



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

*Facultad de Química-Farmacia
Departamento de Farmacia*

Trabajo de diploma

Título: Validación de técnica de cuantificación de
Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.

Autor: Junier Ávila Guerrero.

Tutores: Dra. Leisy Nieto Reyes.

Lic. Sildey Más Hernández.

2009-2010

CONSISTENTE TRANSPARENCIA



Exergo

“...No se equivoca el pájaro que ensayando el primer vuelo cae al suelo;

se equivoca aquel que por temor a caerse renuncia a volar por la seguridad del nido.

No se equivoca el hombre que ensaya distintos caminos para alcanzar sus metas; se equivoca

aquel que por temor a equivocarse nunca acciona.

Creo que al final del camino no te premiarán por lo que encuentres, sino por aquello que hayas buscado honestamente.

El error más grande lo cometes cuando, por temor a equivocarte, te equivocas dejando de arriesgar en el viaje hacia tus objetivos...”

Rabindranath Tagore



Dedicatoria

Este trabajo es dedicado a varias personas que fueron la inspiración de mi existir en la vida, en mis diferentes caminos a transitar por el mundo de la verdad, de las ideas, de lo maravilloso y lo malo. La primera persona es a la memoria de mi abuelo Ernesto Joaquín, quien me enseñó la bondad, lo bueno, el buscar lo que se lleva en el alma, a mi primo Jorge Meléndez, quien fue la inspiración a seguir adelante tras cualquier obstáculo presente en los caminos de la vida y de lo que soy hoy en día. El Comandante Fidel Castro, por permitirme estudiar y llegar a ser lo que hoy en día soy, al General de Ejército Raúl Castro por darme la oportunidad de obtener mi carrera a través de la orden 18, que sin ustedes no hubiese sido en lo que hoy me estoy convirtiendo. Gracias a todos desde lo más profundo de mi corazón.

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



Agradecimientos

Agradezco desde lo más profundo de mi corazón por estar a mi lado cuando los necesite. Mi querida madre por demostrarme que nunca nada está perdido y que se puede amilonar en el desespero y la angustia, que se debe ser fuerte aunque estés ahogado de la de la impotencia, de saber salir adelante, de ser el ejemplo de nosotros que dejó de ser mujer para ser madre y padre a la vez, mis hermanos por demostrarme que la unidad, el querer, la hermandad está por encima de todo aunque estés donde estés, mi novia que ha estado en las buenas y en las malas a mi lado, su familia por ayudarme siempre, mis tutoras, por aguantarme y tener paciencia todo el tiempo que estuvieron a mi lado, mis sobrinas que son mi inspiración, a todos los profesores que me hicieron lo que soy y por ayudarme hacer la persona que ayer no era, y a todas las personas que de una forma u otra hicieron posible que terminara con éxito. A estas personas mi amor infinito aunque mi existir quede en los recuerdos.

Junier Ávila Guerrero.

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



Resumen

Se determinaron algunos parámetros de desempeño para la técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia. Además, se comprobó la validez de la técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia para muestras de orina humana.



Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en vegetales, semillas, frutas y en bebidas, como vino y cerveza. A pesar de que los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día [Kenneth D. R. y col., 2003, Cañigueral, S, 2000 y 2002]

Se ha demostrado que tienen múltiples efectos farmacológicos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías [Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000; Alvarez, A, 1991; Roig,J.1974, Pautas para la evaluación de medicamentos herbarios. OMS]

En nuestro país, las plantas medicinales constituyen una alternativa terapéutica en la atención primaria. Además, constituyen fuentes de materias primas necesarias para la elaboración de medicamentos por parte de la industria farmacéutica [Navarro, C,2000]. Debido a su probada efectividad e inocuidad, el Ministerio de Salud Pública en coordinación con centros de investigación y universidades del país impulse el desarrollo de investigaciones sobre plantas medicinales con vistas a verificar científicamente los efectos farmacológicos propuestos a muchas de ellas por la medicina popular así como a obtener formas farmacéuticas que cumplan con los requerimientos tecnológicos y biofarmacéuticos establecidos para su uso como alternativa terapéutica en diversas enfermedades, muchas de ellas que constituyen un peligro para la salud fundamentalmente en países de poco desarrollo.

En el Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, existe un trabajo de investigación sistemático en cuanto a la obtención de extractos de origen vegetal con potencial acción farmacológica y la caracterización de algunos metabolitos secundarios responsables de dicha actividad, entre los que se encuentran flavonoides como la quercetina y la rutina, por lo que se hace necesario la elaboración de formas farmacéuticas seguras y eficaces. Es requisito indispensable, según lo establecido por los organismos reguladores, la caracterización farmacocinética y biofarmacéutica de las moléculas empleadas, así como la definición de las características de la absorción, biodistribución



y excreción del fármaco, así como sus posibilidades para llegar al sitio de acción son aspectos importantes a definir en etapas tempranas del desarrollo de medicamentos de origen natural y sintético^{[Guidelines. EMEA 2005; Miao-Ying, L y col., 2003, Carrasco Jiménez, M.S., 2002, Aspectos cinéticos en el Ensayo Clínico. Investigación Clínica y Bioética. www.icf.uab.es, Ravin, L.J y col.]}

En los estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética, las matrices biológicas son generalmente muy complejas y, en la mayoría de los casos, contienen a los analitos de interés a concentraciones muy bajas además, pueden presentarse interferencias. Por estas razones, a la determinación analítica frecuentemente le antecede procesos de extracción y concentración.

Los métodos de cuantificación más empleados para este tipo de estudio son los cromatográficos, y en menor medida los espectrofotométricos. Para elegir el método específico es necesario demostrar con anterioridad su adecuado funcionamiento y fiabilidad, es decir, debe cumplir con los requerimientos de validación correspondientes.

Problema científico:

No se dispone de una técnica analítica convenientemente validada que permita la cuantificación de Rutina en fluidos biológicos con vistas al desarrollo de estudios farmacobinéticos y biofarmacéuticos.

Hipótesis:

Si se desarrolla y valida una técnica analítica para la Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia se podrán realizar estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos para la obtención de materias primas de origen natural biodisponibles.



En consecuencia, los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General:

- Disponer de una metodología apropiada de cuantificación de Rutina con vistas a hacer las determinaciones en fluidos biológicos, de forma tal que pueda ser utilizada en los estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos.

Objetivos Específicos:

- Determinar algunos parámetros de desempeño para la técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.
- Comprobar la validez de la técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia para muestras de orina humana.



Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas, como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día [Kenneth D. R. y col., 2003, Cañigueral, S, 2000 y 2002, Vanacloxta, V. y cpl. 2003]

En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías [Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000; Alvarez, A, 1991, Roig,J.1974]

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) [Evans, W.C, 1987; Font, I y col. 1983]

Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' [De Oliveira, B.y col. 2001, Erlund, I, 2002] (Figura 1). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química [Aguilera-Ortiz, M.,y col. 2009]. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

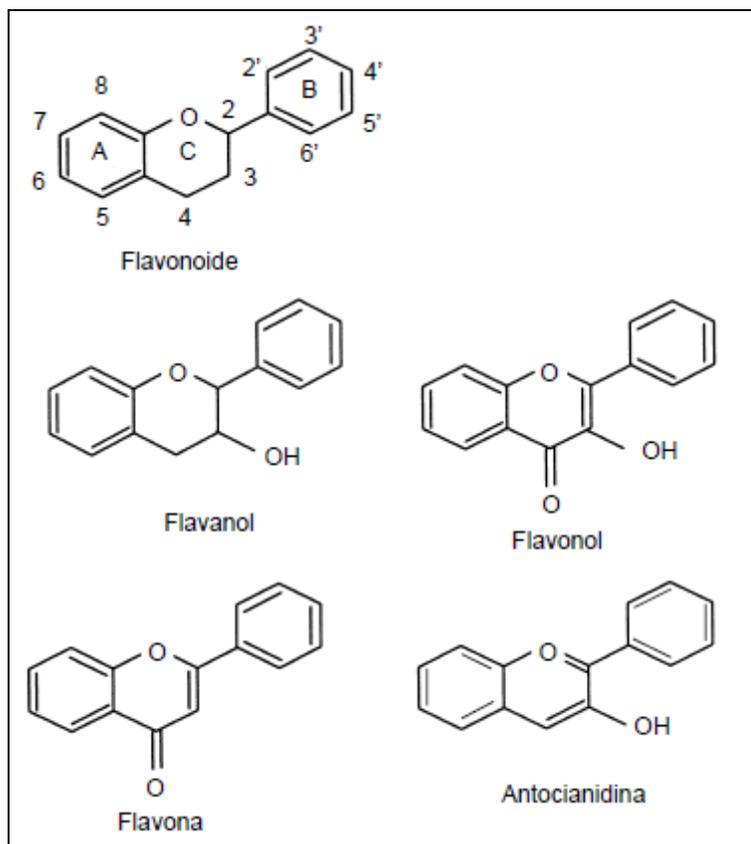


Figura 1: Flavonoides. Estructura básica y tipos [De Oliveira, B.y col. 2001, Erlund, I, 2002]

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 [De Oliveira, B.y col. 2001, Erlund, I, 2002]. La quercitina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (Figura 2). A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo

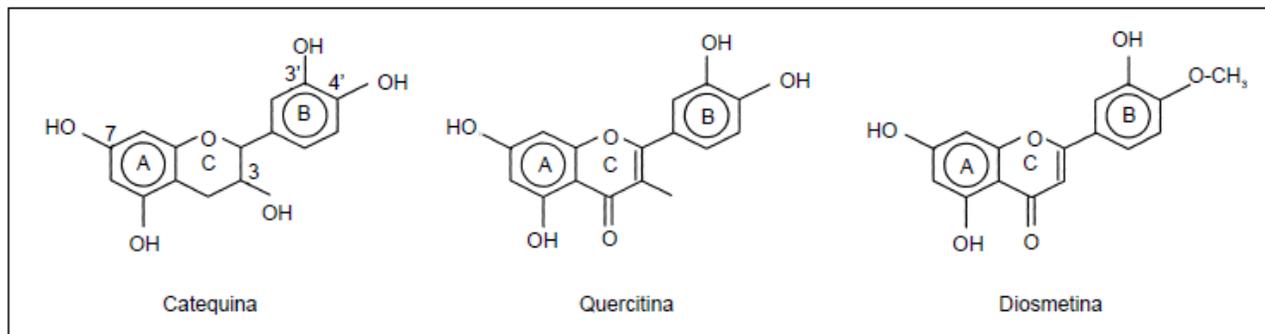


Figura 2: Características estructurales de los principales flavonoides^[De Oliveira, B.y col. 2001, Erlund, I, 2002]

Los flavonoides son compuestos que no son lipofílicos y, en adición, la presencia de los grupos fenólicos tanto los conjugados sulfatados como los glicosilados, facilitan la eliminación.

Antes de ser absorbido un flavonoide es escindido, dando por resultado, por una parte su aglicona y por otro su glicósido; teniendo este último mayor solubilidad en agua se absorbe rápidamente, sin embargo la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por lo que en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1.75 horas^[Miao-Ying, L y col., 2003, Erlund, I, 2002, Aspectos cinéticos en el Ensayo Clínico. Investigación Clínica y Bioética. www.icf.uab.es]

Consiguen una distribución homogénea en todos los tejidos corporales. Incluso logran atravesar la barrera hematoencefálica; permitiendo mayor paso, por supuesto, a los flavonoides más lipofílicos (como la naranjina) y su transportación con los receptores^[Kenneth D. R. y col., 2003; Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000]

Los flavonoides sufren metabolismo de primer paso y sus metabolitos, excretados por la bilis, aunque se reabsorben ya no tienen funcionalidad, logrando una biodisponibilidad del 1.5% en comparación con la administración intravenosa, es decir: $F = 0.015$ ^[Graf, B.A. 2008]

Es intensa la transformación de los flavonoides, llevándose a cabo en dos sitios: 1) hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I, en las que se adicionan o exponen grupos polares; 2) colon, mediante la fase II de la biotransformación, en donde la microbiota intestinal degrada los flavonoides no absorbidos. Y son conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatados.

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



La excreción se sucede después de que se forman estos conjugados y por dos salidas. Los no solubles en agua se excretan junto con la bilis al duodeno, y los solubles a las vías urinarias con la orina, siendo esta última la salida predominante. Pero al final lo que importa es la ruta por la cual se metabolizaron; pues si un flavonoide sólo es glucuronidado se excretará por vía renal (como la catequina), pero si es metilado y sulfatado será excretado por la vía hepática (como la quercetina) [Miao-Ying, L y col., 2003, Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000, Fennet, D.R.,2003, Zhao, Y y col. 2007]

Uno de los flavonoides presente en la naturaleza, y con el que se desarrolla este trabajo, es la **Rutina** (Figura 3), que se encuentra en el trigo, cítricos, té negro, la piel de la manzana [Gattuso, G.2007, Martínez, A, 2005, Rodríguez, L.E. 1997]

Nombre: 4H-Benzopiran-4ona. 3[16-O-(6-deoxi-alfa-L-manopiranosil)-beta-D-glucopiranosil-oxi]-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi, Rutina, Rutosido.

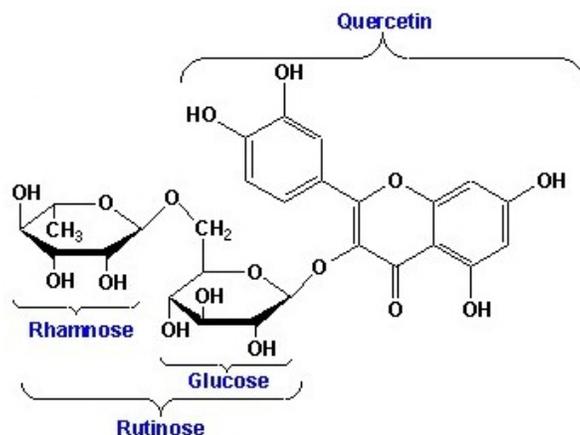


Figura 3: Estructura química de la Rutina.

La glicona es el disacárido reductor **rutinosa**, formado por una ramnosa (6-desoxi-L-manosa) unida a una glucosa mediante un enlace glicosídico. La aglicona o genina es un flavonol denominado **quercetina** (Figura 2).

Esta sustancia tiene efectos vasoprotectores ya que mejora el estado de los capilares aumentando su resistencia y reduciendo su permeabilidad. También tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000]

La farmacocinética es la ciencia que estudia la evolución y el metabolismo de los fármacos en el organismo mediante el análisis cinético de la curva que se obtiene partiendo de los fluidos

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



biológicos dependiendo de la dosis administrada. El tiempo de contacto con los receptores específicos para cada cual, la dinámica, la velocidad y la intensidad de transformación metabólica que condicionan muchas veces las modalidades de las acciones farmacológicas.

Evolución de los fármacos en el organismo. (LADME): [Carrasco Jiménez, M.S.,

2002; Doménech, J., 1997, Domínguez, A. www.farmaindustria.es]

Cuando se administra a un organismo (hombre o animal) un fármaco en una forma farmacéutica, las moléculas de dicho fármaco transcurre diversos procesos: Liberación (L), Absorción (A), Distribución (D), Metabolismo (M) y Excreción (E). Demostrándose la farmacocinética de los principios activos en el esquema presente en la Figura 4 [Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997, Domínguez, A. www.farmaindustria.es]

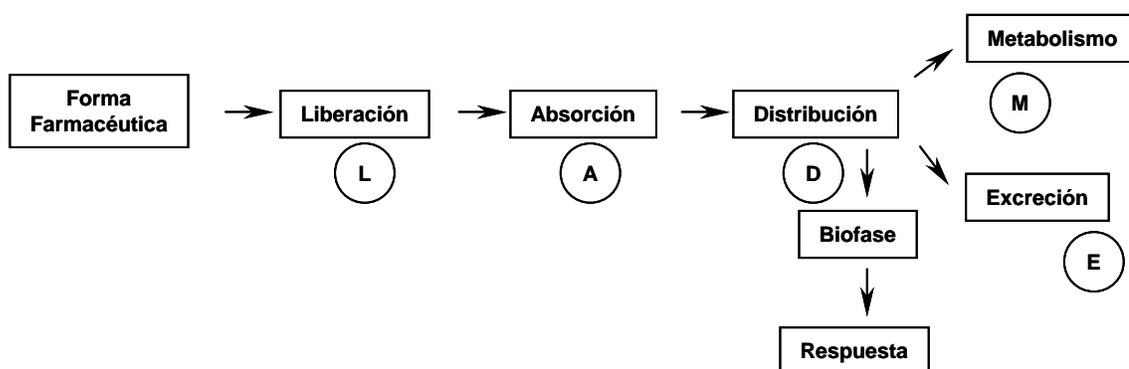


Figura 4: Esquema de los procesos. cinéticos de los fármacos en el organismo. Cinética LADME.¹

Como ejemplo la administración de una forma farmacéutica sólida, su liberación es el primer proceso que debe sufrir el fármaco, la disolución del mismo es lo que concluye. Pero la administración de una solución este paso no ocurre.

Después de la liberación, tiene lugar la absorción: donde las moléculas del fármaco alcanzan la circulación sistémica o sanguínea proceso que no ocurre en el caso de una administración intravenosa.

Independientemente de que se realice por poros acuosos, a través de la membrana lipídica de la célula o por ambos caminos a la vez. Este proceso es casi siempre pasivo,

Cuando las moléculas del fármaco han alcanzado la circulación sistémica ocurre la distribución, que suele ser un proceso pasivo y de primer orden. Normalmente se considera como un proceso de distribución al paso de un medicamento del plasma a zonas acuosas del organismo y sus procesos inversos, es decir, el retorno. El tiempo para que se logre dicho equilibrio es muy variable para los distintos fármacos, de modo que su mayor o menor rapidez dependen del modelo cinético que el mismo siga.



Desde que el fármaco llega a la circulación sanguínea al mismo tiempo de su distribución, tiene lugar la eliminación del mismo, que puede ser mediante el metabolismo y/o excreción como fármaco inalterado, por la orina o bilis mayoritariamente. Por lo que conducen siempre a la pérdida o salida del fármaco, pero el metabolismo siempre va a ser proceso activo, mientras que en la excreción existen dos tipos de procesos, los activos y pasivos, aunque predominan los pasivos.

Respuesta farmacológica [Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997]

La respuesta farmacológica viene determinada en general por la cantidad de fármaco que se une en el lugar de acción. Por lo que es imposible determinar la medida directa de dicha cantidad de fármaco, pero varios autores han sugerido que el concepto de actividad de un fármaco (y su respuesta) depende de su concentración plasmática. En la actualidad, se acepta de un modo general que, para muchos fármacos, existe una relación entre la respuesta y su concentración plasmática. Los cambios de la concentración plasmática de muchos de los fármacos van acompañados de variaciones parecidas a su concentración en el lugar de acción, y el número de complejos que se forman entre fármaco y receptor. Esto es válido sólo para fármacos que actúan reversiblemente, es decir, para aquellos que acción dura mientras prevalece su presencia en el receptor. La gran mayoría de los fármacos están dentro de este grupo.

Estudios farmacocinéticos [Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997]

En el estudio de la cinética LADME de un fármaco puede efectuarse en animales de experimentación y en humanos. Si los estudios en animales permiten mayor número de posibilidades, como el tomar muestras de casi todos los tejidos con el fin de caracterizar la distribución del fármaco, el sustrato ideal para este estudio es la especie humana ya que, en general es la destinataria de los fármacos.

Por motivos evidentes, las posibilidades de muestreo en la especie humana son considerablemente menores que en las especies empleadas en los laboratorios. De hecho, el estudio de LADME se emplea mediante dos tipos de datos:

1. Las curvas de nivel plasmático: se obtienen al representar en ejes cartesianos la concentración de fármacos en el plano de muestras de sangre obtenidas a tiempos prefijados. También se puede obtener tomando muestra a intervalos regulares, centrifugando y en el sobrenadante (plasma) se determina la concentración del fármaco. En ocasiones, se emplean niveles séricos en lugar de plasmáticos.
2. Las curvas de excreción urinaria: pueden representarse de forma distributiva o acumulativa y nos brindan criterio de la velocidad de excreción de los fármacos.



Análisis compartimental: [Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997, www.farmaindustria.es]

Los seres vivos son sistemas complejos que resulta difícil establecer relaciones cuantitativas entre la dosis de fármaco, la vía de administración que se emplea y la concentración o la cantidad de fármaco en distintas zonas anatómicas además del tiempo transcurrido. Con el motivo de lograr una adecuada descripción de la evolución temporal de los niveles del fármaco, por lo que utilizan modelos en los que se expresan matemáticamente las velocidades de los procesos de absorción, distribución y eliminación, que finalmente me conducen a ecuaciones que permiten describir y predecir las cantidades o concentraciones de fármacos en el cuerpo en función del tiempo.

Los modelos compartimentales son los más utilizados en la Farmacocinética. Un compartimiento representa una fracción de material biológico en la que el fármaco se supone uniformemente distribuido y representando las mismas propiedades cinéticas. Así un compartimiento tiende a agrupar zonas orgánicas afines, pero en realidad se trata de un concepto cinético, cuya entidad no tiene que ser necesariamente fisiológica en sentido estricto, aunque si abarca zonas con constantes cinéticas semejantes.

Un compartimiento esta definido por sectores acuosos que ocupan un volumen determinado (V) y que contienen una cantidad determinada de fármaco (Q). Por lo que la concentración del fármaco (C) en el compartimiento vendrá dada por el cociente entre Q y V :

$$C = \frac{Q}{V} \quad (1).$$

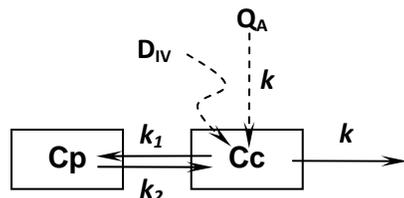
La cinética de entrada y salida del compartimiento puede ser de orden cero, uno o de Michaelis Menten.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la elaboración de un modelo farmacocinético es un modelo cinético lineal o no lineal. Que puede definirse la linealidad cinética como una proporcionalidad directa entre velocidades de transferencias y la concentraciones (o distintas concentraciones), por tanto, un modelo farmacocinético lineal, es aquel que los procesos cinéticos responden a una cinética de primer orden (tiendo proporcionalidad directa entre velocidad y concentración, o velocidad y cantidad siempre y cuando no cambie la variación del volumen). Producto a eso, los valores de los parámetros farmacocinéticos no cambian al variar la dosis, la concentración de un fármaco a un tiempo determinado es directamente proporcional a la dosis administrada y la concentración teniendo un área bajo la curva frente al tiempo es una fracción lineal de la dosis administrada por vía intravenosa. Hay veces que en ocasiones se observa que al variar la dosis de un fármaco dado, cambia el valor de uno o más parámetros farmacocinéticos y la concentración a un tiempo determinado no es directamente proporcional a la variación de la dosis. En estos casos, se trata de una farmacocinética dependiente de la dosis o un fármaco con cinética no lineal.



Modelo monocompartimental

Este modelo representa al organismo y es el más sencillo, a efectos de la distribución, como un solo compartimento. Siendo la principal característica de este modelo es que se considera instantánea la distribución del fármaco, una vez administrado por vía intravenosa o extravasal. Reflejándose este modelo en la Figura 5.



Siendo:

Cc: Concentración de fármaco en el Compartimento central.

Cp: Concentración de fármaco en el Compartimento periférico

D_{iv} la dosis administrada por vía intravenosa.

Q_A: dosis aplicada por vía extravasal.

k_a: constante de velocidad de absorción.

k₁₂: constante de velocidad de distribución.

k₂₁: constante de velocidad de retorno.

k_e: constante de velocidad de eliminación.

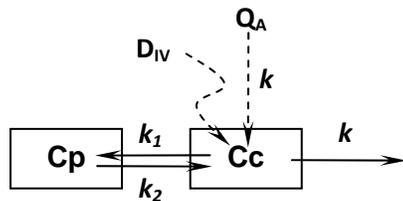
Figura 5: Representación esquemática del modelo monocompartimental, administración intravenosa o extravasal.

- Modelo bicompartimental

Sin embargo, la mayoría de los fármacos requieren de un modelo algo más complejo, el bicompartimental, el cual intenta reflejar el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo.

Es evidente que aquellos tejidos con mayor aporte sanguíneo relativo, recibirán en los momentos inmediatamente posteriores a la administración (intravenosa o extravasal) del fármaco, un mayor aporte relativo de este, que se concretará en el hecho de que el equilibrio de la distribución del fármaco entre dichos tejidos y el plasma se alcanzará rápidamente, al contrario de lo que sucederá con aquellos tejidos con un menor aporte sanguíneo relativo.

El primer compartimento reseñado recibe el nombre de compartimento central y el segundo es el compartimento periférico (Figura 6).



siendo:

Cc: Concentración de fármaco en el Compartimento central.

Cp: Concentración de fármaco en el Compartimento periférico

D_{IV} la dosis administrada por vía intravenosa.

Q_A : dosis aplicada por vía extravasal.

k_a : constante de velocidad de absorción.

k_{12} : constante de velocidad de distribución.

k_{21} : constante de velocidad de retorno.

k_e : constante de velocidad de eliminación.

Figura. 6: Representación esquemática del modelo bicompartimental, administración intravenosa o extravasal.

Los procesos de absorción, distribución y eliminación de los fármacos no son siempre de orden 1 estricto, sino que en ocasiones se trata de procesos saturables. La absorción puede tener lugar mediante un proceso activo de transporte. La distribución puede verse afectada por la naturaleza saturable de la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas, la unión saturable de los tejidos o, incluso el transporte saturable a través de las membranas celulares. La eliminación también podría verse afectada por la unión saturable a las proteínas plasmáticas o por la naturaleza de los mecanismos propios de la eliminación que responden a cinéticas de Michaelis Menten, como la secreción tubular activa y el metabolismo. En estos casos podrían manifestarse modelos cinéticos no lineales.

Análisis no compartimental ^[Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997]

La farmacocinética no compartimental es la aplicación de la cinética estadística al análisis de las curvas del nivel plasmático, de forma que se pueda obtener parámetros representativos de las mismas sin necesidad de ajustarlos a un modelo determinado.

Existen varios parámetros farmacocinéticos que pueden determinarse distintas maneras, mediante tratamiento compartimental y no compartimental, mientras que hay otros que sólo pueden calcularse de modelo no compartimental, a través de la determinación de los modelos estadísticos.



La interpretación de los datos de los estudios farmacocinéticos está influenciada por la técnica analítica que se emplee

Validación de los métodos analíticos [Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007].

Las características de funcionamiento de un método analítico, comprenden todos los datos y resultados que demuestran la aptitud para el uso al que se destina. Considerándose los siguientes grupos de funcionamiento.

- **Características de practicabilidad:** son las que deciden si el procedimiento es fácil o difícil para realizar la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.
- **Características de idoneidad:** Es el conjunto de parámetros que garantiza que el sistema pueda responder, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en el método de validación. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.
- **Características de fiabilidad:** son las que me permiten manifestar la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de la validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.

- **Curva patrón:**

Esta refleja la relación entre cantidad y el contenido del analito en una solución de muestra y la respuesta de la medición resultante.

La respuesta de la medición debe utilizarse al menos 6 puntos de medición diferentes. Las determinaciones tienen que hacerse sobre las muestras de referencia o sobre muestras-blanco que se les ha añadido el analito en concentraciones con distribución exactas cubriendo el rango de trabajo completamente. Las concentraciones deben seleccionarse en ambos lados del rango activo de trabajo.

Debe repetirse el experimento al menos una vez. Los resultados pueden presentarse gráficamente, la ecuación de la regresión lineal debe darse, así como el coeficiente de correlación como una medida de la distribución ($r > 0.999$).^[34]



De un método analítico los parámetros que expresan la fiabilidad son: [Calpena

Campanamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007, Díaz Polanco, I.y col, 2000]

1. Linealidad:

Es un método analítico con la capacidad de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra dentro de un intervalo determinado. En varios casos se considera la linealidad dentro de la validación como criterio inicial.

En este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta, además de los intervalos o rango de concentraciones del analito siendo este método satisfactorio. La linealidad se relaciona, con la sensibilidad de calibrado o coeficiente diferencial entre la señal medida y la concentración del analito. Definiendose la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés.

Este ensayo puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito. Se debe realizar un tanteo previo con diversos patrones que estén en un rango de concentraciones bastante amplio que el intervalo de concentraciones a emplear, para así asegurar que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar. Luego se preparan una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de soluciones patrón pueden ser de 3 a 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra

[Calpena Campanamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994;

URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007; Guidelines. EMEA 2005.]

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos:

Debe efectuar una interpretación estadística de regresión:

Coefficiente de correlación (r): refleja el grado de relación entre las variables X (concentración), y la variable Y (la respuesta). Su valor máximo es 1. Si (r) es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil por lo tanto se considera que no existe; si r es cercano a la unidad, entonces el ajuste es bueno siendo esto un indicativo de una fuerte relación entre X e Y, es decir, existe correlación con una probabilidad elevada.

r = [math display="block">\frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(Y - \bar{Y})^2}} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) - \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}} \quad (2)

Se obtienen valores de (r) elevados en análisis químico, iguales o superiores a 0.999, si el análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0.990)

[Calpena Campanamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]



Ensayos de linealidad:

Para verificar la linealidad existen diversos procedimientos :

-Coeficiente de variación de los factores respuesta.

El factor de respuesta es la relación que existen entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser cercano al valor de la pendiente y semejantes entre si, por tanto el coeficiente de variación de respuesta puede tomarse como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación que sea superior al 5% indica que hay falta de linealidad.

Factores de respuesta: $f_i = \frac{Y}{X}$ (3)

Media de fi: $\bar{f} = \frac{\sum f_i}{n}$ (4)

Desviación estándar de f: $Sf = \sqrt{\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1}}$, (5)

Coeficiente de variación de f: $CVf = \frac{Sf}{\bar{f}} 100$ (6)

Es la significación estadística de la varianza de la pendiente (b) de la recta de regresión.

La pendiente (b) se conoce además como coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). [Calpena Campany, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

La varianza de la pendiente (Sb) es utilizada como expresión matemática de la linealidad: a menor varianza mejor linealidad. Se puede determinar según las siguientes formulas:

$$Sb^2 = \frac{S^2Y, X}{\sum (X - \bar{X})^2} = \frac{S^2Y, X}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$
 (7)

(S²Y, X) es la varianza del error experimental total, varianza residual o varianza de regresión de Y sobre X.

El valor de (S²Y, X) se obtiene mediante las ecuaciones siguientes:



$$S^2_{Y,X} = \frac{\sum(Y - \bar{Y})^2 - \left(\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) \right)^2}{n-2} = \frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{n-2} = \frac{\sum(Y - \bar{Y})^2}{n-2} (1-r^2)$$

(8)

El error estándar o la desviación estándar de la pendiente (Sb) y la desviación estándar relativa Sb_{rel} (%), pueden ser empleadas también para expresar la linealidad.

$$Sb = \sqrt{Sb^2} \tag{9}$$

$$Sb_{rel} (\%) = \frac{Sb}{b} 100 \tag{10}$$

Criterio de aceptación $Sb_{rel} (\%) \leq 2\%$.

Los límites de confianza de la pendiente se obtienen a partir de la expresión: $b \pm tSb$

Siendo (t) el valor de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $p = 0.05$)

Otro test estadístico de (b) se determina de la expresión: $t_{exp} = \frac{|b|}{Sb}$. (11)

En la tabla de t se halla el grado de significación para n-2 grados de libertad. Hipótesis nula: $b=0$

Si $t_{exp} > t_{tab}$ significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada. [Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Análisis de la varianza de la regresión.

Este método sólo puede emplearse si existen réplicas para cada concentración. El valor de F_{exp} es la relación entre la varianza no lineal (producto a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales) y la varianza dentro de las series (producto al error experimental que esta dentro de las series) si $F_{exp} < F_{tab}$ (F_{n_1-1/n_2-1} , $p=0,05$) para un grado de significación determinado implica que la linealidad es correcta. [Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007, Espinosa, M., 1987]

Por test de proporcionalidad.

Lo mas ideal el valor de la intercepción con el eje de las ordenadas el origen (a) debe ser cero porque indica el error sistemático del método.

La varianza del término independiente se puede calcular:



$$Sa^2 = Sb^2 \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2_{Y,X} \sum X^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} = \frac{S^2_{Y,X} \sum X^2}{\sum (X - \bar{X})^2} \quad (12)$$

La desviación o error estándar es:

$$Sa = \sqrt{Sa^2} \quad (13)$$

$$Sa_{rel} (\%) = \frac{Sa}{a} 100 \quad (14)$$

Los límites de confianza del término independiente son: $a \pm tSa$

Siendo t el valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida, generalmente p= 0,05. Si los límites obtenidos incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad ^[19, 50]

La significación estadística de a se puede deducir de la expresión: $t_{exp} = \frac{|a|}{Sa} \quad (15)$

En la tabla de t se halla el grado de significación para n-2 grados de libertad. Hipótesis nula $a = 0$ [Calpena Campany, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Sensibilidad de calibrado:

La sensibilidad de calibrado o coeficiente diferencial entre la señal medida y la concentración del analito es igual al valor de la pendiente de la curva de calibrado a una concentración dada. En el caso de la calibración lineal, la pendiente b de la recta de regresión coincide con la sensibilidad de calibrado además con el factor respuesta. [Calpena Campany, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

La sensibilidad indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones de la concentración del analito. En un método analítico sensible, en uno ligero incremento de concentración conlleva a incrementos notables de señal o respuesta.

Valores aceptables de los parámetros de linealidad. [Calpena Campany, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Expresión de la recta de regresión: $Y = bX + a$

Coefficiente de correlación: $r \geq 0,99$

Prueba de linealidad: $CV_f \leq 5\%$, $Sb_{rel} \leq 2\%$

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



Prueba de proporcionalidad: $a \pm t.Sa$ debe incluir al cero para $p = 0,05$

Precisión:

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos independientemente obtenidos bajo condiciones específicas. La precisión depende solamente de la distribución de los errores aleatorios, no estando asociada con el valor real. Se expresa mayormente como la desviación típica de los resultados analíticos. Una baja precisión puede producir una elevada desviación típica. La precisión es una característica importante en la elevación de todos los métodos cuantitativos.

Este aspecto depende generalmente de las condiciones bajo las cuales ha sido estimado. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad representan evidentemente condiciones diferentes mientras que la reproducibilidad interna cae dentro de estos dos extremos.

Repetibilidad: Es una estimación de repetibilidad de un método, se obtienen cuando los resultados analíticos vienen de porciones idénticas de ensayo, en el mismo laboratorio, realizado por el mismo analista, utilizando el mismo equipo y dentro de un corto intervalo de tiempo.

Precisión intermedia o Reproducibilidad: puede estimarse sobre la base de los resultados obtenidos cuando el método es utilizado para analizar idénticas porciones de un ensayo en diferentes laboratorios empleando diversos equipos diferentes. La reproducibilidad interna, es la concordancia de resultados cuando los análisis se realizan en el mismo laboratorio, utilizando el mismo método, pero ejecutado en diferentes momentos por diversos analistas empleando por ejemplo diferentes lotes o reactivos.

Se recomienda para este tipo de estudio realizar al menos 10 determinaciones (óptimo 30) sobre el mismo material de muestra y calcular la media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (S) y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV), donde se toma como criterio que $CV \leq 2\%$ para CLAE y $CV \leq 3\%$ para otros tipos de métodos. [URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Expresión de la precisión de un método analítico:

a) Desviación estándar y coeficiente de variación: Es el valor aceptable de precisión de un método analítico depende del número de repeticiones del análisis y de la concentración del analito.^[19, 50]

$$\text{Media aritmética: } \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (16)$$



Desviación
(17)

estándar:

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

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} 100\%$$

(18)

La relación que existe entre el coeficiente de variación del sistema y el coeficiente de variación del método es aproximadamente la siguiente: $CV_{\text{método}} = CV_{\text{sistema}} \sqrt{2}$

b) Límites de confianza: [Calpena Camphamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Los resultados individuales: media ± desviación estándar multiplicada por la t de student

$$\bar{X} = tS \tag{19}$$

Siendo t el valor de t student tabulada para n-1 grados de libertad y una significación, generalmente, del 95 %.

De los resultados promedio: los límites de confianza de la media de varias respuestas son:

$$\bar{X} = tS_x \tag{20}$$

Siendo S_x la desviación estándar de la media $\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)$

Determinación de la reproducibilidad:

Para evaluar estadísticamente estos resultados se debe desarrollarse:

Parámetros	Analista 1	Analista 2
Media	\bar{X}_1	\bar{X}_2
Desviación estándar	S_1	S_2
número de muestras	n_1	n_2

a) Prueba de significación de Fischer: se utiliza para determinar si hay diferencias contundentes entre los resultados obtenidos para el mismo método para analistas diferentes. Se realizará un ensayo de Fischer con una alternativa bilateral, por lo que se pretende conocer si existe diferencia en varias direcciones. Determinándose:



$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \tag{21}$$

S_1 : Desviación estándar del analista 1.

S_2 : Desviación estándar del analista 2.

El valor crítico de F_{tab} hay que consultarlas en las tablas estadísticas, por lo que se debe buscar el número de muestras para un analista individual. Si $F_{exp} < F_{tab}$ ($F_{n_1-1, n_2-1, p=0,05}$) no existen diferencias significativas entre la precisión alcanzada por los analistas.^[19, 34]

b) Prueba de significación de student: permite determinar si hay diferencias entre las medias.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Cálculo de t: (22)

donde $S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}$ (23)

Si $t_{exp} < t_{tab}$ ($p=0,05$), grados de libertad igual a $(n_1 + n_2 - 2)$ no hay diferencias contundente entre las medias obtenidas.

Si se determina que no hay diferencias significativas, entonces el estimado promedio de los analistas puede ser empleado para calcular los límites de confianza para un 95 % de la media.

Exactitud:

Es el grado de concordancia que existe entre el valor hallado en el análisis con el valor verdadero e indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximo posible al valor real. Si la diferencia entre ellos es pequeña, la exactitud es buena. ^[Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto.

Las desviaciones por exceso pueden ocurrir cuando hay interferencias analíticas y cuando no es adecuada la selectividad del método. Por lo que se debería modificarse el método para hacerlo más efectivo. Las desviaciones por defecto suelen emplearse en métodos analíticos muy laboriosos, con diversas fases, extracciones, purificaciones, etc. que se traducen inevitablemente en una disminución de la recuperación.

Un estudio de exactitud permite establecer el porcentaje de recuperación promedio. Si es bajo el porcentaje se pueden utilizar factores de corrección en los últimos cálculos que compensen la pérdida de analito, producto a las previas manipulaciones, a la medición final ^[50].

Determinación de la exactitud:

Se puede establecer según:

Junier Ávila Guerrero



Análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida:

Análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones conocidas y diferentes.

Método de adición de patrón.

Comparación con otro método analítico ya validado.

Para el análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida (a), se analiza varias veces (6-10) la muestra de concentración conocida de analito patrón además se valora la exactitud expresando los resultados en porcentaje con respecto al teórico (Recuperación) y se efectúa el test de t.^[19, 50]

$$t_{exp} = \frac{|m - \bar{X}|}{S_{\bar{x}}} = \frac{|m - \bar{X}|}{S/\sqrt{n}} = \frac{|m - \bar{X}| \sqrt{n}}{S} \tag{24}$$

Donde:

m: valor verdadero,

\bar{X} : valor medio

n: número de determinaciones

S: desviación estándar

$S_{\bar{x}}$: Desviación estándar de la media

Si ocurre $t_{tab} < t_{exp}$ significa que el método analítico no es exacto por lo que existe un error

sistemático por exceso o defecto, que en valor absoluto es $|m - \bar{X}|$. Si es seleccionado el grado de probabilidad es $p = 0,05$ y para n-1 grados de libertad. [Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Las fórmulas anteriores pueden ser utilizadas también con porcentaje de recuperación, sustituyendo el valor de \bar{X} por el porcentaje de recuperación R, el valor verdadero m por 100 y la desviación estándar S por el coeficiente de variación CV. [Calpena Campnamy, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} \tag{25}$$

Siendo los criterios estadísticos de aceptación:^{1]}

Para el CLAE el por ciento de recobro es de 98-102%.

Para métodos titrimétricos el por ciento de recobro es de 99-101%.

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



Para otros métodos el por ciento de recobro es de 97-103%.

-Intervalo de concentración:

Es el intervalo de concentración de un analito que tiene el método los requisitos de calidad, demostrado experimentalmente. Todos los métodos tienen una sensibilidad limitada que restringe el intervalo de concentración para el cual el método es establecido.

Fundamento teórico de la técnica analítica

Cromatografía Gaseosa [Cela R.,2002; Rubinson,K.A., 2000; Skoog, D.,1994, Yashin, Y.I y col.

2006, BRITISH PHARMACOPEIA, 2004; EUROPEAN PHARMACOPEIA. 2005; USP 30th ed, 2007]

La cromatografía comprende un conjunto importante y diverso de métodos que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. Se pueden separar moléculas en función de sus cargas, tamaños y masas moleculares. También a través de la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc... La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación.

El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación. El detector, situado al final de la columna es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan.

En la actualidad la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (**CLAE**) ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria, como son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, entre otros.

En cromatografía líquida la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla

Aquellos componentes que son fuertemente retenidos, por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Estos resultados se recogen en forma de gráficos llamados *cromatogramas*.

La retención cromatográfica es función de:

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



- La fase móvil.
- La fase estacionaria.
- El analito.

Todas las especies que pueden disolverse pueden separarse eligiendo la combinación adecuada de fase móvil y fase estacionaria.

Los componentes básicos son:

- a) Sistema de suministro de fase móvil: reservorio o varios reservorios para los disolventes. Sirve para desgasificar y eliminar partículas en suspensión de los disolventes que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección.
- b) Sistema de bombeo de la fase móvil: se usan bombas para impulsar a la fase móvil.
- c) Inyector: se encargan de introducir la muestra en la cabeza de la columna de forma reproducible y adecuada.
- d) Precolumnas: se colocan delante de la columna para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno debe ser semejante al de la columna. Aunque el tamaño de partícula es mayor para minimizar la caída de presión. En muchas ocasiones se usan para aumentar la vida de la columna.
- e) Columna: normalmente son de acero inoxidable de diámetro interno uniforme aunque en ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes.

La mayoría de las columnas de cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Generalmente son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 μm .

Los empaquetados más comunes son de partículas de sílice pero también se usa la alúmina, polímeros porosos y resinas de intercambio iónico.

- a) Detectores: existen dos tipos:
 - Los basados en una propiedad de la disolución: Que corresponden a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica, la densidad.
 - Los basados en una propiedad del soluto: Es decir, responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil.



Métodos cromatográficos: [Cela R.,2002; Rubinson,K.A., 2000; Skoog, D.,1994]

- Cromatografía de Reparto:
 - o Cromatografía en fase normal.
 - o Cromatografía en fase reversa.
- Cromatografía iónica.
- Cromatografía de Exclusión.
- Cromatografía de adsorción.

Cromatografía de Reparto:

La cromatografía de reparto es hoy en día el método más utilizado. La cromatografía de reparto se divide en:

Cromatografía en fase reversa: fase estacionaria es apolar, y la fase móvil polar. Las fases estacionarias han sido obtenidas haciendo reaccionar químicamente los centros silanoles activos de la sílice con un trialkilclorosilano. La retención se produce en esta especie de capa líquida depositada químicamente como consecuencia de la distinta solubilidad relativa entre la fase estacionaria (apolar) y la fase móvil (polar). Los compuestos más retenidos son los más apolares. La retención y selectividad se controlan fundamentalmente con la composición de la fase móvil. Para obtener una fase móvil de fuerza de elución óptima, se ensayan mezclas de metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano en agua. Actualmente, el 75% de los análisis con HPLC se realizan en fase reversa. Permite un análisis directo de muestras acuosas y de compuestos solubles en agua o en disolventes relativamente polares (metanol) con peso molecular no superior a 2000 o 3000 ua. Si se compara con la de adsorción, su comportamiento cromatográfico es excelente.

Cromatografía en fase normal: la fase estacionaria es polar y la móvil apolar. Las fases estacionarias se obtienen haciendo reaccionar químicamente los centros silanoles activos de la sílice con un trialkilclorosilano. La retención también tiene lugar en esa especie de capa líquida depositada químicamente, como consecuencia de la distinta solubilidad relativa en la fase estacionaria (polar) y la fase móvil (apolar). Donde el analito menos polar será el primero que se eluye y el más polar el último en eluir.

Cromatografía iónica: usa para separar y determinar especies iónicas. La fase móvil es un líquido acuoso y salino que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta al analito. La elución de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol u otro disolvente orgánico soluble en agua. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico. Se trata de un material polimérico (Ej: poliestireno), que contiene muchos grupos funcionales por molécula y prácticamente insoluble en agua.

Junier Ávila Guerrero

Validación de técnica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia.



Cromatografía de Exclusión por tamaños: también conocida como cromatografía en geles permeables o de filtración en geles. Es una técnica que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. La fase estacionaria está compuesta de partículas de sílice o polímeros en forma de gel, que contienen una red de poros uniformes. La retención está basada en el tamaño de las moléculas. Si las moléculas con más grandes que los poros, no pueden penetrar en ellos (sólo pasan las partículas), y son las primeras que se eluyen. Si las moléculas son más pequeñas que los poros, penetran en ellos recorriendo caminos mucho más largos, y serán las últimas en eluir. Si las moléculas tienen un tamaño intermedio, podrán penetrar en los poros más grandes (camino recorrido intermedio). Por tanto, el tiempo de residencia medio en los poros, depende del tamaño afectivo de las moléculas de los analitos.

Cromatografía de adsorción: se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

Ventajas de CLAE

- Es eficiente, selectiva, ampliamente aplicable.
- Sólo se requiere una muestra pequeña.
- Puede utilizarse sin destruir la muestra.
- Se adapta fácilmente al análisis cuantitativo.
- Puede acomodar muestras no volátiles e inestables térmicamente.
- Es aplicable a iones inorgánicos.

• Aplicaciones de CLAE:

Análisis de fármacos y sus metabolitos, sueros, conservantes de alimentos, mezclas para vitaminas, azúcares, y preparaciones farmacéuticas. En productos de alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos, colorantes, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.



- **Equipamiento:**

- Balanza analítica, *Boeco Germany*, Max- 120g, d = 0.1mg.
- Instrumento de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) Agilent 1100 series, detector UV-Visible λ variable.
- PHmetro modelo RHSJ-4A.

- **Reactivos:**

- Rutina ACROSS.
- Orina suministrado por sujeto sano.
- Metanol, *Scharlau*, calidad analítica.
- Acetonitrilo (ACN), *Scharlau*, calidad analítica.
- Ácido acético (HAc), *UNI-CHEM*, calidad analítica.
- Ácido fosfórico (H_2PO_4), *UNI-CHEM*.
- Agua desionizada.

- **Materiales e Instrumental:**

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio.
- Tubos de ensayos vidrio de 3,5 mL,
- Frascos de vidrio de 10mL con tapa de vidrio.
- Jeringuilla de vidrio spezial de 5 mL Unimetric (Injektionsspritce 100microL , TP5100-71)
- Filtros de membranas, *Millipore 31s*.

1. Determinación de algunos parámetros de desempeño de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

1.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos:

Teniendo en cuenta las técnicas descritas en la bibliografía consultada, se realiza el análisis del comportamiento cromatográfico a una disolución patrón de rutina en metanol a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las condiciones operacionales del instrumento de CLAE son las siguientes [Nuengchamnonng, N., A. 2004, Gattuso, G ,2007; Martínez, A, 2005].



- ✓ Columna cromatográfica columna-RP-18 Agilent Eclipse XDB-C18, diámetro: 5 μm , longitud: 4.6x250 mm.
 - ✓ Flujo: 1 mL/min
 - ✓ Volumen de inyección: 200 μL
 - ✓ Detector UV, 254 nm.
 - ✓ Fase móvil: se emplearon diferentes composiciones de la fase móvil (FM), sin gradiente de concentración;
- FM 1: ACN:HAc 2% en proporción 10:90 [Gattuso, G ,2007; Martínez, A, 2005,]
- FM 2: 1ACN:HAc 2% en proporción 30:70 [Gattuso, G ,2007; Martínez, A, 2005,]
- FM 3: Metanol:H₂PO₄ (2 N) en proporción 55:45 [De Oliveira, B y col.,2003, Apers, S. and Theunis, M., 2008]
- FM 4: Metanol:HAc 2% en proporción 45:55 [Gattuso, G ,2007; Martínez, A, 2005,]

Fase móvil empleadas

1.2. Evaluación de la linealidad:

Para la realización de la curva de calibración por Cromatografía líquida de alta eficacia, se pesó con exactitud, en una balanza analítica, alrededor de 0,1 g de Rutina, que se disolvió en metanol calidad analítica en un matraz aforado de 10 mL, obteniéndose una disolución de concentración 0,01g/mL (Disolución 1). Se tomaron alícuotas de la Disolución 1 (0,5; 0,8; 1,2; 1,5; 1,8 y 2,0 μL), que se llevaron a un matraz aforado de 10 mL, completándose el volumen con metanol, obteniéndose disoluciones de concentración de 5, 8, 12, 15, 18 y 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De los patrones así obtenidos se inyectó un volumen de 20 μL , en el cromatógrafo, empleando la fase móvil de mejores que mejores resultados mostró en el ensayo en el ensayo anterior, con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm. Este ensayo se repitió hasta obtener dos curvas de calibración.

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se calculó el coeficiente de correlación lineal (r), el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f), la desviación estándar relativa de la pendiente [$Sb_{rel}(\%)$], el intervalo de confianza del intercepto (i). Se realizó una prueba de *t de student*, para evaluar la sensibilidad del calibrado, planteándose como hipótesis nula que la pendiente es igual a cero ($b = 0$) y como alternativa ($b \neq 0$).



Criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación lineal: $r \geq 0.99$.
- Pendiente: $b \neq 0$.
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5\%$.
- Desviación estándar relativa de la pendiente: $Sb_{rel}(\%) \leq 2\%$.

Con los datos obtenidos de las dos curvas individuales se determinó el intervalo de confianza de la pendiente y del intercepto para una de ellas con el objetivo de demostrar la similitud entre las mismas, tomando como criterio de semejanza el hecho de que el valor de la pendiente y del intercepto de la curva restante quede incluido en los intervalos hallados para la primera.

1.3. Evaluación de la Precisión:

1.3.1. Repetibilidad.

Se realizaron 6 mediciones a una disolución de concentración 10 $\mu\text{g/mL}$, en condiciones homogéneas. Se calculó el coeficiente de variación (CV) a los 6 resultados.

Criterio de aceptación:

- $CV \leq 1.5\%$.

1.3.2. Reproducibilidad.

Se repitió el experimento anterior, otro día y por un analista diferente. Se calculó el coeficiente de variación (CV) de todos los datos. También se realiza la prueba de *t de student* y *F de Fischer* para comparar los conjuntos de datos en cuanto a media (\bar{X}) y varianza (S).

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de variación: $CV \leq 3\%$.
- Medias: $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$
- Desviación estándar: $S_1^2 = S_2^2$

1.4. Evaluación de la Exactitud:

Se realizan 6 réplicas a 15 $\mu\text{g/mL}$, utilizando una sustancia certificada con una pureza de 97-102 % y comparar el valor medio determinado y el certificado a través de la expresión:



$$\frac{\bar{C}_X}{C_{cert}} = \frac{X}{100\%} \quad (26)$$

donde:

\bar{C}_X : media de las determinaciones experimentales.

C_{cert} : por ciento de pureza de la sustancia certificada.

Y a través de una prueba de hipótesis *t de student* planteado como hipótesis nula que $C_X = C_{cert}$ y como hipótesis alternativa $C_X \neq C_{cert}$

Criterios:

- $X = \pm 2\%$.
- $98\% \leq X \leq 102\%$.
- $C_X = C_{cert}$.

1.5. Determinación de los límites de detección y cuantificación:

Se realizaron los cálculos del límite de detección (LOD) de forma $\bar{X} + 3SD$, según el criterio de la IUPAC [Thompson, 1995 y 1999; ICH, 1995] bajo las siguientes condiciones experimentales óptimas, donde \bar{X} es la altura media de la mínima señal que sea detectable y SD es la desviación estándar. Es el límite de detección que sería, aquella concentración que genera una señal $3SD$ superior a la mínima señal que es detectable.

Además el límite de cuantificación (LOQ) que se realizó el cálculo de la siguiente forma $\bar{X} + 5SD$, según el criterio de la IUPAC [Thompson, 1995A, Eurachem, 1998] bajo las siguientes condiciones experimentales óptimas. El límite de cuantificación sería, aquella concentración que genera una señal $5SD$ superior a la mínima señal que es detectable.

2. Técnica de cuantificación de Rutina en orina humana.

2.1. Preparación de la disolución de Rutina:

Se pesó con exactitud, en una balanza analítica, alrededor de 0,1000 g de Rutina, que se disolvió en metanol calidad analítica en un matraz aforado de 10 mL, obteniéndose una disolución de concentración 0,01g/mL (Disolución 1).

2.2. Preparación de las muestras:



2.2.1. Preparación de las muestras en orina humana:

Se tomaron 10, 12 y 15 μL de la Disolución 1 y se añadieron a matraces aforados de 10 mL, se completó el volumen con orina humana de un sujeto sano, obteniéndose muestras con concentraciones de 10; 12 y 15 $\mu\text{g/mL}$ de rutina, respectivamente. Los matraces se agitaron vigorosamente, de forma manual, durante un minuto para homogeneizar el contenido. Este proceso se repitió 2 veces para cada concentración.

3. Tratamiento estadístico de los resultados.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante los programas MICROSOFT EXCEL 2007 y MICROCAL ORIGIN versión 5.0.



Para el diseño de los ensayos farmacocinéticos y biofarmacéuticos de productos de origen natural y sintético, resulta de gran importancia la clasificación y desarrollo de los métodos analíticos [Cañigüeral, S, 2000 y 2002]. Debido a esto, para elegir un método para la realización de este tipo de estudio, es necesario demostrar que el mismo puede emplearse con buenos resultados y que además, funciona de acuerdo con los requerimientos y demandas en cuanto a fuentes de error, aplicación, su exactitud y uso^[1, 14, 35].

Determinación de algunos parámetros de desempeño de la técnica por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) para la determinación de Rutina.

El espectro de Rutina en metanol, obtenido mediante la técnica espectrofotométrica se muestra en el Anexo 1. Como se puede observar, muestra un máximo a absorción a una longitud de onda cercana a 254 nm.

Establecimiento de los parámetros cromatográficos:

Para la definición de las condiciones cromatográficas se tomaron en cuenta los estudios publicados en múltiples trabajos científicos, sobre la determinación de flavonoides presentes en productos vegetales. Existe coincidencia en que se deben emplear columnas de fase reversa (RP8 y RP18), detección a 254nm, y una fase móvil polar (ACN, metanol) y una solución acuosa ácida a diferentes proporciones, para prevenir la formación de picos asimétricos en el cromatograma^[Gattuso, G. y col.,2000].

Giuseppe Gattuso y col, (2000) recomiendan emplear como fase móvil una mezcla de ACN: HAc 2%, en proporciones que fluctúan entre 10:90 y 30:70. Al realizar las inyecciones de una disolución patrón de Rutina en metanol a una concentración de 60 µg/mL siguiendo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente se observó:

En la condición de FM 1: ACN:HAc 2% en proporción 10:90, cuyo cromatograma se muestra en la Figura 7, los picos salen antes de los 5 min y no están adecuadamente resueltos.

De igual manera se comporta al modificar la composición de la fase móvil ACN:HAC 2% a una proporción 30:70 (Figura 8).

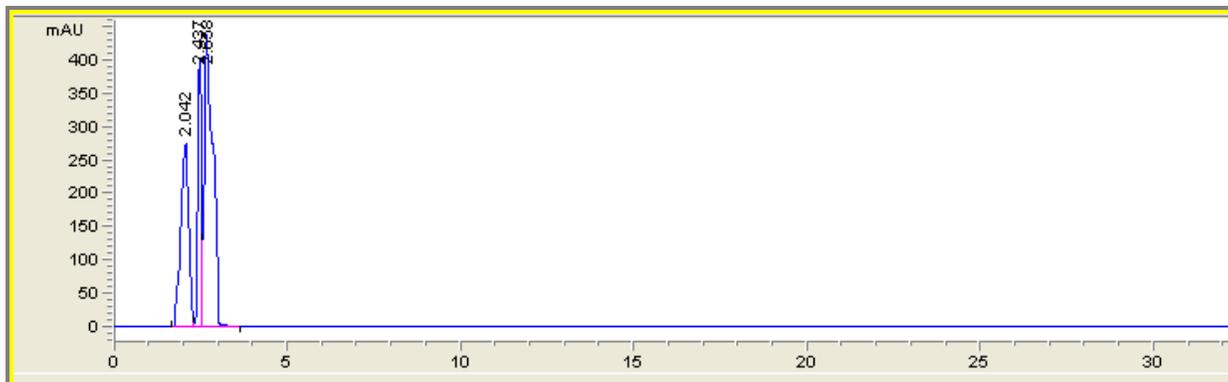


Figura 7: Cromatograma correspondiente a fase móvil ACN:HAc 2% en proporción 10:90

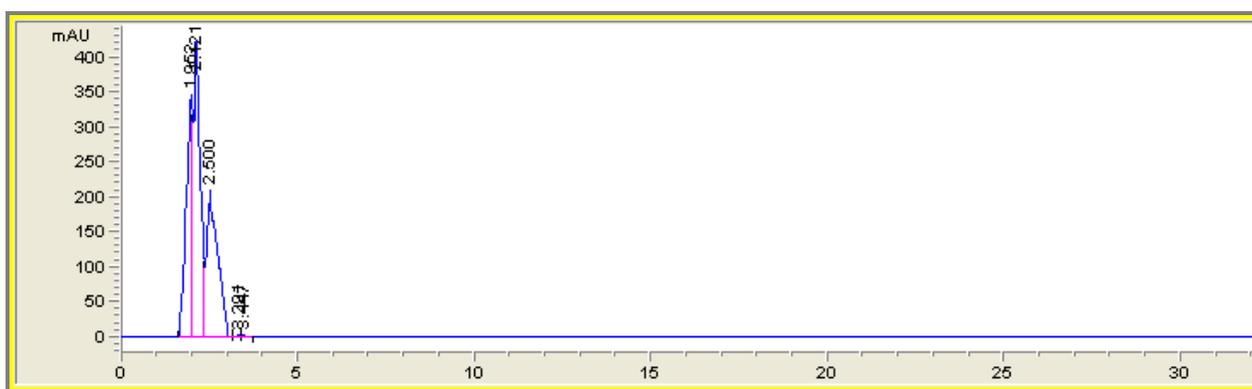


Figura 8: Cromatograma correspondiente a fase móvil ACN:HAc 2% en proporción 30:70.

Posteriormente, empleamos las condiciones recomendadas por **De Oliveira, B y col. (2003)** y **Apers, S. and Theunis, M., 2008** donde la fase móvil está constituida por metanol:H₂PO₄ (2 N) en proporción 55:45 y se observa en el cromatograma (figura 9) que se obtiene un pico de Rutina a 6,795 minutos con buena separación, pero ligeramente asimétrico (se observa una pequeña cola).

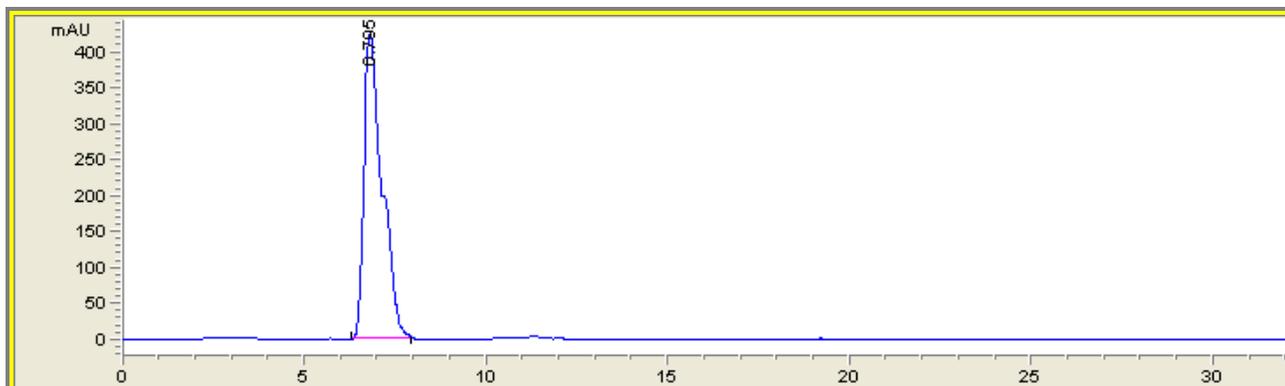




Figura 9: Cromatograma correspondiente a fase móvil Metanol:H₂PO₄ (2 N) en proporción 55:45.

Consideramos emplear metanol con ácido acético al 2%, para utilizar un ácido menos fuerte y una mayor cantidad de solución acuosa^[Gattuso, G. y col.,2000].

Al ensayar la fase móvil compuesta por Metanol:HAc 2% en proporción 45:55, se observa un pico de rutina a 7,104 min con mejor simetría que en el ensayo anterior (Figura X\$), por lo que consideramos que estas condiciones cromatográficas son más adecuadas y son las empleadas para la técnica analítica que se valida.

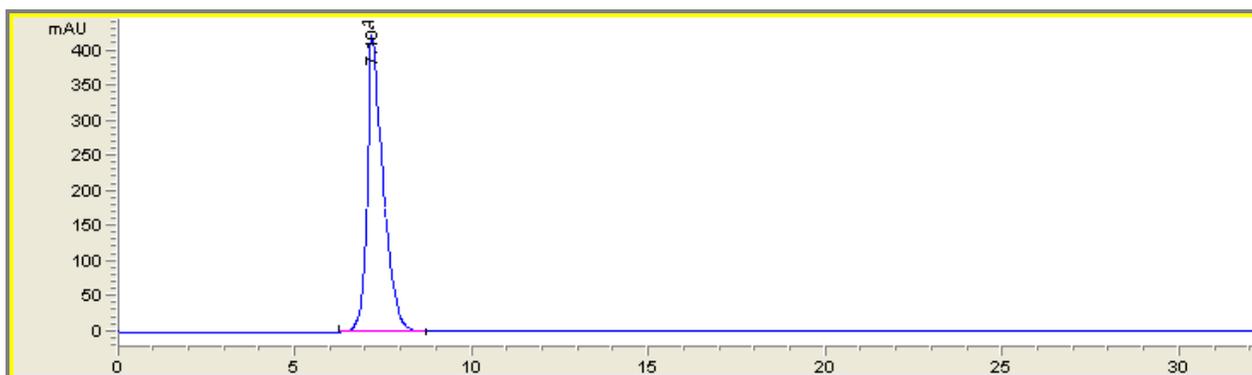


Figura 10: Cromatograma correspondiente a fase móvil Metanol:HAc 2% en proporción 45:55

Estudio de la linealidad

La representación gráfica de la curva de calibración de Rutina por el método de CLAE, a las condiciones establecidas en el estudio previo se muestran en la Figura 11.

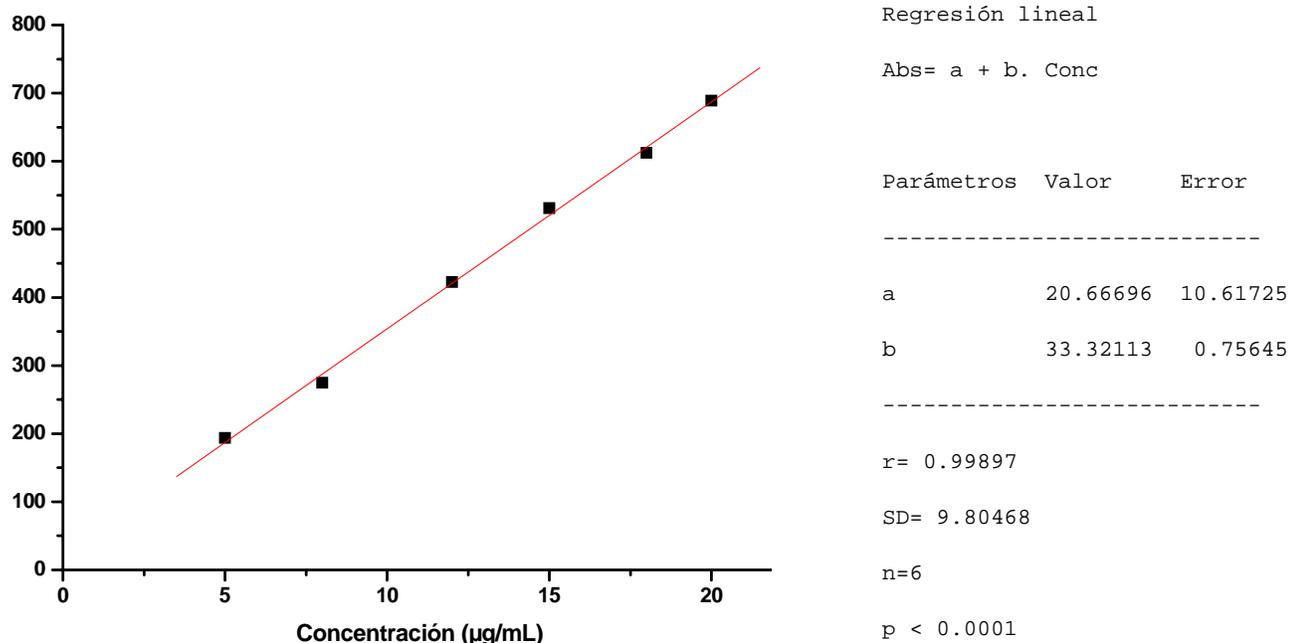


Figura 11: Curva de Calibración para la Rutina por el método CLAE, (FM Metanol:HAc 2% 45:55).

Como se puede observar, existe un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, según expresa el coeficiente de correlación (r) con valor superior a 0,99.

Los valores experimentales que corresponden con las curvas de calibración Rutina se muestran en la Figura 12 y la Tabla 1.

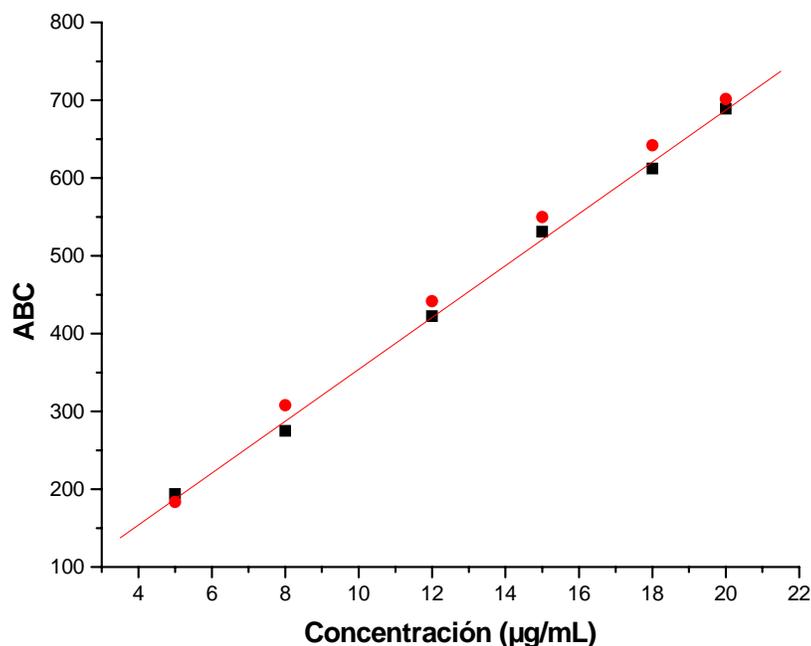


Figura 12: Curva de Calibración de la Rutina por el método CLAE, (FM Metanol:HAc 2% 45:55).

Tabla 1: Valores experimentales obtenidos para las curvas de calibración de Rutina por el método CLAE. Fase móvil Metanol:HAc (45:55%)

X Conc (µg/mL)	Y ABC	f=Y/X (Factor de respuesta)
5	193,8	0.0258
5	183,5	0.0272
8	274,8	0.0291
8	307,7	0.0260
12	422,45	0.0284
12	441,45	0.0272
15	531,00	0.0282
15	549,75	0.0273
18	612,1	0.0294



18	642,1	0.0280
20	688,9	0.0290
20	701,4	0.0285

La evaluación de la linealidad incluyó la determinación del coeficiente de correlación lineal, el coeficiente de variación de los factores de respuesta, la desviación estándar relativa de la pendiente, la sensibilidad del calibrado y el intervalo de confianza del término independiente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Los parámetros de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación correspondiente, según se expone en la Tabla 2, lo que indica que esta técnica de determinación de Rutina patrón, por Cromatografía líquida de alta eficacia es **lineal y sensible** para el rango de concentraciones comprendidas entre 5 µg/mL y 20 µg/mL.

Tabla 2: Parámetros de la recta de regresión de Rutina. Método CLAE, Fase móvil Metanol:HAc (45:55%)

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Número de datos (<i>n</i>)	12	-
Intervalo de linealidad (µg/mL)	5-20	-
Coeficiente de correlación (<i>r</i>)	0,9990	$r \geq 0,99$
Pendiente (<i>b</i>)	33,84	-
Desviación estándar relativa de pendiente (Sb_{rel} (%)).	1,54	$Sb_{rel} \leq 2,00 \%$
Ordenada en el origen (<i>a</i>)	22,51	-
Intervalo de confianza de <i>a</i>	$18,72 \leq a \leq 26,30$	que contenga el cero
Coeficiente de variación de los factor respuesta (CV_f (%)).	4,20	$CV_f \leq 5 \%$
Test estadístico de <i>b</i> ($t_{tab. 10, p=0,05}$)	65,09	$t_{exp} \geq 0,519$



Curva 1

Límites de confianza de la pendiente: $33,13 \leq b \leq 33,51$

Límites de confianza del intercepto: $18,81 \leq a \leq 22,53$

Ecuación de la Curva 2: $Abs = 20,67 + 33,32 \cdot Conc$

Curva 2

Límites de confianza de la pendiente: $34,03 \leq b \leq 34,67$

Límites de confianza del intercepto: $21,18 \leq a \leq 27,53$

Ecuación de la Curva 2: $Abs = 24,35 + 34,35 \cdot Conc$

Estudios de la Precisión:

a. Repetibilidad.

Se cuantificó que la concentración media (\bar{X}) de Rutina presente en las 6 muestras es igual 10,12 $\mu\text{g/mL}$ con una desviación estándar igual a 0,031.

Analizando los resultados anteriores puede apreciarse que el valor del coeficiente de variación ($CV = 0,51\%$) es menor que el valor máximo aceptado para este tipo de estudio ($CV \leq 1,5\%$), comprobándose de esta forma que el método analítico es Repetible^[URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA., 2007]

b. Reproducibilidad.

Para la determinación de este parámetro se utilizaron los datos obtenidos anteriormente comparados con los obtenidos por otro analista un día después, que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros del ensayo de reproducibilidad para la Rutina. Método CLAE, Fase móvil Metanol:HAc (45:55%)

Parámetros	Analista 1	Analista 2
Media ($\mu\text{g/mL}$)	10,15	10,11
Número de muestras	6	6
Desviación estándar	0,031	0,064
Coefficiente de variación	0,51	0,36



Posteriormente, se analizó la influencia de diferentes factores (día y analista) sobre la reproducibilidad del método, obteniéndose que la media (\bar{X}) de los datos fue 10,09 $\mu\text{g/mL}$, con una desviación estándar (SD) igual a 0,119 y un coeficiente de variación (CV) igual a 0,445 que cumple con los criterios de aceptación ($CV \leq 3\%$). Por ello consideramos que el método es Reproducible.^[URACHEM, G, 1998; NORMA CUBANA.,2007]

Además, para esta técnica se tuvieron en cuenta los criterios aportados por la prueba de significación de Fischer (F), y la prueba de significación de student (t).

- Prueba de significación de F :

$F_{exp} = 0,2259$; $F_{tab} = 5,05$ (5,5;0,05) se cumple el criterio de aceptación donde $F_{exp} < F_{tab}$ por lo que no existen diferencias significativas entre las desviaciones estándar obtenidas por los analistas

- Prueba de significación de t :

$t_{exp} = -3,22$ y $t_{tab(10; 0,05)} = 2,228$ se cumple el criterio de aceptación donde $t_{exp} < t_{tab}$ por lo que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas por los analistas.

Los resultados demuestran que la técnica analítica es **Precisa**.

Estudio de la Exactitud.

Después de evaluar estadísticamente los resultados de las réplicas realizadas se obtuvo:

Según la ecuación 26, que define los límites de exactitud:

$$\bar{C}_x = 15,04 \mu\text{g/mL}.$$

$$\bar{C}_{cert} = 14,925 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{si } \frac{\bar{C}_x}{100} = \frac{\bar{C}_{cert}}{X}, \text{ entonces } X = \frac{\bar{C}_{cert}}{\bar{C}_x} \cdot 100, \text{ por lo que } X = 99,17 \%$$

Este valor se encuentra dentro del intervalo 97 – 103 % reportado para este parámetro.



Determinación de los límites de detección y cuantificación:

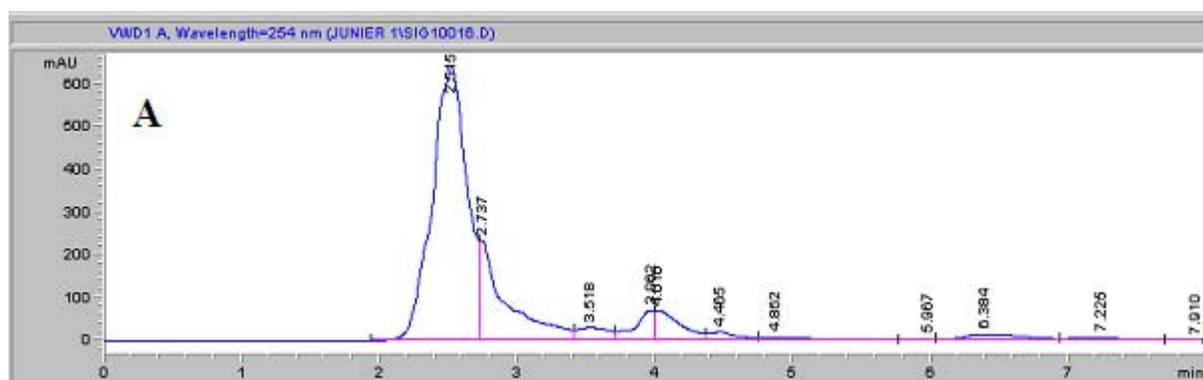
Los límites de detección y cuantificación de Rutina por CLAE bajo las condiciones especificadas son:

Límite de detección: $LOD = \bar{X} + 3SD$	0,9065 µg/mL
Límite de cuantificación: $LOQ = \bar{X} + 5SD$	1,0220 µg/mL

Técnica de cuantificación de Rutina en orina humana:

Las muestras de Rutina se preparan a 3 niveles de concentración empleando orina humana de un sujeto sano, tal y como se describen en el epígrafe 2.1 del capítulo Materiales y métodos. Después de un proceso de agitación se filtran las muestras y se inyectan al cromatógrafo líquido y se analizan bajo las condiciones cromatográficas establecidas previamente.

En la Figura 14 A aparece el cromatograma obtenido para una de las muestras de Rutina en orina humana. Si se compara con el cromatograma correspondiente a la orina humana sin contaminar Figura 14 B, se observa que al tiempo de retención de la Rutina aparece un pico que, aunque cuantificable, se corresponde con una concentración inferior a la teórica. Además, aparece de un segundo pico de identidad desconocida a tiempo de retención superior.



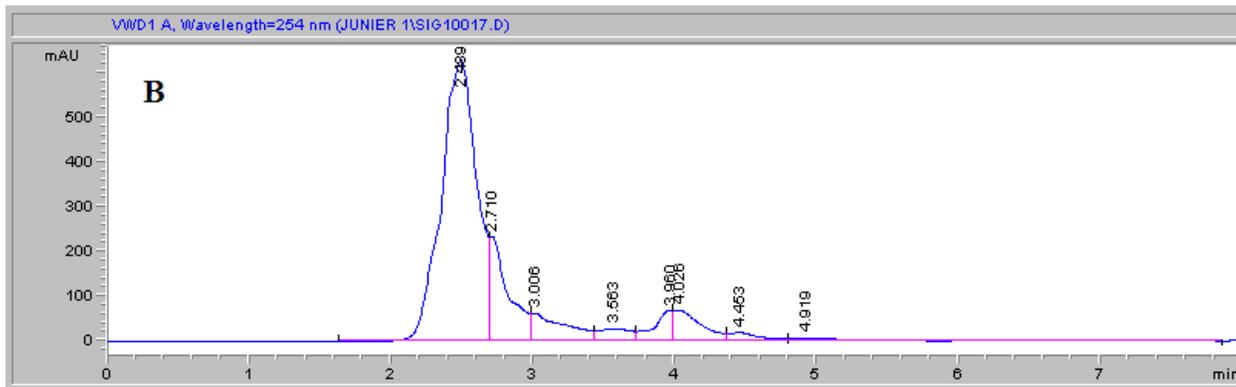


Figura 14 Cromatograma correspondiente las muestras de orina. Método CLAE fase móvil Metanol:HAc 2% (45:55). A: Orina contaminada con Rutina (concentración 5 $\mu\text{g/mL}$), B: Orina sin contaminar.

Al cuantificar la Rutina en las muestras de orina contaminada encontramos que la concentración calculada no se corresponde con la concentración teórica de 10, 12 y 15 $\mu\text{g/mL}$, (Figura 15). Es conocido que el enlace glicosídico de los flavonoides puede ser hidrolizado en condiciones de pH y la susceptibilidad al metabolismo en medios biológicos [Martínez-Flórez, S. y col.2002; Martínez-Valverde, I. y col.,2000, Fennet, D.R.,2003; Miao-Ying, L y col., 2003, Carrasco Jiménez, M.S., 2002; Doménech, J., 1997], por lo que este pico puede corresponder a un metabolito o producto de degradación del principio activo.

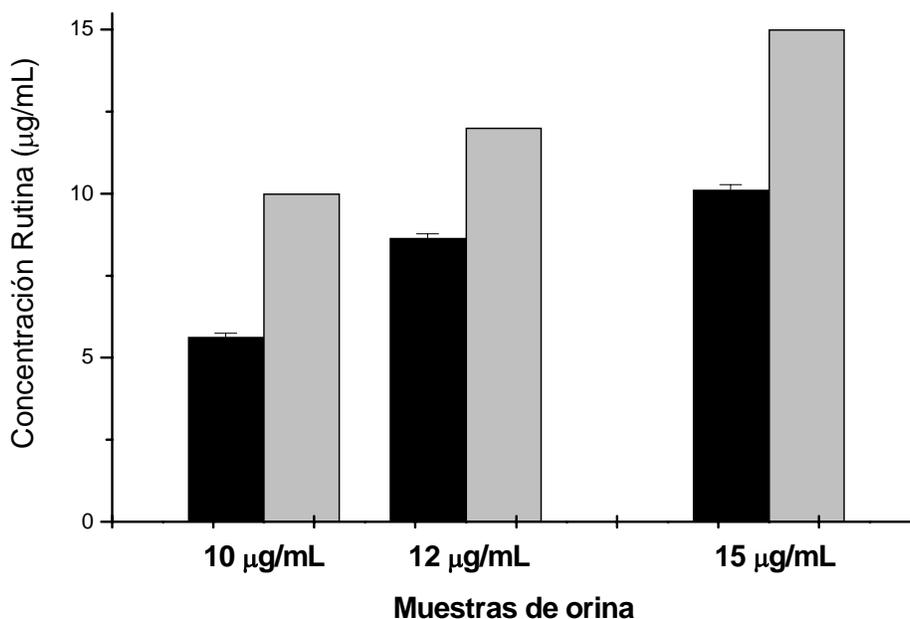


Figura 15: Cuantificación de las muestras de orina humana con adición de Rutina.



■ Orina □ Teórica

El objetivo de analizar estas muestras es valorar el desempeño del método en el análisis de muestras de Rutina para estudios farmacocinéticos y Biofarmacéuticos, lo cual se consigue.



1. La técnica analítica de cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia es lineal, sensible y precisa.
2. La técnica de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia ofrece la posibilidad de continuar el trabajo analítico para estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos.



- Continuar los estudios analíticos para la cuantificación de Rutina por cromatografía líquida de alta eficacia con vistas a desarrollar estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos.



Espectro Ultravioleta-Visible de Rutina y Quercetina.

