumentos utilizados para la determinación de clonixín en orina, son los mismos que se mencionan para la determinación en plasma, sección 3,1.1.

3.2.2 Reactivos.

Ya descritos en la sección 3.1.2

3.2.3 Método

En tubos de ensayo con tapón de rosca se adicionaron los siguientes volúmenes de la solución de referencia de clonixín: 25, 50, 250 μ l y 0.5, 1.0, 1.5 ml se añadió a cada uno de los tubos 0.5 ml de la solución de referencia interna de ácido mefenámico. Obteniéndose así las siguientes concentraciones de clonixín: 10, 20, 100, 200, 400, 600 μ g/ml, respectivamente.

Se evaporó el disolvente en un baño de agua con ayuda de una corriente suave de nitrógeno; se recuperó con 50 μ l de metanol y se adicionaron 0.5 ml de orina a cada tubo, agitando manualmente; se añadieron 1.5 ml de acetonitrilo y se agitó vigorosamente en el agitador mecánico durante 1 min. Ocasionalmente se observó la presencia de un precipitado ligero; en estos casos se centrifugó y se transfirió el líquido sobrenadante claro a otro tubo de ensayo limpio, con ayuda de una pipeta Pasteur.

3.2.4 Linealidad.

Con el fin de determinar si la relación entre las concentraciones de clonixín y el área de los picos del cromatograma resultante era lineal, se estudió la linealidad del método, determinando cantidades conocidas adicionadas a 0.5 ml de orina; se efectuaron determinaciones por duplicado para cada una de las siguientes concentraciones:

Concentración de Clonixín (mcg/ml)	Vol. inyectado mcl
10	10
20	10
100	10
200	4
400	4
600	3

Se estabilizó el cromatógrafo en las siguientes condiciones de operación:

Columna:	MCH-10
Fase móvil:	Solución reguladora de acetato (pH 3.2): Acetonitrilo, 60:40, pH final 4.1
Vel. de flujo:	40 ml/h Presión: 2750 psi
Detector:	U.V., 287 nm; sensibilidad: 0,05 AUSF
Microprocesador:	Vel. de la carta: 0.5 cm/min atenuación : 256

3.2.5 Reproducibilidad y recobro.

Con objeto de determinar la reproducibilidad del método se efectuaron 36 recobros de clonixín cuando se adicionaron cantidades conocidas a 0.5 ml de orina. El recobro se efectuó en la misma forma que se describe en la sección 3.1.5.

3.2.6 Especificidad.

Con el fin de determinar la especificidad del método, se efectuó en primer lugar el cromatograma de cada uno de los metabolitos de clonixín en orina; enseguida se efectuó la extracción de clonixín y sus metabolitos adicionándolos a 0.5 ml de orina, efectuándose el procedimiento de extracción descrito en la sección 3.1.5.

3.3 Valoración estadística de los métodos.

La precisión y exactitud de los métodos para determinar clonixín en plasma y orina fueron obtenidas estadísticamente. Se efectuaron recuperaciones del fármaco adicionado a cada fluido biológico, determinando el promedio de recobro, su desviación estándar, el error y los límites de confianza, de acuerdo a las siguientes formas estadísticas²¹:

DESVIACION ESTANDARD

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

ERROR ESTANDARD

$$Es = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL 95% DE PROBABILIDAD

$$IC = Es \cdot t_{95\%}$$

LIMITES DE CONFIANZA PARA EL 95% DE PROBABILIDAD

$$LC = \bar{X} \pm IC$$

Análisis por regresión lineal de los métodos.

Con objeto de conocer si la relación entre las cantidades adicionadas de clonixín y las áreas de los picos del cromatograma resultante tenían una relación lineal, se hizo el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados²⁶.

Capítulo IV. RESULTADOS.

4.1 Clonixín en plasma.

4.1.1 Linealidad.

En la Figura No. 3 se presenta el cromatograma característico de clonixín en plasma.

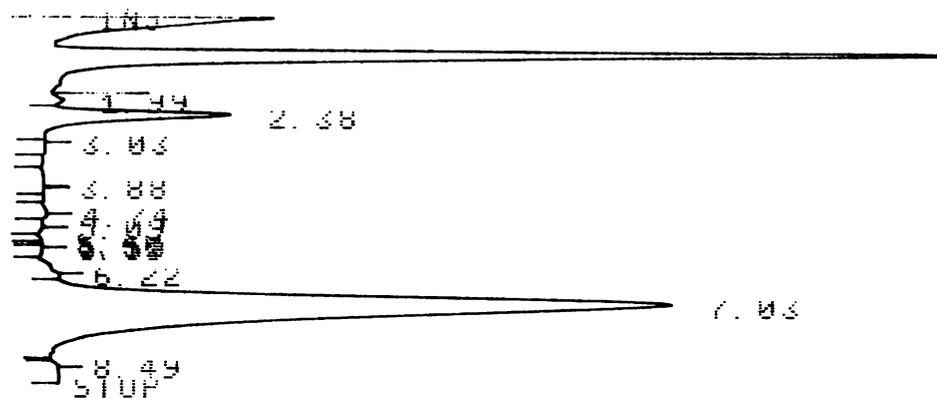
Siguiendo los lineamientos explicados en la sección 3.1.4, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla No. I; los valores que se presentan son el promedio de dos determinaciones.

Tabla No. I Linealidad del método en plasma

mcg Clonixín adicionado/ml	Area pico	Porcentaje de recuperación	mcg Clonixín recuperados/ml
6	.036	100	6
10	.060	100	10
20	.123	102	20.5
30	.181	96.5	29
40	.250	100	40
60	.385	102	61.6

Al graficar los valores de las columnas uno y cuatro de la Tabla No. I en papel milimétrico se obtuvo la relación lineal que se aprecia en la Figura No. 4.

Figura No. 3 Cromatograma de clonixín en plasma



RT	TYPE	HREN	HREN %
1.99	I	41441	.777 6
2.38	IM	618105	11.45
3.88	I	14185	.266 2
7.03		4663883	87.51

HP 3380H

DLY 1.

MY/M 3.00

STOP 10

HTIN 256

REJECT 10000

Donde:

Tiempo de retención (min)	Compuesto
2.38	Clonixín
7.03	Referencia interna (ácido mefenámico)

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CLONIXIN EN PLASMA

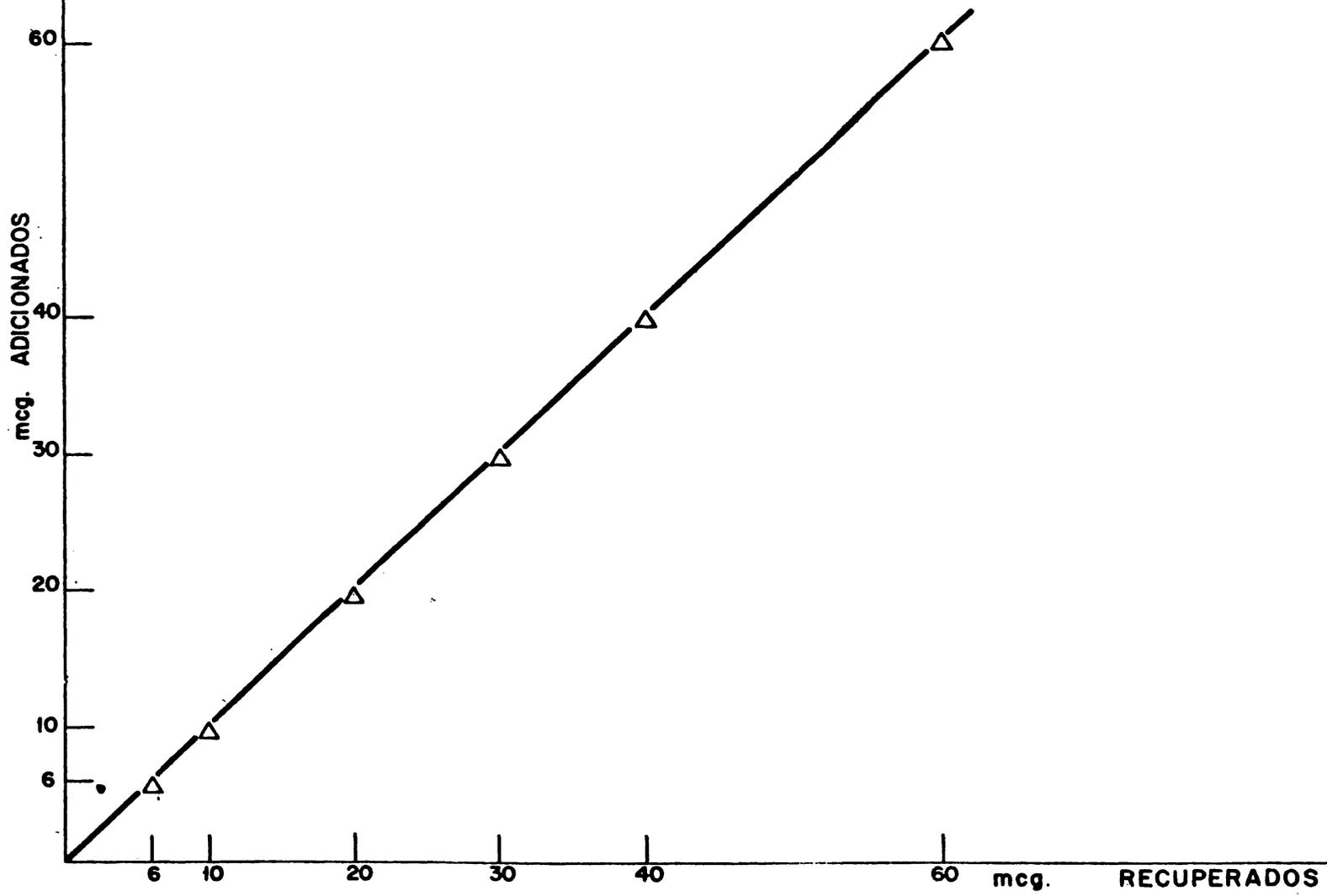


FIGURA No. 4

Linealidad del método en plasma.

Análisis por regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. A continuación se presentan el análisis de la linealidad del método en plasma, por el método de mínimos cuadrados, utilizando los valores experimentales de las columnas uno y dos de la Tabla No, I; extractados en la Tabla No. II. Las areas calculadas por este método se presentan en la columna tres de la misma tabla.

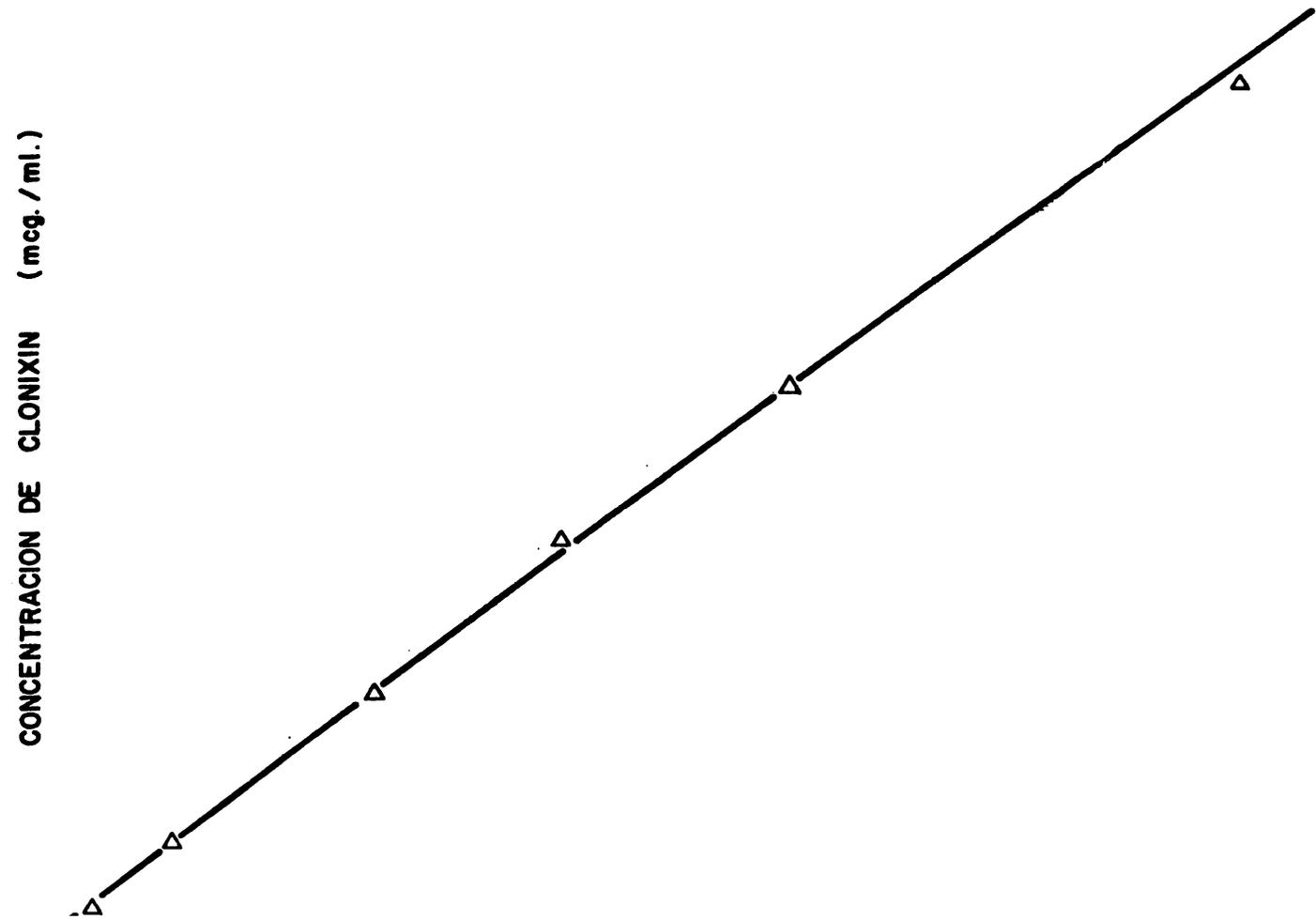
Tabla No. II Linealidad del método en plasma/area de los picos.

mcg Clonixfn adicionados/ml x	Area picos Clonixfn y	Area calculada
6	.036	.033
10	.060	.059
20	.123	.123
30	.181	.188
40	.251	.252
60	.385	.381

La ecuación de la línea recta encontrada es: $y = mx + b$
donde: $m = 0.006446$ $b = -0.0058$

El coeficiente de correlación calculado para la línea recta encontrada fué de 0.9994 y un coeficiente de determinación r^2 de 0.9988. Al graficar los valores de las columnas uno y dos de la Tabla No. II, en papel milimétrico se obtuvo la relación lineal que se aprecia en la Figura No. 5.

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CLONIXIN EN PLASMA



4.1.2 Análisis estadístico de reproducibilidad y recobro del método en plasma.

Los resultados obtenidos al efectuar 36 determinaciones de clonixín cuando se adicionaron diferentes cantidades conocidas del mismo a 1 ml de plasma, se presentan en la Tabla No. III.

En la Tabla No. IV se presenta el análisis estadístico de estos resultados.

Tabla No. III Recobros de clonixín en plasma

mcg Clonixín Adicionados/ml	mcg Clonixín Recuperados/ml	Porcentaje de Recuperación
6	5.76	96
"	5.4	90
"	5.82	97
"	5.7	95
"	5.85	97.5
"	5.88	98
10	10.3	103
"	9.86	98.6
"	9.5	95
"	9.5	95
"	9.7	97
"	9.8	98.3
20	19.7	98.4
"	19.2	96
"	19.7	98.4
"	19.4	97
"	20	100
"	20	100
30	29.7	98.9
"	30.5	101.6
"	30.5	101.6
"	29.7	98.9
"	29.6	98.9
"	29.6	98.8
40	38.6	96.5
"	39.4	98.4
"	39.8	99.6
"	39.8	99.6
"	39.4	98.4
"	37.8	94.5
60	57.24	95.4
"	58	96.7
"	58.8	97.7
"	60.7	101.2
"	57.4	95.6
"	60.3	100.5

Tabla No. IV Análisis estadístico del método en plasma

mcg Clonixín Adicionados/ ml	Porcentaje de Clonixín Recuperado	s	Es	IC _{95%}	LC _{95%} $\bar{X} \pm IC_{95\%}$	
					+	-
6	95.58	2.939	1.2	3.08	98.7	92.5
10	97.8	3.107	1.26	3.2	101.0	94.6
20	98.3	1.598	0.65	1.68	100.0	96.6
30	99.78	1.4	0.57	1.46	101.3	98.3
40	97.83	1.98	0.81	2.08	99.9	95.7
60	97.85	2.47	1.01	2.59	100.5	95.3

4.1.3 Especificidad.

Se efectuó el cromatograma de los metabolitos de clonixín en plasma presentando los siguientes tiempos de retención:

Compuesto	Tiempo de retención (min)
4'-OH clonixín	1.49
5- OH clonixín	2.03
2'-CH ₂ OH clonixín	1.54

En las Figuras Nos. 6, 7 y 8, se muestran respectivamente los cromatogramas característicos de cada uno de ellos.

Como se observa los tiempos de elución de los metabolitos son menores que el de clonixín, por lo que no interfieren con el area del pico de clonixín.

Se efectuó la extracción de clonixín y sus tres metabolitos en 1 ml de plasma; en la Figura No. 9 se presenta el cromatograma respectivo, observándose los tiempos de retención ilustrados en la siguiente Tabla:

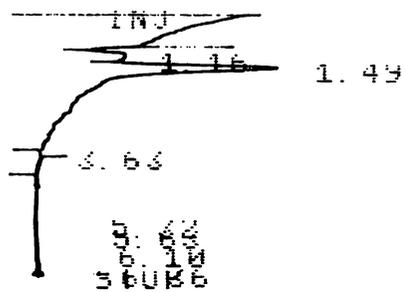
Tiempos retención de clonixín y sus metabolitos

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Clonixín	2,53
4'-OH	1,46
2'-CH ₂ OH	1.46
5-OH	1.89

Se observó que el tiempo de retención para clonixín y el 5-OH derivado se mantiene, no así para los derivados 4'-OH y 2'-CH₂OH, donde se presenta un solo pico de mayor area con un tiempo de retención menor.

En la Figura No. 3 se presentó el cromatograma de clonixín en el que se observa que el tiempo de retención para clonixín fué de 2.38 min. De acuerdo a los resultados, se observa que clonixín mantiene su tiempo de elución y que el pico se resuelve correctamente tanto cuando se corre individualmente, como cuando se tiene en presencia de sus tres metabolitos.

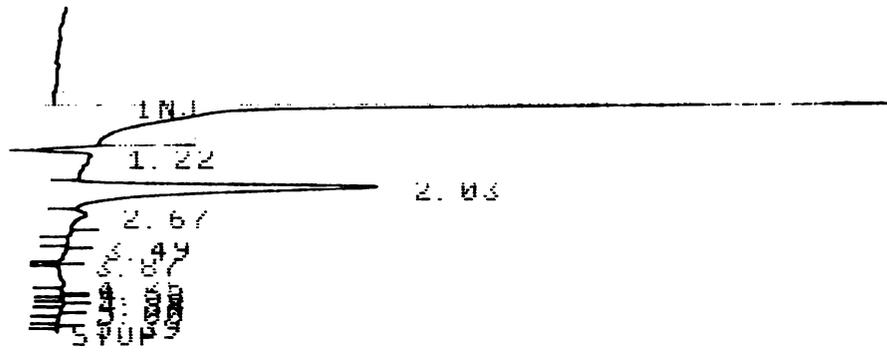
Figura No. 6 Cromatograma 4'-OH clonixín en plasma



RT	TYPE	AREA	AREA %
1.16		101201	66.61
5.32	I	17985	11.84
6.10	I	11357	7.475
6.66	IM	21393	T

Donde; el pico con tiempo de retención de 1.49 min corresponde al 4'-OH clonixín.

Figura No. 7 Cromatograma 5-OH clonixín en plasma

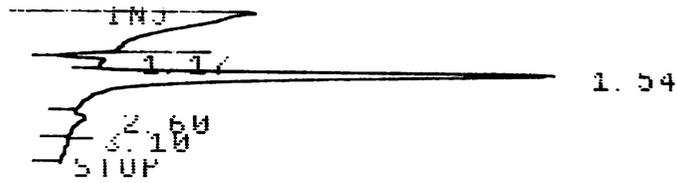


RI	TYPE	HREN	HREN %
1.22		384820	19.13
2.03	M	1571779	78.13
2.67	I	36044	1.792
4.35	I	18670	928 2

HP 3380H
 DLY 1. STOP 13 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HFIN 256

Donde: el pico con tiempo de retención de 2.03 min corresponde a 5-OH clonixín.

Figura No. 8 Cromatograma de 2'-hidroximetil clonixín en plasma.

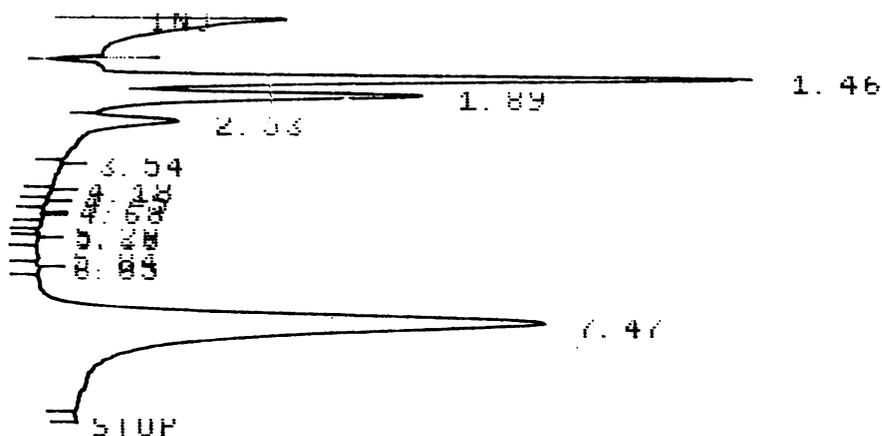


RT	TYPE	AREA	AREA %
1.17		114332	5.611
1.54	IM	1876892	92.11
2.60	I	46484	2.281

HP 3380H
 DLY 1. STOP 15 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HI IN 256

Donde: el pico con tiempo de retención de 1.54 min corresponde a 2'-hidroximetil clonixín.

Figura No. 9 Cromatograma de clonixín y sus tres meta-
bolitos en plasma.



RT	TYPE	HREH	HREN %
1.46		2074545	24.15
1.89	M	1342061	15.62
2.53	M	925107	10.77
7.47		4247911	49.45

HF 3380H
DLY 1. STOP 15 REJECT 10000
MV/M 3.00 HITN 256

Donde:

Tiempo de retención (min)	Compuesto
2.53	Clonixín
1.46	4'-OH, 2'-CH ₂ OH clonixín
1.89	5-OH clonixín
7.47	Referencia interna (ácido mefenámico)

4.2. Clonixín en orina

4.2.1 Linealidad.

En la Figura No. 10 se presenta el cromatograma de clonixín en orina.

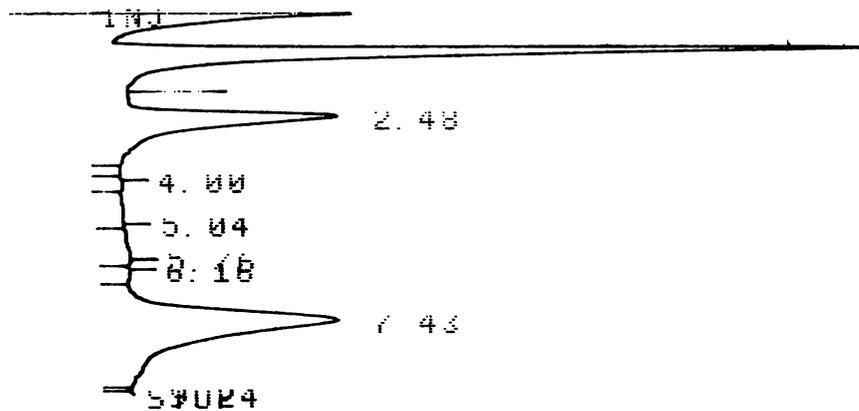
Siguiendo los lineamientos explicados en la sección 3.2.4 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla No. V; los valores presentados son el promedio de dos determinaciones.

Tabla No. V Linealidad del método en orina.

mcg Clonixín Adicionado/ml	Area pico	Porcentaje de recuperación	mcg Clonixín Recuperados/ml
20	.208	98,1	19.6
50	.48	96	48
100	1.06	100	100
200	2.1	99.05	198.1
400	4.14	99.5	398
500	5.2	100	100
600	6.0	96.2	577

Al graficar los valores de las columnas uno y cuatro de la Tabla No. V en papel milimétrico se obtuvo la relación lineal que se aprecia en la Figura No. 11.

Figura No. 10 Cromatograma de clonixfn en orina.

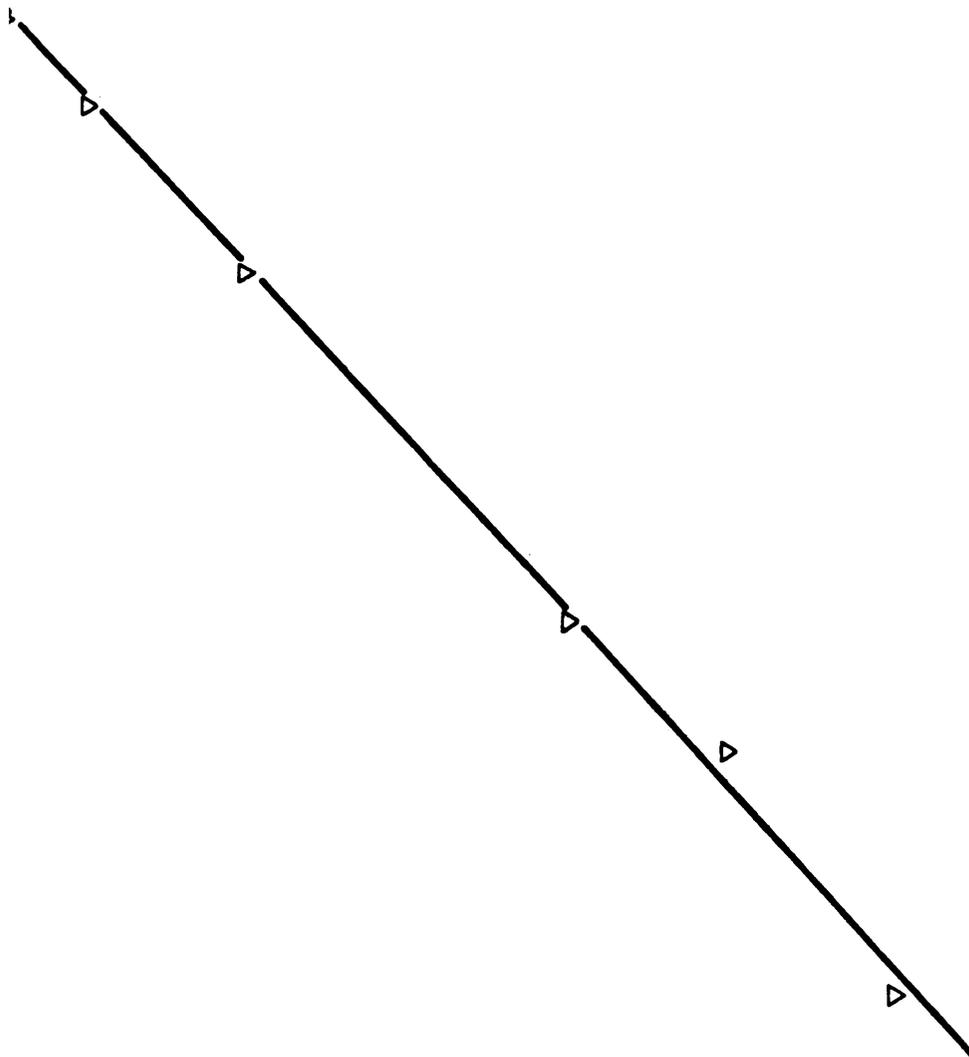


RT	TYPE	AREA	AREA %
2.48	I	1143753	36.67
5.04	I	12155	.389
5.76	I	15990	.512
7.43		1947044	62.43

HP 3380H
 DLY 1. STOP 15 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HITN 256

Donde:

Tiempo de retención (min)	Compuesto
2.48	Clonixfn
7.43	Referencia interna (ácido mefenámico)



Linealidad del método en orina,
Análisis por regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

A continuación se presenta el análisis de la linealidad del método en orina, por el método de mínimos cuadrados, utilizando los valores experimentales de las columnas uno y dos de la Tabla No. V extractados en la Tabla No. VI.

Las áreas calculadas por este método se presentan en la columna tres de la Tabla No. VI,

Tabla No. VI Linealidad del método en orina/area de los picos.

mcg Clonixín Adicionados/ml x	Area picos Clonixín y	Area Calculada
20	0.208	0,23
50	0,48	0.53
100	1.06	1,04
200	2.1	2.06
400	4.14	4,09
500	5.2	5,1
600	6.0	6.12

La ecuación de la línea recta encontrada es: $y=mx + b$
donde: $m= 0.01015$ $b= 0,0277$

Como se puede observar hay una gran concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores calculados por este método.

El coeficiente de correlación calculado para la línea recta encontrada fué de 0.9988 y el coeficiente de determinación r^2 fué de 0.9976.

Al graficar los valores de las columnas uno y dos de la Tabla No. VI se obtuvo la relación lineal que se aprecia en la Figura No. 12.

4.2.2 Análisis estadístico de reproducibilidad y recobro del método en orina.

Los resultados obtenidos al efectuar 36 determinaciones de clonixín cuando se adicionaron diferentes cantidades conocidas del mismo a 0.5 ml de orina se presentan en la Tabla No. VII.

En la Tabla No. VIII se presenta el análisis estadístico de estos resultados.

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CLONIXIN EN ORINA

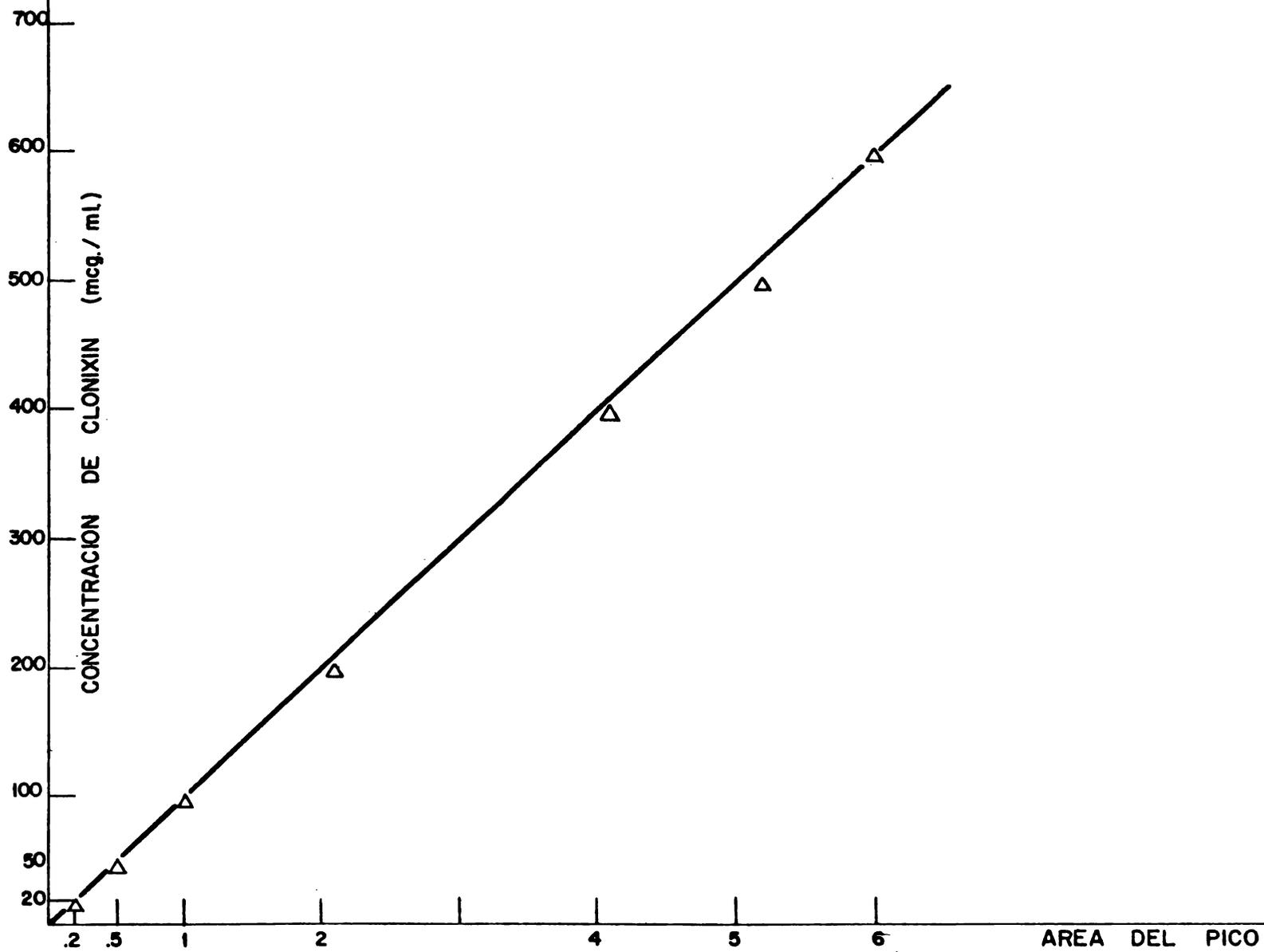


FIGURA No. 12

Tabla No. VII Recobros de clonixín en orina

mcg Clonixín Adicionados/ml	mcg Clonixín Recuperados/ml	Porcentaje de Recuperación
10	9.6	96
"	9.4	94
"	9.8	98
"	10.4	104
"	10.0	100
"	10.3	103
20	20.2	101
"	20	100
"	18.8	94
"	20.8	104
"	18.4	92
"	19.4	97
100	100.2	100
"	98.2	99
"	102	102
"	100	100
"	97	97
"	100	100
200	198	99
"	189	94
"	185	92
"	203	101
"	189	94
"	194	97
400	400	100
"	381	95
"	388	97
"	381	95
"	404	101
"	384	96
600	582	97
"	552	92
"	600	100
"	600	100
"	582	97
"	600	100

Tabla No. VIII Análisis estadístico del método en orina.

mcg Clonixín Adicionados/ ml	Porcentaje de Clonixín Recuperado	s	Es	IC _{95%}	LC ₉₅ $\bar{X} \pm IC$ +
10	99.16	3.5	1.44	3.6	101.7
20	98	3.7	1.54	3.8	101.8
100	100	1.9	0.7	1.7	101.7
200	96.4	3	1.37	3.5	99.9
400	97.4	2.5	1.04	2.6	100.0
600	97.6	3.1	1.28	3.2	100.8

4.2.3 Especificidad.

Se efectuó el cromatograma de los metabolitos de clonixín en orina presentando los siguientes tiempos de retención:

Compuesto	Tiempo de retención (min)
4'-OH Clonixín	1.49
2'-CH ₂ OH clonixín	1.53
5-OH clonixín	1.97

En las Figuras Nos. 13, 14, 15, se muestran respectivamente los cromatogramas característicos de cada uno de ellos.

Como se observa, los tiempos de retención de los metabolitos son menores que el de clonixín, por lo que no interfieren en la cuantificación del área del pico de clonixín.

Se efectuó la extracción de clonixín y sus tres metabolitos en 0.5 ml de orina; en la Figura No, 16 se presenta el cromatograma respectivo; observándose los tiempos de retención en la siguiente Tabla:

Tiempos de retención de clonixín y sus metabolitos

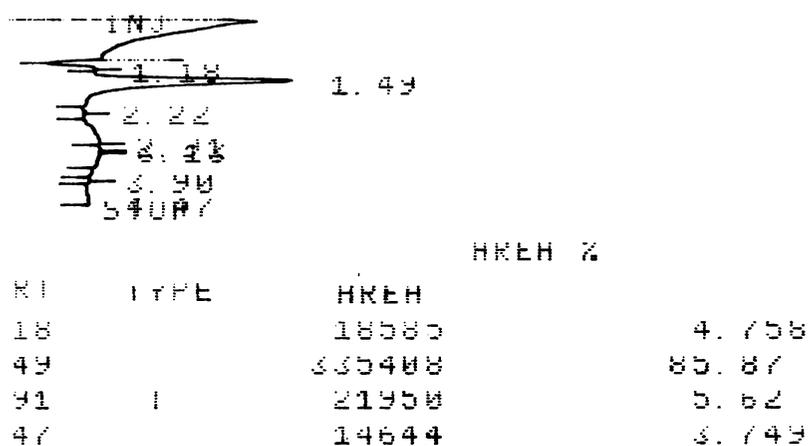
Compuesto	Tiempo de retención (min)
Clonixín	2.58
4'-OH clonixín	1.50
2'-CH ₂ OH clonixín	1.50
5-OH clonixín	1.93

Se observó que el tiempo de retención se mantuvo para clonixín y el derivado 5-OH, no así para los derivados 4'-OH y 2'-CH₂OH donde se presentó un solo pico de mayor area con un tiempo de retención de 1.5 min.

En la Figura No. 10 se presentó el cromatograma de clonixín en el que se observa que el tiempo de retención para clonixín fué de 2.48 min.

Los resultados muestran que clonixín mantiene su tiempo de elución, que el pico se resuelve correctamente cuando se tiene la presencia de los metabolitos y que no interfieren con el tiempo de elución del pico de clonixín en este fluido.

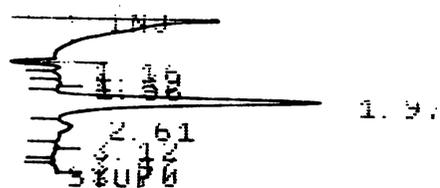
Figura No. 13 Cromatograma de 4'-OH clonixín en orina.



HP 3380H
 DELY 1. STOP 15 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HFIN 256

Donde: El pico con tiempo de retención de 1.49 min corresponde a 4'-OH clonixín.

Figura No. 14 Cromatograma de 5-OH clonixfn en orina

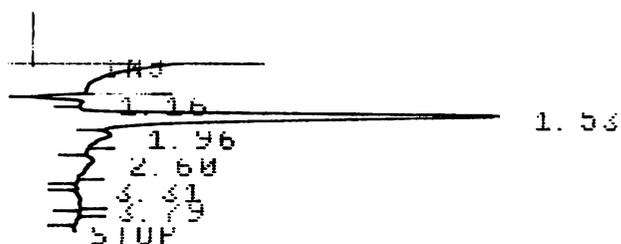


RT	TYPE	HREN	HREN %
1.16	M	76409	7.6
1.39	M	64375	6.403
1.56	M	25535	2.54
1.97	M	776926	77.28
2.61	M	62073	6.174

HP 3380H
 DLY 1. STUF 15 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HIIN 256

Donde: El pico con tiempo de retención de 1.97 min
 corresponde a 5-OH clonixfn.

Figura No. 15 Cromatograma de 2'-hidroximetil clonixín
en orina



RT	TYPE	HREN	HREN %
1.16		84597	3.98
1.53	M	1954272	91.94
1.96	I	27439	1.291
2.60	I	46450	2.185
3.79	IM	12918	.6077

HP 3380H

DLY 1.

MV/M 3.00

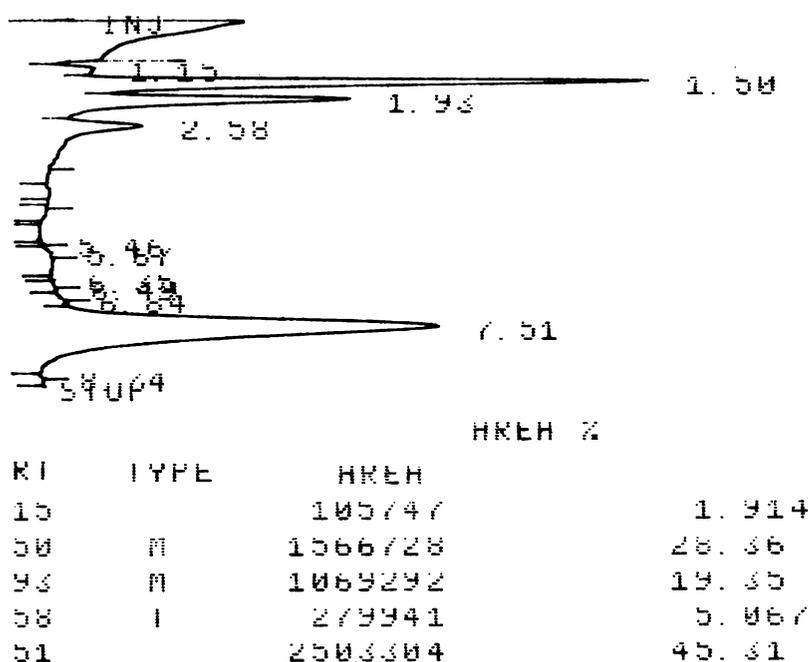
STOP 15

HTIN 256

REJECT 10000

Donde: El pico con tiempo de retención de 1.53 min corresponde a 2'-hidroximetil clonixín.

Figura No. 16 Cromatograma de clonixín y sus tres metabolitos en orina.



HP 3380H
 DLY 1. STUP 15 REJECT 10000
 MV/M 3.00 HITN 256

Donde:

Tiempo de retención (min)	Compuesto
2.58	Clonixín
1.50	4'-OH, 2'-CH ₂ OH
1.93	5-OH clonixín
7.51	Referencia interna

Capítulo V. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Entre los métodos comunmente usados para medir los niveles de un fármaco en la sangre y otros fluidos humanos, se encuentran diferentes métodos como son espectroscopía IR y UV , cromatografía de gases, cromatografía en placa fina, etc.

Con frecuencia la utilización de estos métodos consume tiempo y además , en ocasiones, se requiere la formación de derivados detectables. Ultimamente se ha venido utilizando la cromatografía de líquidos a alta presión, como un medio alternativo para eliminar las limitaciones impuestas en el análisis de fármacos en plasma por las técnicas analíticas clásicas.

En investigaciones recientes^{11, 14} , la cromatografía de líquidos a alta presión ha mostrado que provee excelentes separaciones cuantitativas de fármacos en plasma.

En el inicio de esta investigación se documentó los inconvenientes de varias extracciones y resultados cuantitativos pobres y poco reproducibles encontrados con el método anteriormente reportado para la determinación de clonixín en fluidos biológicos^{6,7}; asimismo, los resultados de analizar clonixín por cromatografía de gases, donde además de sucesivas extracciones era necesario efectuar la formación del ester metílico en la función ácido, (puesto que clonixín no es volátil), no fueron reproducibles. Por estos motivos se procedió al desarrollo de un método analítico para clonixín en fluidos biológicos por medio de cromatografía de líquidos a alta presión.

Para desarrollar el método analítico por cromatografía de líquidos a alta presión se puede utilizar la información del método de separación en placa fina como método piloto, si es que estos datos están disponibles, para predecir el resultado de la aplicación de una mezcla de disolventes o de un solo disolvente, en el sistema de cromatografía de líquidos. Sin embargo, se puede desarrollar directamente una separación por esta técnica sin un trabajo preliminar en otros sistemas.

Es necesario desarrollar ciertas guías^{2 3} relacionadas primeramente con la estructura química del fármaco (PM, estructura molecular) que se desea separar, sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, estabilidad, etc.), así como las características de los disolventes que se pretenden emplear (viscosidad, mínima absorción en U. V. del disolvente) y además, diferencias significativas en las relaciones de movilidad del fármaco en cada uno de los disolventes (R_f , tiempo de retención).

En el presente estudio, después de comparar los diferentes resultados en los sistemas de disolventes, se seleccionó la fase móvil que mostró mejor relación en el cromatógrafo de líquidos (acetonitrilo: solución reguladora de acetato, 40:60, pH 4.1). Se seleccionó una columna MCH-10 en fase inversa, (en virtud de las características de solubilidad y PM del clonixín) que tiene un octadecilhidrocarburo unido a partículas de sílice de 10 μ de diámetro, a través de una unión Si-O-Si-C.

Las columnas CH son utilizadas en fase inversa en cromatografía de líquidos cuando los componentes de la mezcla

a separar se reparten entre la fase estacionaria no polar del hidrocarburo y la fase móvil más polar²¹.

Con la fase móvil seleccionada se obtuvo la separación de clonixín en los fluidos biológicos (plasma y orina) en menos de 3 min , utilizándose un detector de U.V.; inyecciones individuales del fármaco confirmaron la identidad del pico.

Enseguida se seleccionó un estándar interno y para esto se consideró lo siguiente: solubilidad, disponibilidad, estabilidad, no interferencia con el compuesto de interés, buena resolución en el sistema y que además debe eluirse cerca del compuesto de interés²¹. El ácido mefenámico fué el estándar interno que se seleccionó al reunir las características anteriores.

5.1 Discusión de resultados.

A continuación se hará una revisión de los resultados obtenidos en cada una de las secciones anteriormente presentadas.

5.1.1 Clonixín en plasma.

Se observó que con el sistema de disolventes seleccionado se obtuvo una elución completa de clonixín y del estándar interno, el cromatograma muestra áreas bien definidas para ambos picos.

Sus tiempos de retención permanecieron constantes siendo para clonixín 2.5 ± 0.1 min .

El método de extracción que se presenta incluye acetoni-trilo como disolvente extractor, que mostró excelentes resultados al ser un buen disolvente para clonixín y eliminar prácticamente las interferencias debidas a las proteínas del plasma y de sustancias presentes en la orina, que pudieran interferir en la determinación, separación, detección y cuantificación del fármaco.

El proceso de extracción es sumamente sencillo y las manipulaciones se ven reducidas al mínimo, no presentándose problemas para trabajar con las muestras de plasma que normalmente son las que más complicaciones presentan. El método desarrollado es aplicable a plasma y orina.

5.1.1.1 Linealidad del método en plasma.

Los resultados obtenidos para linealidad se analizaron por dos métodos:

- 1º Comparando los resultados de concentración adicionada de clonixín/ cantidad recuperada, se obtuvo una relación lineal excelente (Figura No. 4, Tabla No. I).
- 2º Graficando los resultados obtenidos en los cromatogramas, area de los picos/concentración, se observó que si hay una respuesta lineal en la relación Concentración de clonixín/ area , corroborándose que el método es lineal (Figura No. 5).

Se utilizó el método de regresión lineal por "mínimos cuadrados y se constató que los pares de datos experimentales guardaban una relación lineal altamente

satisfactoria, presentando un coeficiente de determinación de 0.9988, Tabla No. II,

5.1.1.2 Reproducibilidad y recobro del método en plasma,

Al analizarse la reproducibilidad y recobro del método en plasma en cada grupo de concentraciones, se tiene un análisis más estricto de los resultados puesto que las desviaciones de la media se harán más aparentes y tendrán una mayor influencia en cada uno de los parámetros estadísticos (Tabla No. IV).

Se observa que la desviación estándar no fué mayor de 3.1, lo que indica que el método es preciso.

El intervalo de confianza para el 95% de probabilidad máximo fué de 3.2, el error estándar máximo fué de 1.2.

De lo cual se puede concluir que el método desarrollado es preciso y reproducible y que presenta mejores resultados que el método reportado anteriormente en donde se dan los resultados de recuperación de $95 \pm 5\%$. En el método que se reporta se tiene un promedio de recobro de 98%.

5.1.1.3 Especificidad del método en plasma.

Antes de analizar las muestras en una investigación es necesario determinar si otros materiales normalmente presentes en el plasma y en la orina podrían interferir en la separación; se efectuó el mismo procedimiento de

extracción incluyendo los metabolitos de clonixín y se obtuvo una no interferencia de ellos, puesto que estos al ser más polares se eluyen más rápidamente de la columna no interfiriendo con el clonixín, como se puede observar en los cromatogramas Nos. 6, 7 y 8.

Además se observó que los derivados 4'-OH y 2'-CH₂OH forman un solo pico de elución con el sistema de disolventes utilizado (Figura No. 9).

En los cromatogramas presentados en las Figuras Nos. 6 y 8, se observó que los tiempos de retención del 4'-OH y del 2'-CH₂OH eran muy similares cuando se corrieron individualmente. En el método reportado anteriormente no se documentó la especificidad y existe la posibilidad de que el método no sea específico, aunándose al hecho de que en dicho método se efectuaban dos separaciones consecutivas en placa fina para separar los metabolitos; en el método que se reporta se puede efectuar al mismo tiempo la separación de los metabolitos con la misma técnica.

5.1.2 Clonixín en orina.

El método no presentó ningún problema cuando se trabajó con orina. Inclusive, se pudo utilizar un menor volumen de este fluido para el análisis, lo cual representa una ventaja puesto que normalmente la orina presenta mayores concentraciones de clonixín y el volumen utilizado en el análisis disminuye aún más la posibilidad de problemas por impurezas que pudieran estar presentes;

no se observó ninguna interferencia (Figura No. 10).

Las manipulaciones son más sencillas, y rápidas que en plasma y el tiempo de análisis mínimo.

Se observa que al igual que en plasma, el clonixín mantiene su tiempo de retención en orina (tiempo de retención para clonixín fué de 2.5 ± 0.1 min), la elución de las muestras fué completa y los picos presentan una buena resolución.

El sistema de disolventes utilizado mostró excelentes separaciones en este fluído y muy ocasionalmente se observó la formación de turbidez.

5.1.2.1 Linealidad del método en orina.

Los resultados obtenidos para linealidad se analizaron por dos métodos:

- 1°. Comparando los resultados de cantidad adicionada/cantidad recuperada de clonixín, se obtuvo una buena relación lineal, (Tabla No. V, Figura No. 11).
- 2°. Graficando los resultados obtenidos en los cromatogramas; concentración de clonixín/area del pico; para cada diferente concentración. Se comprobó una respuesta lineal, ya que al presentarse una mayor concentración, se tiene una mayor area, que es directamente proporcional (Tabla No. VI, Figura No. 12).

Se utilizó el método de regresión lineal por mínimos cuadrados y se constató que los pares de datos experimentales guardaban una relación lineal altamente satisfactoria, con un coeficiente de determinación de 0.9976.

5.1.2.2 Reproducibilidad y recobro del método en orina.

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos para cada concentración, el análisis es más estricto. Se efectuó en la misma forma que en plasma, observándose que la desviación estándar máxima fue de 3.7 para el grupo de 20 mcg/ml (Tabla No. VIII).

La desviación estándar promedio es de 3 (incluyendo todos los puntos), lo que nos indica que el método tiene buena reproducibilidad.

El intervalo de confianza promedio, para el 95% de probabilidad fue de 3. El error estándar máximo obtenido fue de 1.54.

De lo cual se puede concluir que el método es específico, preciso y reproducible.

5.1.2.3 Especificidad del método en orina.

En el método que se reporta no se presentan interferencias debidas a los metabolitos de clonixín, puesto que al eluirse antes que el clonixín no interfieren

con el pico de este; se tuvo la misma respuesta que en plasma. Además, se observó que los derivados 4'-OH y 2'-CH₂OH forman un solo pico de elución cuando se extraen en orina, como se observa en el cromatograma de la Figura No. 16. En los cromatogramas de las figuras Nos. 13, 14 y 15 se efectuó la extracción individual de cada uno de ellos y se observó que los derivados 4'-OH y 2'-CH₂OH presentaban un tiempo de retención muy cercano, al estar presentes en orina, estos dos derivados con tiempo de retención tan similar, se eluyen al mismo tiempo de la columna con el sistema de disolventes utilizado.

5.2 Conclusiones.

La meta inicialmente propuesta a esta investigación fué la de desarrollar un método por cromatografía de líquidos para clonixín en fluidos biológicos.

Del análisis presentado en la sección anterior se concluye que el método desarrollado por cromatografía de líquidos a alta presión es rápido, preciso y específico para clonixín.

En el método que se propone en el presente trabajo se efectuó una sola extracción en ambos fluidos con una recuperación de 98% en plasma y orina. Siendo preciso, reproducible y específico.

La detección se efectuó por espectroscopía U.V. y los metabolitos son detectables por la misma técnica no

mostrando interferencia con clonixín.

El método en esta investigación supera al método publicado anteriormente^{6,7}, que requería de varias extracciones con una recuperación de $95\pm 5\%$ en donde la detección se hacía por espectroscopia U.V., requiriendo la extracción de los metabolitos por una técnica diferente.

Con objeto de encontrar un estándar interno se probaron diferentes fármacos antiinflamatorios de la serie de los fenamatos y del ácido antranílico como son: ácido niflúmico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, así como la indometacina, fenilbutazona y naproxén, no encontrándose problemas en su extracción y detección, de ahí que el presente método podría ser aplicado a la valoración de estos fármacos analgésicos no esteroides, con solubilidad similar.

- ¹ Finch, J.S. and Dekornfeld, T.J.: Analgesic properties of CBA 93626. Pharm. 10; 189 (1968).
- ² Watnick, A. S., Taber, R. I, and Tabachnick I. A.: Antiinflammatory and analgesic properties of Clonixin. Arch. Int. Pharmacodyn, Ther. 190; 78-90 (1971).
- ³ Watnick A. S., Taber, R, I, and Tabachnick I.I.A.: Pharmacological properties of 2-(2'methyl-3'-chloro)-anilino-nicotinic acid (SCH 10304) and antiinflammatory agent with analgesic and antipyretic action. Fed. Proc. 27; 533 (1968).
- ⁴ Ciofalo, V., Patel, J. and Taber R.: Antinociceptive activity of clonixin in Rhesus monkeys. Jap. Pharmacol. 22; 749-753. (1972).
- ⁵ Finch, J. S. and Dekornfeld, T. J.: Clonixin, a clinical evaluation of a new oral analgesic. J. Clin. Pharmacol. and New Drugs 7; 371-377 (1971).
- ⁶ Katchen B, Buxbaum S., Meyer J. and Ning J.: Metabolism and Pharmacokinetics of a new non steroid anti-inflammatory agent, 2-(3-Chloro-o-Toluidino) nicotinic acid (Clonixin) in rats, dogs and monkeys. J. Pharm. Exp. Ther. 184 (2); 453-464 (1973).
- ⁷ Katchen B., Buxbaum S., and Ning J., Disposition of

- Clonixin (2-(3-chloro-o-toluidino)nicotinic acid) in humans. J. Pharm. Exp. Ther., 187; 152-157 (1973).
- ⁸ Glasson B., Benakis A. and Strolin-Benedetti M., Distribution, excretion, metabolism and localization of a new antiinflammatory drug: Niflumic acid. Biochem. Pharmacol. 18; 633-643 (1969).
- ⁹ Furst D.E. and Paulus H.E.; Lack of effect of rheumatoid arthritis on clonixin metabolism. Clin. Pharm. and Ther. 17 (5) 622-626 (1975),
- ¹⁰ Shriver D. A., White C. B., Sandor A. and Rosenthale M. E. A profile of the rat gastrointestinal Toxicity of drugs used to treat inflammatory diseases. Tox. & Applied Pharm. (32); 73-83 (1975).
- ¹¹ Wax J., Winder C. V., Tessman D. K. and Stephens M. D. Comparative activities, Tolerances and safety of non steroidal antiinflammatory agents in rats. J. of Pharm. and Exp. Ther. 192 (1) 172-178 (1975).
- ¹² Arkel Yale S., Schrogie John J., Williams Rae. Clinical evaluation of clonixin, aspirin on plattelet aggregation. J. Clin. Pharm. 16 (1) 30-33 (1976).
- ¹³ Skelern G. C., Salole E.G. A high-speed liquid chromatografic analysis of indometacin in plasma. J. of Chromatography 14; 483-485 (1975).

- ¹⁴ Soldin S. J. and Hill J. G, Rapid micromethod measuring anticonvulsant drugs in serum by high-performance liquid chromatography. Clin. Chem. 22; 856 (1976).
- ¹⁵ Lakings D.B., Haggerty W. J., Rehagen G., and Barth H. Determination of indoprofen in physiological fluids by reverse phase liquid chromatography. J. Pharm. Sci. 67 (6) 831-833 (1978).
- ¹⁶ Geoffrey W. Peng, Gadalla M.A,F., Chiou Win L. Rapid and micro high pressure liquid chromatographic determination of Chloranphenicol in plasma. J. Pharm. Sci. 67 (7) 1036-1038 (1978).
- ¹⁷ Synthesis 2-anilinonicotinic acids. Chem. Abst. 68 59439.
- ¹⁸ Leiras Pharmaceutical Div. of Huhtamäki-yhtymä Oy, Turku Finland.
- ¹⁹ Clarke E.G.C. Isolation and identification of drugs Vol. I. The Pharmaceutical Press, 1974. Page 3.
- ²⁰ McNair H. M. and Bonelli E. J, Basic gas chromatography. Consolidated printers, Berkeley Calif. U.S. A. Varian Aerograph 1972.
- ²¹ Hadden N., Baumann F., Munk M., Stevenson R., Gere D., Zamaroni F., Majors R. Basic liquid Chromatography. Varian Aerograph 1972.

- ²² Remington's Pharmaceutical Sci., 14th Ed, Mack Pub. Co. Chapter 40, 678. 1970,
- ²³ Reid E. Sample preparation in the microdetermination of organic compounds in plasma or urine. The Analyst 101 (1198) 1-17 (1976).
- ²⁴ McNair H. M. y Esquivel B.H. Cromatografía líquida de alta presión. OEA. 1973.
- ²⁵ Pasto D., Johnson C, Organic Structure determination. Prentice-Hall, Inc. Canada. Sec. 12. 14-3, pág. 425, 426 (1969).
- ²⁶ Juran J. M. Quality Control Handbook 3th. Ed. Mc Graw Hill Pub. Regression Analysis. Section 26; 26-1, 26-10 (1974).



Q U I M I C A
D. E P G.