



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

Facultad Química - Farmacia

Trabajo de Diploma

Título: Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de G-1 en plasma humano.

Autor: Dairemis Estevez González

Tutores: Dr. Sergio Morales Fernández

Lic. Amalia María Calvo Alonso

**Año de la Revolución Energética en Cuba
Curso académico 2005 – 2006**



Resumen

Se empleó la metodología de Dispersión en Matriz Sólida (MSPD) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la cuantificación de G-1 en muestras de plasma humano.

Se realizaron estudios cualitativos por Cromatografía de Capa Delgada (CCD) y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) que demostraron poca estabilidad del G-1 en la matriz plasma humano. Se desarrolló una metodología aplicando la MSPD que permitió obtener un polvo seco y fluido para rellenar los cartuchos. Para la eliminación de interferencias se lavaron los cartuchos con diferentes disoluciones obteniendo buenos resultados con agua.

El empleo de una co-columna de sílica gel no brindó resultados satisfactorios, ya que se necesitan otras condiciones no aplicadas en el trabajo.

La técnica de cuantificación de G-1 por HPLC empleando MSPD resultó ser lineal en el rango de concentración de 1,2 mg/L a 90 mg/L, sensible y selectiva. La exactitud y la precisión no resultaron adecuadas debido a la poca estabilidad del G-1 en plasma humano.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Generalidades de la molécula de G-1.....	3
1.2 Actividad biológica y toxicidad del G-1.....	3
1.3 Solubilidad y estabilidad del G-1.....	4
1.4 Componentes del plasma sanguíneo.....	5
1.5 Evolución de los fármacos en el organismo (LADME).....	6
1.6 Respuesta farmacológica.....	7
1.7 Estudios farmacocinéticos.....	7
1.8 Análisis compartimental.....	8
1.8.1 Modelo monocompartmental.....	9
1.8.2 Modelo bicompartmental.....	9
1.9 Parámetros farmacocinéticos compartimentales.....	10
1.9.1 Volumen de distribución aparente.....	10
1.9.2 Constantes de velocidad.....	11
1.9.3 Aclaramiento.....	11
1.9.4 Tiempo de vida media ($t_{1/2}$).....	11
1.9.5 Área bajo la curva (ABC).....	12
1.10 Análisis no compartimental.....	12
1.11 Parámetros farmacocinéticos no compartimentales.....	12
1.11.1 Tiempo de residencia media (MRT).....	12
1.11.2 Área bajo la curva (AUC_0^∞) o momento 0.....	12
1.11.3 Área bajo la curva en el momento estadístico ($AUMC_0^\infty$) o momento 1.....	12
1.12 Determinación de los parámetros de desempeño del método analítico.....	12
1.12.1 Curva patrón.....	13
1.12.2 Linealidad.....	14
a) Coeficiente de correlación (r).....	14
b) Ensayos de linealidad.....	15
c) Ensayo de proporcionalidad.....	16

1.12.3. Sensibilidad de calibrado.....	17
1.12.4. Límite de detección y límite de cuantificación.....	18
1.12.5. Precisión.....	19
a) Desviación estándar y coeficiente de correlación.....	20
b) Límites de confianza.....	21
1.12.6. Exactitud.....	22
1.12.7. Selectividad.....	22
1.13. Fundamento teórico de la técnica de Dispersión en Matriz Sólida (MSPD).....	23
1.14. Generalidades de cromatografía.....	25
1.14.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	26
1.14.1.1. Cromatografía líquida en fase reversa.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Equipamiento.....	29
2.2. Reactivos.....	29
2.3. Materiales e Instrumental.....	30
2.4. Técnicas.....	30
2.4.1. Cromatografía de Capa Delgada (CCD).....	30
2.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	30
2.5. Estudio de estabilidad de G-1 en plasma.....	31
2.5.1. Por Cromatografía de Capa Delgada (CCD).....	31
2.5.2. Por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	31
2.6. Estudio de proporción de mezcla G-1-plasma / adsorbente para la confección de los cartuchos.....	31
2.7. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho).....	32
2.8. Estudio de unión de G-1 a proteínas plasmáticas.....	32
2.9. Determinación del volumen de elusión.....	33
2.10. Uso de una co-columna.....	33
2.11. Validación.....	33
2.11.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	33
2.11.2. Linealidad.....	34
2.11.3. Precisión (repetibilidad).....	34

2.11.4. Exactitud.....	34
2.11.5. Selectividad.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Aspectos generales.....	36
3.2. Estabilidad de G-1 en plasma humano.....	37
3.2.1. Estudio por Cromatografía de Capa Delgada (CCD).....	37
3.2.2. Estudio por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	38
3.3. Estudio de la proporción de mezcla plasma-G-1 / adsorbente para la confección de los cartuchos.....	41
3.4. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho).....	42
3.5. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmática.....	44
3.6. Determinación del volumen de elusión.....	44
3.7. Uso de una co-columna.....	45
3.8. Validación.....	46
3.8.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	46
3.8.2. Linealidad.....	46
3.8.3. Precisión (repetibilidad).....	48
3.8.4. Exactitud.....	49
3.8.5. Selectividad.....	49
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS	

Introducción

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, conocido como G-1 es un ingrediente farmacéutico activo sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas. Este producto posee una potente actividad bactericida- fungicida de amplio espectro, demostrada frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, hongos y levaduras, por lo que constituye un reto hoy día formular un medicamento para uso sistémico con acción antimicrobiana a partir del mismo.

Para el registro de un medicamento es requisito indispensable, entre otros, la realización de ensayos que definan las propiedades y parámetros farmacocinéticos que caractericen la absorción, biodistribución, metabolismo y excreción del fármaco, así como la cantidad y posibilidad para llegar al sitio de acción y de esta forma garantizar su efecto farmacológico.

Las matrices biológicas como la sangre, plasma, suero o tejidos son generalmente muy complejas en cuanto a su composición y, en la mayoría de los casos, contienen a los analitos de interés a concentraciones muy bajas además de que pueden presentar interferencias que entorpecen el posterior análisis. Por estas razones, cuando se trabaja con este tipo de muestras, a la determinación analítica frecuentemente le antecede procesos de extracción.

El procedimiento tradicional de extracción desde muestras biológicas como la sangre, suero o plasma tiene una serie de desventajas que son superadas por un nuevo método denominado "Dispersión en Matriz Sólida" (MSPD), con el cual se consigue poca manipulación de la muestra que puede traer consigo pérdidas de analito gracias a que permite ejecutarse en pocos pasos, además requiere volúmenes bajos de disolventes y por tanto se obtienen disoluciones más concentradas del analito y con menos interferencias para el análisis.

Los métodos de cuantificación más empleados para este tipo de estudio son los cromatográficos por las ventajas que ofrecen. 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.

En consecuencia, los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General:

Disponer de una técnica analítica validada en la que se emplee la Dispersión en Matriz Sólida (MSPD) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la determinación de G-1 en plasma humano.

Objetivos Específicos:

- Aplicar la metodología de Dispersión en Matriz Sólida para la extracción de G-1 en muestras de plasma humano.
- Desarrollo de una técnica analítica aplicando la metodología de Dispersión en Matriz Sólida para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano.
- Validar la técnica de extracción mediante Dispersión en Matriz Sólida y determinación de G-1 por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en plasma humano.

2.1. Equipamiento:

- Balanza analítica Sartorius BP121S, máx. 120 g, d = 0,1 mg.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC) Knauer con detector UV, λ - variable y columna Supelco de 15 cm x 4,6 mm, 5 μ m C-18, lazo de 10 μ L.
- Estufa HS62A regulada a 70 °C.

2.2. Reactivos:

- G-1 muestra de referencia, lote 03-3-34 (Anexo 1) y G-1 lote 03-3-13 (Anexo 2). Suministrados por el Laboratorio de Control de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas.
- Sílica gel. Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,04 mm, Merck.
- Fase estacionaria C-8 (encapad). Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,035 mm, Fluka.
- Acetonitrilo para HPLC, Panreac.
- Agua destilada y desionizada.
- n-hexano para cromatografía, Merck.
- Cloruro de sodio p.a, BDH.
- Tetracloruro de carbono p.a, Panreac.
- Cloroformo p.a, Fluka.
- Ácido clorhídrico fumante 37 % p.a, Quinsa.
- Plasma humano. Suministrado por el Banco de Sangre Provincial de Villa Clara (Anexo 3).
- Metanol p.a, Panreac.
- Ninhidrina p.a, Merck.
- Ácido fórmico p.a, BDH.
- Etanol clase A.

- Muestras de 5-bromofurfural y monobromado obtenidos en el Laboratorio de Síntesis del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas.

2.3. Materiales e Instrumental:

- Mortero de ágata, 6 cm de diámetro con pistilo de ágata.
- Placas de sílica gel IB2 de 20 cm x 20 cm, Baker-flex.
- Placas de sílica gel 60 de 5 cm x 20 cm, Merck.
- Placas fluorescentes de sílica gel 60, F254, Merck.
- Jeringuillas plásticas de 10,0 mL.
- Viales plásticos tipo eppendorf con tapa, de 1,5 mL.
- Micropipetas de 10 μ L.
- Cámara de yodo para revelar en Cromatografía de Capa Delgada (CCD).
- Atomizador para revelar en CCD con ninhidrina.
- Cámara cromatográfica de 3 cm x 8 cm x 8 cm y 7,5 cm x 27,5 cm x 24,5 cm.
- Matraces y pipetas verificadas.
- Micropipeta Eppendorf de 20 μ L - 200 μ L.

2.4. Técnicas:

2.4.1. Cromatografía de Capa Delgada (CCD).

Fase estacionaria: Placas de sílica gel de 20 cm x 20 cm y de 5 cm x 20 cm.

Fase móvil: tetracloruro de carbono / cloroformo (10:1).

Revelador: cámara de yodo y ninhidrina al 2 % en etanol.

2.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Columna Supelco RP C-18 de 15 cm x 4,6 mm, 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo / agua (80:20).

Flujo: 0,3 mL/min.

Longitud de onda de detección: 380 nm.

Volumen de inyección: 10 µL.

2.5. Estudio de estabilidad de G-1 en plasma humano:

2.5.1. Por Cromatografía de Capa Delgada (CCD).

Se mezclaron 0,5 mL de plasma con 0,5 mL de disolución de G-1 en acetonitrilo / agua (20:80) a 200 mg/L y se conservó en frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente.

Se analizó por CCD, empleando cámara de yodo como revelador, cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos el resto del tiempo, hasta tres horas. Se utilizaron placas de sílica gel de 3 cm x 7 cm en las cuales se aplicó un volumen de 10 µL de la mezcla. En cada placa se aplicó la disolución de G-1.

2.5.2. Por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Se mezclaron 8 mL de plasma y 8 mL de disolución de G-1 en acetonitrilo / agua (50:50) a 1000 mg/L, la mezcla se conservó en frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente.

Se tomaron muestras sucesivas de 1 mL a tiempo cero; 15 y 30 minutos; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 22,5 y 49,5 horas, las cuales se colocaron en tubos de ensayo.

A cada tubo se le añadió 3 mL de acetonitrilo para precipitar las proteínas, se agitó y de la disolución sobrenadante se extrajo un volumen conocido que se analizó por HPLC.

Se preparó una disolución de referencia de 5-bromofurfural y monobromado a una concentración de 50 mg/L cada una. Se añadió 1 mL de la disolución de 5-bromofurfural a la muestra tomada a las 5,5 horas y 1 mL de la disolución de monobromado a la tomada a las 22,5 horas.

2.6. Estudio de la proporción de mezcla plasma-G-1 / adsorbente para la confección de los cartuchos:

Con el objetivo de estudiar la proporción de la mezcla muestra líquida – adsorbente que condujera a la obtención de un polvo con adecuada fluidez para rellenar el cartucho de Dispersión en Matriz Sólida (MSPD), se preparó una disolución de G-1 en acetonitrilo / agua (50:50) a 200 mg/L y se probó mezclar diferentes volúmenes de

ambos componentes. Se ensayó tanto con sílica gel (fase normal) como sílica gel modificada C-8 (fase reversa).

También se empleó sílica gel (fase normal) y C-8 (fase reversa) en la mezcla con diferentes volúmenes de plasma al que se había adicionado una concentración conocida de G-1.

Las mezclas se realizaron en un mortero de ágata con pistilo y se vertieron en jeringuillas plásticas de 10 mL, lo cual constituyó el cartucho empleado para la determinación mediante MSPD.

2.7. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho):

Una vez conformado el cartucho de MSPD que contiene a la muestra de plasma dispersa en el material adsorbente (sílica gel o fase C-8), se estudió el proceso de lavado del mismo con diferentes disoluciones con vistas a eliminar selectivamente posibles interferencias, fundamentalmente proteínas plasmáticas. Las disoluciones de lavado ensayadas fueron:

- Cloruro de sodio 1 mol/L.
- Agua / metanol (80:20) y (95:5).
- Ácido fórmico 0,1 % y 0,05 %.
- Ácido clorhídrico 0,05 % y 0,005 %.
- Agua destilada.

En cada caso se lavó dos veces con volúmenes de 4 mL y se fue colectando cada mililitro de la disolución de lavado en viales plásticos con tapa, de 1,5 mL que se sometieron posteriormente a análisis por CCD, se reveló con cámara de yodo para determinar pérdidas de G-1 por el proceso de limpieza y con disolución de ninhidrina al 2% en etanol para confirmar la posible eliminación de proteínas plasmáticas de la muestra.

2.8. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmáticas:

Con vistas a determinar posible pérdidas de G-1 que de estar unido a proteínas plasmáticas pudiera ser arrastrado durante el proceso de lavado, se procedió de la siguiente manera: los primeros 4 mL del lavado del cartucho se colectaron en tubos

de ensayo por separado, se les añadió 3 mL de acetonitrilo en cada caso, se agitó y del sobrenadante se extrajo una porción que se analizó por HPLC. La presencia de G-1 en la disolución de lavado sería una evidencia de su unión a proteínas plasmáticas.

2.9. Determinación del volumen de elusión:

Una vez lavado el cartucho se procedió a eluir el G-1 retenido en el mismo. Se eluyó con acetonitrilo y se colectó por separado cada mililitro de eluato en viales plásticos con tapa de 1,5 mL. El contenido de cada vial fue analizado por HPLC para determinar el mínimo volumen de acetonitrilo necesario para eluir cuantitativamente al G-1 desde el cartucho.

2.10. Uso de una co-columna:

Antes de introducir en la columna la muestra dispersa, se rellenó la parte inferior de la jeringuilla con 1 g de sílica gel, lo que funciona como una co-columna y que tiene el objetivo de retener selectivamente a las sustancias interferentes lo que permitiría omitir el proceso de lavado del cartucho antes de la elusión.

Se ensayó la elusión con acetonitrilo y con n-hexano, utilizando en cada caso un volumen de 7 mL.

Para confirmar la retención selectiva en la sílica gel de las principales interferencias (proteínas plasmáticas), se recogieron porciones de los mililitros 1; 3 y 5 del eluato, se analizaron por CCD y se reveló con ninhidrina al 2 % en etanol. La ausencia de manchas violetas en el cromatograma indicaría retención de las proteínas en la co-columna.

2.11. Validación:

2.11.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)).

Se preparó un blanco con la misma composición de las muestras estudiadas excepto en lo referente a la adición de G-1 y se siguieron todos los pasos en la confección, lavado y elusión del cartucho.

Se realizaron tres inyecciones de este blanco por HPLC y se integraron los picos.

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se procedió según:

$$C_L = \frac{\bar{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b}$$

Donde:

C_L = límite de detección o cuantificación.

K = constante ≥ 3 ($K = 3$ para límite de detección y $K = 10$ para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

\bar{y}_{bl} = media de la respuesta de los n blancos.

2.11.2. Linealidad.

Se realizó una curva de calibración en un rango de concentraciones comprendidas entre 1,2 mg/L y 90 mg/L con valores intermedios de 1,6; 2; 2,4; 2,8; 30; 50 y 70 mg/L.

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se determinó la ecuación de la recta, 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 [$S_{b_{rel}}$ (%)] y el intervalo de confianza del intercepto (i). Se realizó también una prueba de t de Student para evaluar la sensibilidad del calibrado.

2.11.3. Precisión (repetibilidad).

Se siguió el mismo procedimiento para la preparación, lavado y elusión del cartucho para una muestra preparada de la siguiente forma: 0,5 mL de plasma al que se adiciona una disolución de G-1 en acetonitrilo / agua de concentración 1000 mg/L de modo que la concentración final de G-1 en la muestra es 50 mg/L.

Se realizaron 5 réplicas, el eluato se analizó por HPLC y se determinó la concentración media de G-1, la desviación estándar y coeficiente de variación.

2.11.4. Exactitud.

Se calculó el por ciento de recuperación para una muestra de plasma humano, a la que se adicionó G-1 muestra de referencia a una concentración de 50 mg/L y se analizó por el mismo método de HPLC.

2.11.5. Selectividad.

Se compararon los resultados analíticos de una disolución de G-1, muestra de referencia, con los de las muestras degradadas analizadas durante el estudio de estabilidad de G-1 en plasma por HPLC.

3.1. Aspectos generales:

Para los análisis efectuados por CCD se emplearon como reveladores la cámara de yodo para detectar la mancha correspondiente al G-1, y la disolución ninhidrina al 2 % en etanol, para confirmar la presencia o no de proteínas en las disoluciones de lavado del cartucho de MSPD, durante la etapa de eliminación de interferencias.

Aunque la mancha de G-1 ($R_f = 0,6$) [Muro, D.; Morales, S. & Bravo, L., 1993] puede ser observada a simple vista si se utilizan placas de sílica gel, con o sin fluorescencia, debido a su color amarillo (Figura 6), el yodo como revelador contribuye a elevar la sensibilidad de la detección, lo cual es muy importante en este caso al tratarse de muestras en las que se espera que la concentración de G-1 sea muy baja. El límite de detección reportado para el G-1 en estas condiciones es de $0,08 \mu\text{g}$. [Pérez, M., 1998-1999]



Figura 6: Cromatograma de G-1 (acetonitrilo / agua 50:50, 1000 mg/L); fase móvil tetracloruro de carbono / cloroformo (10:1).

La ninhidrina se empleó para determinar la presencia o no de proteínas, principal interferencia en los análisis de muestras de plasma, basándose en el hecho de que la misma reacciona con estas biomoléculas originando una coloración violeta (mientras más intensa sea la coloración es indicativo de una mayor concentración de proteínas). El ensayo requiere de la aplicación de calor por unos minutos. [http://www.monografias.com]

En el caso de los análisis por HPLC con detección Ultravioleta -Visible, se empleó una longitud de onda de detección de 380 nm, que difiere de la utilizada en trabajos anteriores (254 nm) con el fin de controlar la calidad de lotes de G-1, materia prima,

en los que también es necesario cuantificar ciertas impurezas en un mismo análisis [Laboratorio de C. Calidad, CBQ, 2005]

En este caso se trata de determinar el G-1 en muestras en las que se encuentra a muy bajas concentraciones por lo que se escoge la longitud de onda donde el coeficiente de extinción molar es máximo (ver figura 7), es decir, 380 nm para obtener una mayor sensibilidad en la detección.

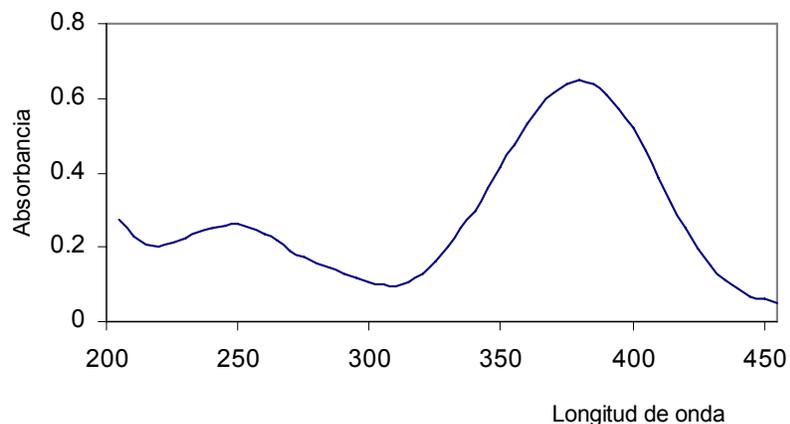


Figura 7: Espectro ultravioleta-visible de G-1 en acetoneitrilo / agua (80:20).

El G-1 es un producto muy difícilmente soluble en agua y muy soluble en acetoneitrilo [Jorge, E., Jiménez, I., Calvo, A. & col., 1991] por ello, para la preparación de las disoluciones de G-1 a mezclar con el plasma fue necesario utilizar pequeños volúmenes de acetoneitrilo como co-solvente. El volumen de acetoneitrilo utilizado en cada caso fue el mínimo necesario para garantizar solubilizar completamente al G-1 en agua.

3.2. Estabilidad de G-1 en plasma humano:

El estudio de la estabilidad de un analito en la matriz que lo contiene es un requisito básico para poder evaluar e interpretar correctamente los parámetros de desempeño de una técnica analítica. En base a trabajos previos se conoce que el G-1 tiene limitada estabilidad en medios con alto contenido de agua, como lo es el plasma humano, por lo que se efectuó un estudio, seguido por CCD y HPLC, de la estabilidad del producto mezclado con plasma.

3.2.1. Estudio por Cromatografía de Capa Delgada (CCD).

En el análisis a tiempo cero se observó una mancha con el mismo Rf y color del G-1, sustancia de referencia, cromatografiado junto a la muestra. A partir de los 15

minutos y hasta transcurrida la primera hora, la mancha correspondiente al G-1 fue disminuyendo en intensidad, de forma tal que a la hora y media desapareció completamente, lo cual evidencia que a partir de ese momento la concentración de G-1 presente es inferior al límite de detección de la técnica.

Este resultado coincide con lo obtenido en trabajos previos [Molina, R. & Rosado, A., 1994; Ramírez, A. & González, MM., 1995;] donde se ha estudiado la estabilidad del G-1 en agua. El plasma sanguíneo contiene aproximadamente un 96 % de agua, con lo cual resulta lógico este resultado. [<http://enciclopedia.us.es>]

3.2.2. Estudio por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Este estudio de estabilidad también se evaluó empleando HPLC, en busca de mayor información acerca del proceso de degradación, sobre la base del perfil de los cromatogramas obtenidos a lo largo del estudio, desde el punto de vista cualitativo. La presencia de nuevos picos en los cromatogramas, la desaparición de otros o variaciones en las áreas correspondientes puede aportar elementos sobre el proceso de degradación del G-1 en plasma humano.

Todas las muestras fueron sometidas a un proceso de desproteización con acetonitrilo previo a su inyección en el instrumento de HPLC, con vistas a proteger la columna. [<http://www.monografias.com>; <http://html.rincondelvago.com>].

En la figura 8 se muestra un cromatograma del lote de G-1 empleado en el estudio cuando fue analizado por el Laboratorio de Control de la Calidad del CBQ; en él se observa un sólo pico con tiempo de retención (tr) igual a 9,892 minutos, correspondiente al G-1.

En la evaluación de las muestras de G-1 en plasma humano desde el primer análisis (t = 0) se observan, además del pico de G-1, otros a tiempos de retención 5,617; 5,767; 6,867; 8,217 y 9,583 minutos y disminución del área del pico de G-1, todo esto indica que la degradación del G-1 comienza de forma inmediata.

Estos picos van aumentando gradualmente de área a medida que disminuye el área del pico de G-1 en el tiempo. El área del pico con tiempo de retención aproximadamente igual a 8 minutos va disminuyendo a medida que el área del pico correspondiente a tiempo de retención aproximadamente igual a 6 minutos va aumentando. A partir de las 3 horas el área de dicho pico disminuye a medida que

aumenta la de los picos correspondientes a tiempos de retención alrededor de 5 minutos.

A las 3 horas el área correspondiente al pico de G-1 había disminuido en un 95,47 %; a las 22,5 horas en un 99,18 % y a las 49,5 horas ya no se detectó G-1.

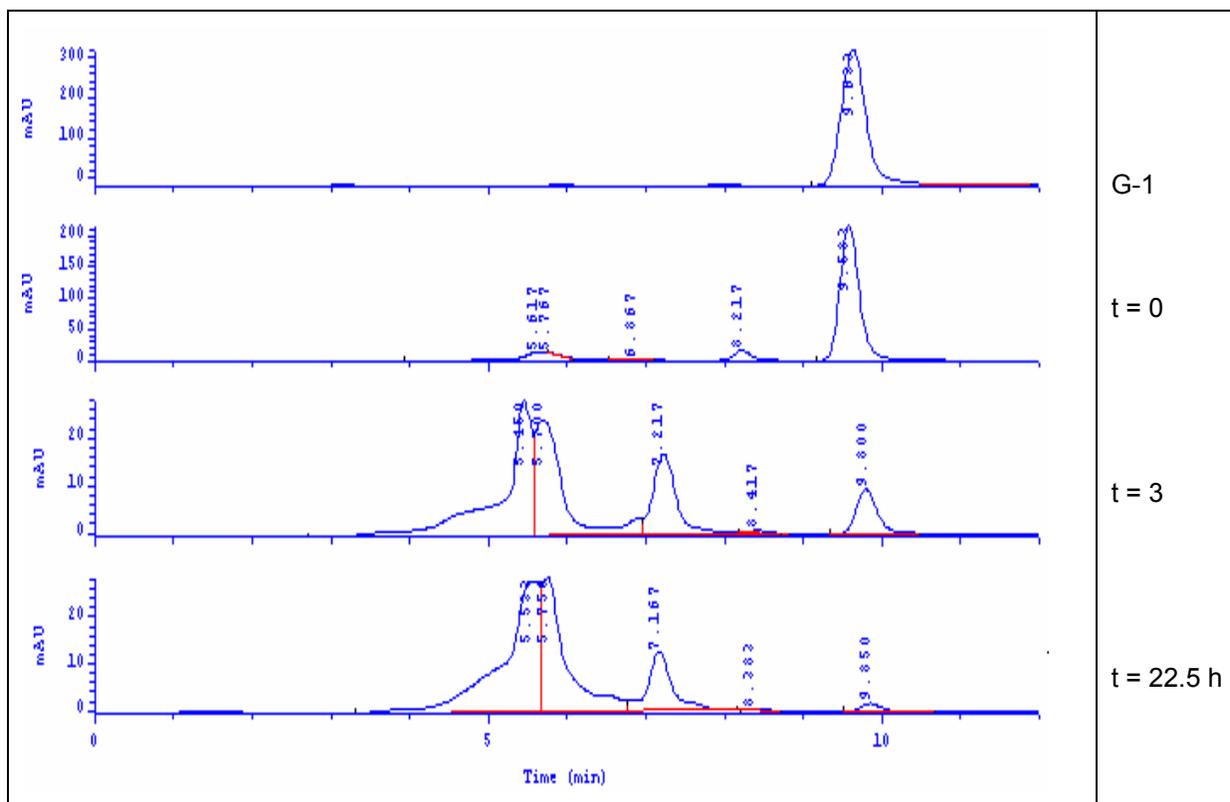


Figura 8: Cromatogramas correspondientes al G-1 y al estudio de estabilidad del G-1 en plasma humano.

Para la identificación de algunos de los picos que aparecen en los cromatogramas de muestras de G-1 degradadas, se procedió a hacer adiciones de 5-bromofurfural y del compuesto conocido como Monobromado, los cuales habían sido identificados en trabajos anteriores como posibles productos de degradación del G-1 en medio acuoso. [Molina, R. & Rosado, A., 1994; Ramírez, A. & González, MM., 1995]

En la figura 9 se observa como el pico correspondiente a $t_r = 7,617$ minutos aumentó considerablemente su área por la adición a la muestra de 5-bromofurfural.

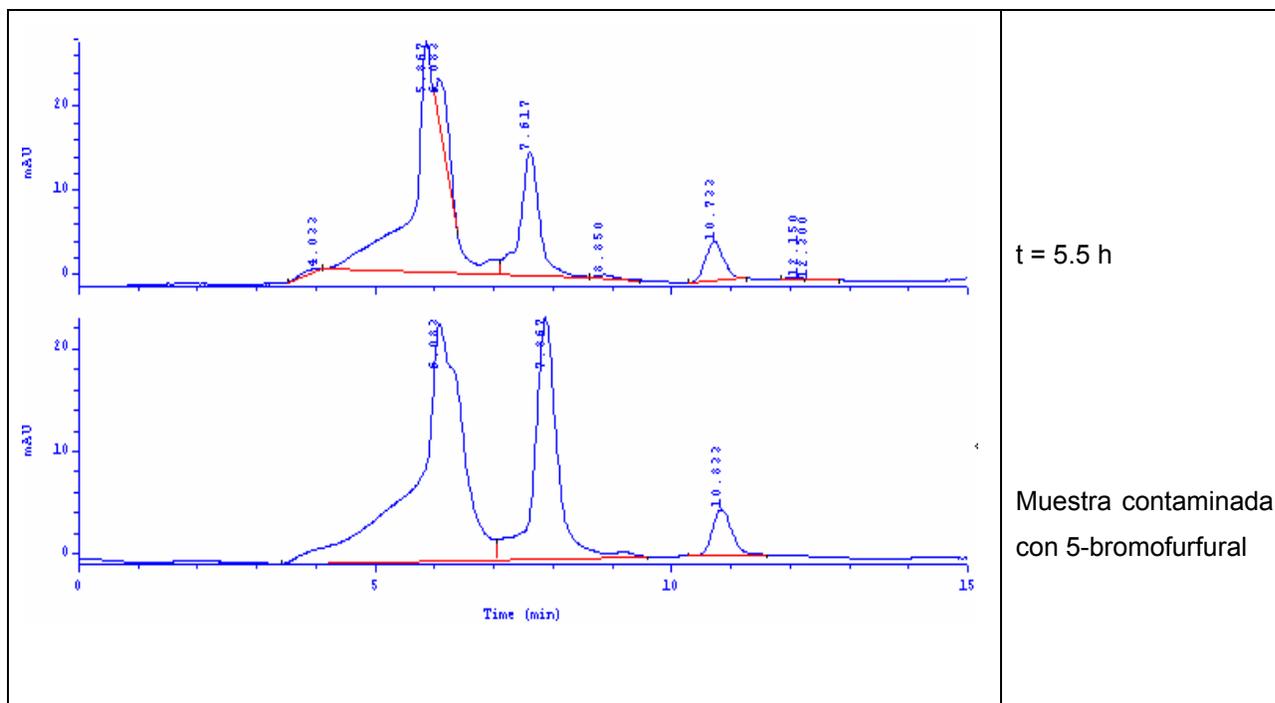


Figura 9: Cromatogramas de la muestra del estudio de estabilidad del G-1 en plasma a las 5,5 horas y la contaminada con 5-bromofurfural.

Un resultado similar se obtiene para el pico de $t_r = 8,282$ minutos con la adición a la muestra del producto monobromado.

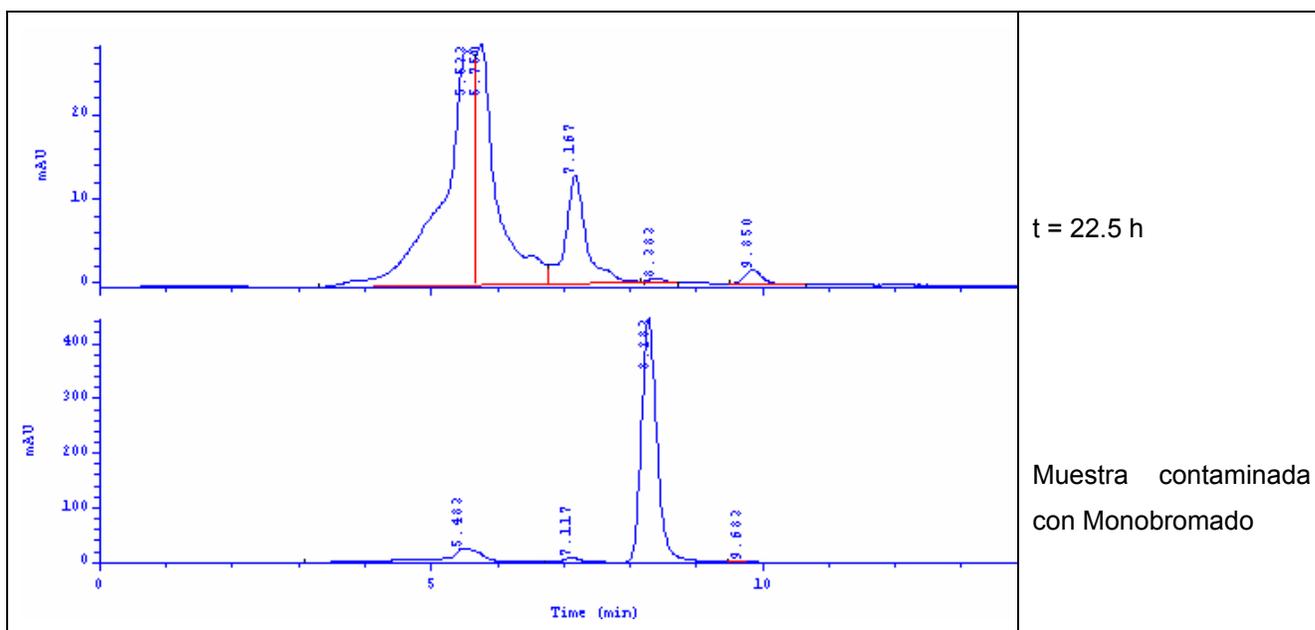


Figura 10: Cromatogramas de la muestra del estudio de estabilidad del G-1 en plasma a las 22,5 horas y la contaminada con monobromado.

Si bien este resultado no debe considerarse como una información concluyente sobre la identidad de dichos picos, sí aporta elementos sobre las posibles rutas de

degradación del G-1 en medio acuoso, lo que deberá ser abordado en trabajos futuros.

3.3. Estudio de la proporción de mezcla plasma-G-1 / adsorbente para la confección de los cartuchos:

En la revisión bibliográfica efectuada se constató que la proporción recomendada para la mezcla fase estacionaria / muestra para la confección del cartucho de MSPD debe ser de 4:1 para muestras sólidas. [Technical Note¹¹¹. Argonaut Technologies. Inc. 2002]. En el caso particular de muestras líquidas, esta proporción debe ser estudiada en base a la capacidad de incorporación de líquido del material adsorbente y del propio contenido de líquido de la muestra, para determinar la relación óptima, es decir, la que proporcione una mezcla en forma de polvo seco y con suficiente fluidez que facilite el llenado del cartucho y evite pérdidas de analito.

El estudio se efectuó para dos tipos de materiales adsorbentes de diferente polaridad, la sílica gel y la fase C-8. En cuanto a las muestras, se ensayó tanto con disoluciones de G-1 como con plasma humano al que se había incorporado una cantidad conocida de G-1 (también disuelto en acetonitrilo / agua ya que el G-1 no se solubiliza directamente en el plasma).

Al realizar las mezclas en diferentes proporciones de disolución de G-1 y adsorbente se obtuvo que cada gramo de sílica gel admite 2 mL de la disolución de G-1. En el caso del plasma conteniendo G-1, cada gramo de sílica gel es capaz de incorporar 1 mL de muestra, obteniéndose un polvo fino y homogéneo. Los resultados obtenidos usando como adsorbente la fase C-8 fueron los mismos que los correspondientes a la sílica gel.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento se describe en la figura 11 como se realizó la confección de los cartuchos para la determinación de G-1 mediante MSPD.

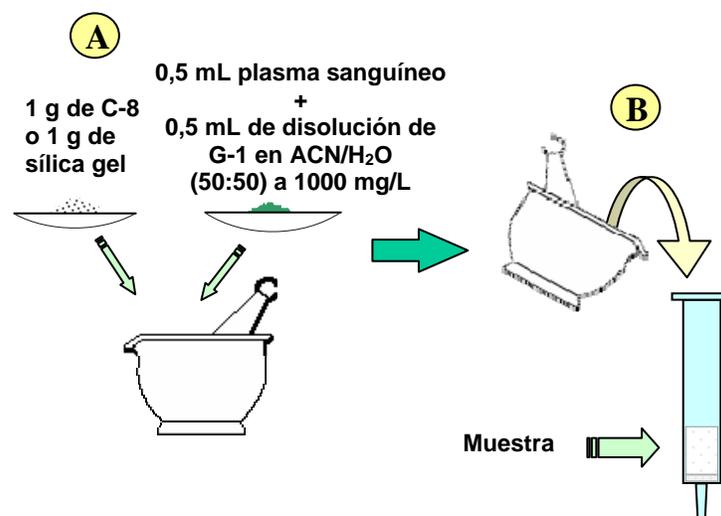


Figura 11: Esquema general de confección de los cartuchos.

Es obvio que esta es una primera aproximación para demostrar la aplicabilidad de la técnica de MSPD a la determinación de G-1 en muestras de plasma humano. Sobre la base de las proporciones óptimas de plasma y material adsorbente determinadas con este estudio, es posible procesar otros tamaños de muestra (volúmenes de plasma) en dependencia de las necesidades en cuanto a sensibilidad requerida para cada estudio concreto.

3.4. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho):

Al igual que en métodos equivalentes como la Extracción en Fase Sólida, el lavado del cartucho en MSPD persigue como objetivo eliminar selectivamente aquellas sustancias presentes en la muestra que pudieran interferir en la determinación analítica del compuesto de interés, ya sea porque respondan de manera similar al analito en el sistema de detección utilizado o porque al entrar en contacto con el instrumento analítico pudieran dañarlo. Este es el caso de las proteínas presentes en el plasma que bajo las condiciones utilizadas pudieran coagular (desnaturalizarse) en el interior de la columna y bloquearla, afectando tanto la calidad de las separaciones como la propia vida útil de la misma.

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos con cada una de las diferentes disoluciones de lavado ensayadas. En cada caso se lavó dos veces con volúmenes de 4 mL. Se colectaron las fracciones a la salida del cartucho, las que fueron analizadas por CCD. Los cromatogramas fueron revelados en cámara de yodo para determinar posibles pérdidas de G-1 en la disolución de lavado y con ninhidrina al

2% en etanol para confirmar la efectividad del proceso de lavado, es decir, la eliminación de proteínas plasmáticas.

Tabla 1: Resultados obtenidos por CCD al analizar los lavados realizados con las diferentes disoluciones y los dos adsorbentes.

Disoluciones de lavado	Sílica gel		C-8	
	Cámara de yodo	Ninhidrina al 2 % en etanol	Cámara de yodo	Ninhidrina al 2 % en etanol
Cloruro de sodio 1 mol/L	-	+	-	+
Agua / metanol (80:20)	+	+	+	+
Agua / metanol (95:5)	+	+	+	+
Ácido fórmico 0,1 %	+	+	+	+
Ácido fórmico 0,05 %	+	+	+	+
Ácido clorhídrico 0,1 %	*	*	+	+
Ácido clorhídrico 0,005 %	*	*	+	+
Agua destilada	-	+	-	+

+ Al revelar con yodo indica la presencia de G-1.

+ Al revelar con ninhidrina indica la presencia de proteínas.

- Al revelar con yodo indica ausencia de G-1.

- Al revelar con ninhidrina indica la ausencia de proteínas.

* No se ensayó.

Como puede observarse, todas las disoluciones de lavado son efectivas en el sentido de que eliminan las proteínas presentes en la muestra, pero solo el lavado con agua y con disolución acuosa de cloruro de sodio no conduce a pérdidas de G-1 por desorción desde el cartucho de MSPD. Por tal razón, se escogió el agua, con una secuencia de 2 x 4 mL para el lavado de las muestras de plasma humano con G-1 contenidas en el cartucho de MSPD. Está claro que de esta forma no se detecta posibles pérdidas de aquella fracción de G-1 que potencialmente pudiera estar unida a proteínas plasmáticas, algo que por su implicación en el proceso de extracción y determinación de niveles de G-1 en muestras de plasma, deberá ser estudiado.

3.5. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmáticas:

El proceso de lavado del cartucho de MSPD puede conducir a pérdidas de aquella fracción de analito que estuviera enlazada a proteínas plasmáticas.

Con el objetivo de conocer si se producían pérdidas de analito por esta razón, se diseñó un experimento en el que se colectaron fracciones sucesivas de 1 mL de las aguas de lavado del cartucho de MSPD. Una vez desproteinizadas con acetonitrilo, de cada fracción se tomó una porción de la disolución sobrenadante que fue filtrada y analizada por HPLC.

Tanto en la primera como en la segunda fracción aparece una señal al tiempo de retención del G-1, mientras que en las dos restantes fracciones no aparece dicha señal. El área de estos picos está en el entorno del límite de detección de la técnica, por lo que el resultado no puede tomarse como concluyente, pero sí es un elemento a considerar con vistas a estudiarlo con más profundidad en trabajos futuros.

De confirmarse la unión del G-1 a proteínas plasmáticas, habría que ajustar el procedimiento de extracción de G-1 desde muestras de plasma mediante MSPD diseñado aquí, incluyendo la adición al plasma de un reactivo desproteinizante antes de preparar la mezcla con el material adsorbente.

3.6. Determinación del volumen de elusión:

Para la elusión del G-1 desde los cartuchos de MSPD se escogió al acetonitrilo, ya que este es un disolvente en el que el G-1 es fácilmente soluble, además de que constituye la base (80 %) de la fase móvil empleada en las determinaciones por HPLC, por tanto, se garantiza la compatibilidad de la disolución de ensayo con el sistema analítico de determinación.

El análisis por HPLC de fracciones sucesivas tomadas de la elusión del G-1 desde los cartuchos de MSPD, preparados según se describe anteriormente, demostró que 8 mL de acetonitrilo son suficientes para eluir cuantitativamente al G-1, por lo que se decidió como propuesta final realizar la elusión de los cartuchos con dos fracciones de 4 mL de acetonitrilo que una vez mezcladas, se analizan por HPLC.

Para dar continuidad a este estudio en trabajos futuros, se propone incluir un paso de evaporación a sequedad del eluato, redissolver el residuo en la fase móvil e inyectarlo en el HPLC.

Finalmente es necesario insistir en que este volumen de elusión deberá ser determinado nuevamente si se modifica el tamaño de muestra y la cantidad de adsorbente pues con ello también varía el volumen muerto del cartucho de MSPD.

3.7. Uso de una co-columna:

El empleo de una co-columna es algo habitual en los procesos de extracción de muestras mediante MSPD por cuanto permite eliminar el paso de lavado del cartucho siempre que sea posible conformar una co-columna de un material adsorbente capaz de retener selectivamente las interferencias de la muestra, lo que permite, al eluir el cartucho, obtener un eluato limpio que sólo contiene al analito.

En este sentido se ensayó el uso de una co-columna de sílica gel para la limpieza de las muestras de plasma dispersas en fase C-8. Se evaluó la elusión habitual con acetonitrilo y además, con n-hexano, un disolvente apolar con bajo poder eluyente respecto a la sílica gel.

En la evaluación del ensayo por CCD se comprobó que la elusión del G-1 con acetonitrilo también provocaba el arrastre de una cantidad detectable de proteínas al ser revelado el cromatograma con la disolución de ninhidrina al 2 % en etanol.

Sin embargo, con el n-hexano como eluyente se obtuvo un eluato traslúcido que da negativo al revelado con ninhidrina en la evaluación por CCD, con lo que se demostró la efectividad de la co-columna de sílica gel para la eliminación selectiva de las proteínas de la disolución final destinada al análisis (eluato).

El único inconveniente para utilizar esta alternativa en el proceso general de MSPD propuesto es que el n-hexano no es miscible con la fase móvil que se empleó en el análisis por HPLC, por lo cual habría que incorporar un paso de evaporación a sequedad del eluato en n-hexano para posteriormente redissolver el residuo en la fase móvil e inyectarlo en el equipo de HPLC.

Teniendo en cuenta que no se ha demostrado que el empleo de la co-columna y elusión con n-hexano conduce a un eluato final más limpio que el obtenido al lavar el

cartucho de MSPD con agua, se continuó trabajando con esta última variante que es más económica y no afecta la columna cromatográfica, hasta tanto sea posible demostrar en trabajos futuros, la superioridad en cuanto a la calidad de los resultados de una u otra alternativa de limpieza del extracto.

3.8. Validación:

La selección de métodos analíticos es de gran importancia para la realización de los ensayos farmacocinéticos. Es por ello, que a la hora de adoptar un método para este tipo de estudio, es necesario demostrar que el mismo puede aplicarse con buenos resultados y que además, funciona en todo momento de acuerdo con las demandas y requerimientos en cuanto a su exactitud, uso, aplicación y fuentes de error. [Artau, C.,

Fernández, A. & Alonso, E.; Díaz, I. & Fariñas, O.1998; Padrón, A.S., Fernández, M., Martínez, L. & Izquierdo, J.C.1998]

En la validación de metodologías para la determinación de analitos a muy bajas concentraciones y que están contenidos en matrices de naturaleza compleja, como es el caso de la determinación de G-1 en plasma humano, la evaluación de la sensibilidad y especificidad de las determinaciones cobra una importancia vital. No obstante, los parámetros de validación estudiados en este trabajo fueron, además de la sensibilidad (límites de detección y de cuantificación) y la especificidad, la linealidad, precisión y exactitud.

3.8.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)).

Los límites de detección y cuantificación de G-1 por HPLC bajo las condiciones especificadas son:

Límite de detección: $LD = \frac{\bar{X} + 3S}{b}$	0,32 mg/L
Límite de cuantificación: $LQ = \frac{\bar{X} + 10S}{b}$	0,96 mg/L

3.8.2. Linealidad.

Se evaluó la linealidad de la determinación de G-1 mediante HPLC en el intervalo comprendido entre 1,2 mg/L y 90 mg/L de G-1 puro disuelto en fase móvil (acetonitrilo / agua (80:20)). Los valores experimentales que corresponden con la curva de calibración de G-1 se muestran en la Figura 12 y la Tabla 2.

Los parámetros de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, según se expone en la Tabla 3, lo que indica que la técnica es lineal para el rango de concentraciones estudiado.

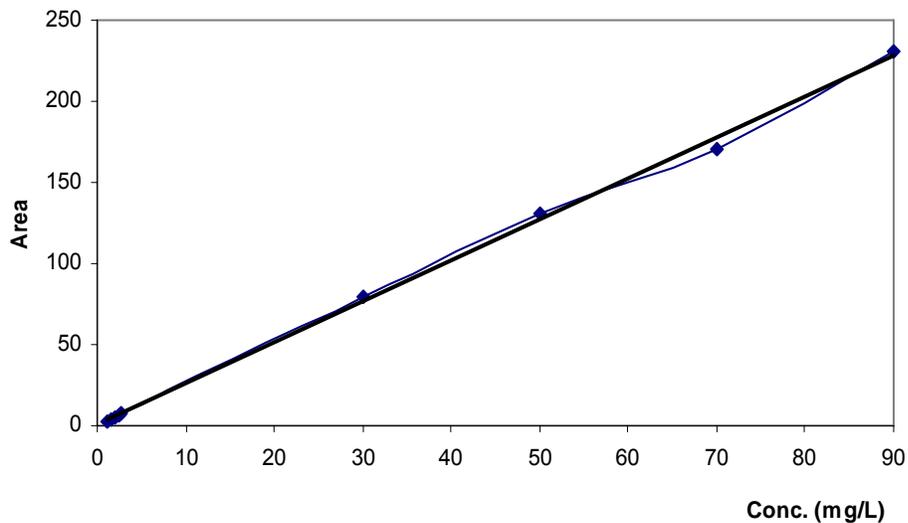


Figura 12: Curva de calibración para el G-1 en acetonitrilo / agua (80:20) por HPLC.

Tabla 2: Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de G-1 en acetonitrilo / agua (80:20) por HPLC.

X (Conc. mg/L)	Y (Área)	f = Y/X (Factor de respuesta)
1,2	2,877	2,3975
1,6	3,849	2,4054
2	5,058	2,5291
2,4	6,209	2,5873
2,8	7,078	2,5279
30	79,755	2,6585
50	130,779	2,6156
70	170,311	2,4330
90	231,132	2,5681

Tabla 3: Parámetros de la recta de regresión de G-1 en acetonitrilo / agua (80:20) por HPLC.

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Número de datos (n)	9	-
Intervalo de linealidad (mg/L)	1,2-90	-
Coefficiente de correlación (r)	0,9992	$r \geq 0,99$
Pendiente (b)	2,5231	-
Desviación estándar relativa de la pendiente (Sbrel (%))	1,46	$Sbrel \leq 2,00 \%$
Ordenada en el origen (a)	0,3978	-
Intervalo de confianza de a	$-3,35 \leq a \leq 4,15$	Que contenga el cero
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (CVf (%))	3,73	$CVf \leq 5 \%$
Test estadístico de b (t tab)	texp = 68,26 ttab = 2.365	texp \geq ttab

3.8.3. Precisión (repetibilidad).

Una vez cuantificadas las cinco réplicas; el valor medio obtenido para la concentración de G-1 es de 33,55 mg/L, desviación estándar de 1,22 mg/L y coeficiente de variación de 3,64 %. Este valor del coeficiente de variación, ligeramente superior al recomendado en la literatura ($CV \leq 1,5 \%$), evidencia que debido a la demostrada inestabilidad del G-1 en medios acuosos como el plasma humano, la determinación analítica no es robusta en cuanto al factor tiempo por cuanto la magnitud de la degradación que experimenta el analito es una función de ese factor. En tal sentido y atendiendo a los resultados obtenidos, para garantizar determinaciones precisas del G-1 en este tipo de muestras habrá que tener un control muy exacto de la duración de los procesos de extracción y de determinación analítica, asegurando que siempre se emplee el mismo tiempo.

En trabajos futuros será necesario profundizar en el estudio de la cinética de degradación del G-1 en medio acuoso con vistas a determinar los parámetros que puedan influir en la robustez de las determinaciones analíticas en estas muestras.

3.8.4. Exactitud.

El porcentaje de recuperación obtenido para una muestra de plasma humano, a la que se adicionó G-1 muestra de referencia a una concentración de 50 mg/L fue de 67,1 %. Si bien este resultado está dentro de los márgenes tolerables para ensayos bioanalíticos, en los que es frecuente encontrar valores de por ciento de recuperación inferiores al 70 %, es obvio que atendiendo a estudios precedentes y a lo demostrado en este propio trabajo, la rápida degradación del G-1 en medio acuoso tiene una influencia determinante en el resultado obtenido.

3.8.5. Selectividad.

El método de análisis empleado fue capaz de detectar separadamente al G-1 de sus impurezas, productos de degradación e interferencias presentes en la matriz de la muestra, según se observa en los cromatogramas correspondientes al estudio de estabilidad del G-1 en plasma.

Conclusiones

1. Se obtuvo un polvo seco y con suficiente fluidez para rellenar los cartuchos empleados en la extracción mediante Dispersión en Matriz Sólida a partir de una mezcla de muestra / adsorbente en proporción 1:1.
2. El lavado de los cartuchos empleados en la extracción mediante Dispersión en Matriz Sólida con agua fue suficiente para eliminar las principales interferencias del plasma, sin que haya pérdida de G-1.
3. La técnica estudiada de extracción de G-1 desde plasma humano mediante Dispersión en Matriz Sólida y determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia resultó ser lineal, sensible y selectiva, sin embargo los resultados de la precisión y la exactitud no fueron los mejores, en lo que influye de forma decisiva la baja estabilidad del fármaco en plasma humano.

Recomendaciones

1. Estudiar con más profundidad la unión de G-1 a proteínas plasmáticas para conocer si por esta razón se producen pérdidas del analito durante el proceso de lavado.
2. Aplicar la técnica de Dispersión en Matriz Sólida en el estudio de determinación de G-1 en tejidos y otros fluidos biológicos con vistas al estudio farmacocinético de este producto.

Anexo 1

CBQ

Centro de Bioactivos Químicos
Universidad Central de Las Villas
Carretera de Camajuaní km 5½
Teléfonos: 281473 / 281254
FAX: 281130

Certificado de Calidad

Producto **G-1**

Folio: --

Fecha de Fabricación: 03-07-14

Lote: 03-3-34

ENSAYOS	RESULTADOS	LÍMITES
Características Organolépticas		
a) Aspecto	Cumple	Cristalino
b) Color	Cumple	Amarillo
c) Olor	Cumple	Característico
Identificación		
a) Rango de Fusión	-	89,0 °C – 92,0 °C
b) Espectro UV-VIS	Cumple	Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm
Pérdidas por Deseccación	0,06	No más que 0,50 %
Residuo de Ignición	0,03	No más que 0,10 %
Metales Pesados	Cumple	No más que 20 µg/g
Contenido de G-1	99,87	98,00 % – 102,00 %
Contenido de Monobromado	--	No más que 1,00 %
Límite Microbiano	Cumple	No más de: UFC de Bacterias/g = 10^3 UFC de Hongos/g = 10^2 Ausencia de: Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Enterobacteriaceae Candida sp

Bibliografía: G-1 materia prima. Métodos de Control. CBQ.

OBSERVACIONES: Contenido de G-1, según análisis por DSC.

Límite microbiano según NC 26-121:93 Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinaciones microbiológicas

	Suministrado por:
Nombre	Lic. Amalia Calvo Alonso
Cargo	Jº Control de la Calidad
Firma	
Fecha	04-07-23

Anexo 2

CBQ

Centro de Bioactivos Químicos
 Universidad Central de Las Villas
 Carretera a Camajuani km 5½
 Teléfonos: 281473 / 281254
 FAX: 281130

Certificado de Calidad

Producto **G-1**
 Folio: 82-04

Fecha de Fabricación: 03-03-27
 Lote: 03-3-13

Fecha de reanálisis: 06-11

ENSAYOS	RESULTADOS	LÍMITES
Características Organolépticas		
a) Aspecto	Cumple	Cristalino
b) Color	Cumple	Amarillo
c) Olor	Cumple	Característico
Identificación		
a) Rango de Fusión	--	89,0 °C – 92,0 °C
b) Espectro UV-VIS	Cumple	Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm
Pérdidas por Deseccación	0,08	No más que 0,50 %
Residuo de Ignición	0,03	No más que 0,10 %
Metales Pesados	Cumple	No más que 20 µg/g
Contenido de G-1	99,76	98,00 % – 102,00 %
Contenido de Monobromado	0,21	No más que 1,00 %
Límite Microbiano	Cumple	No más de: UFC de Bacterias/g = 10 ³ UFC de Hongos/g = 10 ² Ausencia de: Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Enterobacteriaceae Candida sp

Bibliografía: G-1 materia prima. Métodos de Control. CBQ.

OBSERVACIONES:

	Aprobado por:	Supervisado por:
Nombre	Tersita Ramos Gómez	Amalia Calvo Alonso
Cargo	J' Control Final	J' Control de Calidad
Firma		
Fecha	04-11-12	04-11-12

Anexo 3

MOD. 44-09-01
 MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
 BANCO DE SANGRE
 UNIDAD:

SOLICITUD Y ENVIO DE SANGRE Y SUS COMPONENTES

SOLICITUD				ENVIO		
<input type="checkbox"/> URGENTE <input checked="" type="checkbox"/> NO URGENTE				955		
UNIDAD Y DEPARTAMENTO				UNIDAD Y DEPARTAMENTO		
Nombre y Apellidos: <u>Bioactivus D.</u>				Nombre y Apellidos: <u>Banco de Sangre</u>		
Fecha: _____ DIA MES AÑO				Fecha: <u>5</u> / <u>4</u> / <u>06</u> DIA MES AÑO		
DESCRIPCION DEL PRODUCTO	GRUPO FACTOR	U.M.	CANTIDAD SOLICITADA	CANTIDAD ENVIADA	TOTAL DE FRASCO O BOLSA	NUMERO DE HISTORIA CLINICA Y CODIGO
Plasma	B		1	1		319-12-4074
Plasma Sobrenadante citio...			1	1		257-P ₂ -7394
/						
RECIBIDO POR: <u>Sergio Morales</u> NOMBRE Y APELLIDOS				CI: <u>67040104146</u> FIRMA		FECHA: _____ DIA MES AÑO

Publicigraf Ciego de Avila