Facultad Química - Farmacia

Trabajo para optar por el Título de Máster en Química Analítica

Título: **Procedimientos analíticos para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano.**

Autor: **Lic. Amalia María Calvo Alonso**

Tutor: **Dr. Sergio Morales Fernández**

Año 49 de la Revolución

Curso académico 2007 - 2008

Resumen

En este trabajo se empleó la extracción en fase sólida y la dispersión en matriz sólida combinados con el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia y de gases, para determinar la concentración de G-1 en muestras de plasma humano. Se demostró la utilidad de la extracción en fase sólida, empleando cartuchos *Supelclean™ LC-18*, elución con cloroformo y el análisis por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama.

Se desarrolló una metodología aplicando la MSPD que permitió obtener un polvo seco y fluido para rellenar los cartuchos, al emplear como adsorbente tanto silicagel como fase C18. Para la eliminación de interferencias se lavaron los cartuchos con diferentes disoluciones obteniendo buenos resultados con agua destilada. La elución del analito se realizó con acetonitrilo. Se validó un procedimiento con el empleo de este método de extracción y el análisis por HPLC que resultó ser sensible (DL = 0,32 mg/L y QL = 0,96 mg/L), lineal en el intervalo de concentraciones de 1,2 mg/L a 90 mg/L, preciso, exacto y específico.

También se establecieron los parámetros operacionales para la determinación de G-1 por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica. Las temperaturas del inyector, horno (columna) y detector se fijaron en 230, 200 y 280 ºC, respectivamente. El valor óptimo determinado para el flujo de fase móvil (nitrógeno) fue de 0,5 mL/min y el volumen de inyección de 1 μL (modo splitless), con uso de benzoato de bencilo como estándar interno para corregir los errores asociados con la inyección manual.

El procedimiento para la extracción de G-1 en muestras de plasma humano mediante dispersión en matriz sólida, con adsorbente de sílica modificada C-18, co-columna de silicagel, elución con n-hexano y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica se sometió a un proceso de validación y resultó ser sensible, con límite de detección de 0,0741 mg/L y limite de cuantificación de 0,1452 mg/L, lineal en el intervalo de 0,5 a 8 mg/L, preciso, exacto y específico.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN…… 1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA…… 3
2.1. Generalidades de la molécula de G-1…….. 3
2.2. Solubilidad y Estabilidad del G-1…….. 3
2.3. Actividad biológica y toxicidad del G-1…….. 4
2.4. Métodos de extracción de fármacos desde fluidos biológicos…….. 5
2.4.1. Extracción en fase sólida (SPE)…… 6
2.4.1.1. Aplicaciones de la extracción en fase sólida (SPE)…… 8
2.4.2. Extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD)…….. 10
2.4.2.1. Aplicaciones de la extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD)…….. 11
2.5. Técnicas analíticas cromatográficas empleadas en la determinación de fármacos en matrices biológicas…….. 13
2.5.1. Generalidades de la cromatografía……... 13
2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…… 14
2.5.2.1. Cromatografía líquida en fase reversa…….. 14
2.5.2.2. Instrumentación…… 15
2.5.3. Cromatografía de gases (GC)…… 17
2.5.3.1. Instrumentación…… 17
2.6. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos…… 21
2.6.1. Linealidad…….. 22
2.6.1.1. Sensibilidad de calibrado…… 25
2.6.1.2. Valores aceptables de los parámetros de linealidad……... 25
2.6.2. Exactitud…… 25
2.6.3. Precisión…… 26
2.6.4. Límite de detección y cuantificación……... 28
2.6.5. Especificidad…… 29
3. MATERIALES Y MÉTODOS…… 30
3.1. Equipamiento…… 30
3.2. Reactivos…… 30
3.3. Materiales…… 31
3.4. Estudio de estabilidad de G-1 en plasma…….. 32
3.4.1. Técnicas analíticas empleadas en el estudio de estabilidad de G-1 en plasma…….. 32
3.4.1.1. Cromatografía de capa delgada (TLC)……... 32
3.4.1.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…… 32
3.4.2. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía de capa delgada (TLC)…….. 32
3.4.3. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…… 32
3.5. Determinación de G-1 en plasma mediante extracción en fase sólida y cuantificación por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama (GC-FID)……. 33

3.5.1. Extracción en fase sólida (SPE)…… 33
3.5.1.1. Preparación de las disoluciones…… 33
3.5.1.2. Preparación de las muestras…….. 33
3.5.1.2.1. Preparación de las muestras en agua destilada…… 33
3.5.1.2.2. Preparación de las muestras en plasma humano…… 34
3.5.1.3. Proceso de extracción……..... 34
3.5.1.3.1. Acondicionamiento del cartucho…….. 34
3.5.1.3.2. Extracción de las muestras……..... 34
3.5.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-FID…….. 35
3.5.3. Validación del procedimiento de extracción (SPE) y determinación cromatográfica (GC-FID) de G-1 en plasma…….. 35
3.5.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…….. 35
3.5.3.2. Linealidad…… 35
3.6. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…… 36
3.6.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo para la extracción en MSPD…… 36
3.6.1.1. Estudio de la proporción de mezcla plasma-G-1 / adsorbente para la confección de los cartuchos……... 36
3.6.1.2. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho)…… 37
3.6.1.3. Determinación del volumen de elución……..... 37
3.6.2. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmáticas……..... 37
3.6.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…….. 38
3.6.4. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (HPLC) de G-1 en plasma…….. 38
3.6.4.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…….. 38
3.6.4.2. Linealidad……... 38
3.6.4.3. Precisión…… 38
3.6.4.3.1. Repetibilidad…… 38
3.6.4.4. Exactitud…… 39
3.6.4.5. Especificidad…… 39
3.7. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida **(MSPD) y cuantificación por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD)…….... 39**
3.7.1. Extracción mediante MSPD. Empleo de una co-columna de silicagel para la retención de interferencias polares…….. 39
3.7.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-ECD…… 40
3.7.2.1. Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector……... 40
3.7.2.2. Selección del flujo de fase móvil…… 40

3.7.2.3. Volumen de inyección…….. 40
3.7.2.4. Selección del estándar interno…… 40
3.7.3. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (GC-ECD) de G-1 en plasma……. 40
3.7.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…….. 40
3.7.3.2. Linealidad……... 41
3.7.3.3. Precisión……. 41
3.7.3.3.1. Repetibilidad instrumental……. 41
3.7.3.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración…… 41
3.7.3.3.3. Precisión intermedia……..... 41
3.7.3.4. Exactitud…… 42
3.7.3.5. Especificidad …… 42
3.8. Procesamiento estadístico de los datos……. 42
4. RESULADOS Y DISCUSIÓN…… 43
4.1. Generalidades……..... 43
4.2. Estabilidad de G-1 en plasma…… 43
4.2.1. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía de capa delgada (TLC)……..…… 45
4.2.2. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)…… 45
4.3. Determinación de G-1 en plasma mediante extracción en fase sólida (SPE) y cuantificación por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama (GC-FID) 48
4.3.1. Extracción en fase sólida (SPE)…….. 48
4.3.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-FID……... 48
4.3.3. Validación del procedimiento de extracción (SPE) y determinación cromatográfica (GC-FID) de G-1 en plasma…….. 51
4.3.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…….. 51
4.3.3.2. Linealidad…… 51
4.3.4. Aplicación del método a una muestra de plasma humano conteniendo G-1……. 53
4.4. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)……. 53
4.4.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo para la extracción en MSPD……..... 53
4.4.1.1. Estudio de la proporción de mezcla plasma-G-1 / adsorbente para la confección de los cartuchos……... 53
4.4.1.2. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho)……. 55
4.4.1.3. Determinación del volumen de elución……..... 56
4.4.2. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmáticas……..... 56
4.4.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)……... 57
4.4.4. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (HPLC) de

G-1 en plasma…….. 57
4.4.4.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…….. 57
4.4.4.2. Linealidad…… 57
4.4.4.3. Precisión…… 59
4.4.4.3.1. Repetibilidad…….. 59
4.4.4.4. Exactitud…… 59
4.4.4.5. Especificidad …… 59
4.5. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD)…….. 59
4.5.1. Extracción mediante MSPD. Empleo de una co-columna de silicagel para la retención de interferencias polares…….. 60
4.5.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-ECD 60
4.5.2.1. Selección del flujo de fase móvil……. 60
4.5.2.2. Selección del estándar interno……. 61
4.5.3. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (GC-ECD) de G-1 en plasma……. 63
4.5.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación…… 63
4.5.3.2. Linealidad……. 63
4.5.3.3. Precisión…….. 65
4.5.3.3.1. Repetibilidad instrumental…….. 65
4.5.3.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración…….. 66
4.5.3.3.3. Precisión intermedia……..... 66
4.5.3.4. Exactitud…….. 67
4.5.3.5. Especificidad …… 67
5. CONCLUSIONES…… 70
6. RECOMENDACIONES…….. 71
7. BIBLIOGRAFÍA…….. 72
8. ANEXOS

1. 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 biofarmacéuticos 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 anteceden procesos de extracción.

El procedimiento tradicional de extracción líquido-líquido desde muestras biológicas como la sangre, suero o plasma tiene una serie de desventajas que son superadas por la extracción en fase sólida y la dispersión en matriz sólida, pues con ellas se consigue poca manipulación de la muestra, gracias a que permiten ejecutar la extracción en pocos pasos, requieren volúmenes pequeños 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 porque ofrecen un análisis completo que puede realizarse en un tiempo relativamente corto (unos 30 minutos como promedio), proporcionando información para los análisis cualitativo y cuantitativo, es decir, que usando las condiciones analíticas adecuadas se pueden hacer separaciones imposibles de realizar por otros métodos y la mejor razón para utilizarlos es que tienen buena sensibilidad; utilizando detectores selectivos se han logrado detectar cantidades hasta de 10^{-12} gramos. Ahora bien, para elegir el método adecuado es necesario demostrar su funcionamiento y fiabilidad, es decir, debe cumplir con los requerimientos de validación correspondientes.

En consecuencia, se ha identificado como <u>problema científico</u> el hecho de que en el Centro de Bioactivos Químicos no se pueden realizar los estudios farmacocinéticos, farmacológicos y/o toxicológicos necesarios para el registro de medicamentos, porque no existen técnicas analíticas para determinar las concentraciones de G-1 en fluidos biológicos.

Sobre esta base se formuló la siguiente hipótesis: “El desarrollo de los procedimientos de extracción y análisis apropiados para determinar la concentración de G-1 en muestras de plasma humano, pudiera hacer posible la ejecución de los estudios farmacocinéticos, farmacológicos y/o toxicológicos necesarios para el registro de sus formulados.”.

Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General:

Disponer de procedimientos, en los que se emplee la extracción en fase sólida y la dispersión en matriz sólida combinados con el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia y de gases, para determinar la concentración de G-1 en muestras de plasma humano.

Objetivos Específicos:

- Demostrar la utilidad de la extracción en fase sólida y análisis por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama, para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano.

- Desarrollar y validar un procedimiento mediante extracción por dispersión en matriz sólida y análisis por cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano.

- Desarrollar y validar un procedimiento para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano mediante extracción por dispersión en matriz sólida y análisis por cromatografía de gases, con columna capilar y detector de captura electrónica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de la molécula de G-1

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, conocido como G-1, es un nuevo ingrediente farmacéutico activo sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas. Su estructura química ha sido corroborada por diferentes técnicas como la espectrofotometría de masa, espectrofotometría infrarroja en estado sólido, espectrofotometría ultravioleta – visible y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RNM-^{1}H) [Estrada, E., 1993 II]

La fórmula estructural se muestra en la figura 1.

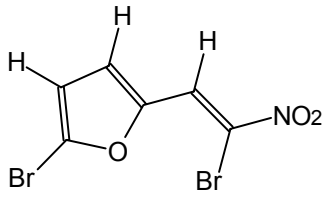


Figura 1. Estructura química del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.

2.2. Solubilidad y Estabilidad del G-1

Según las categorías que establece la Farmacopea de los Estados Unidos, [USP 27, 2004] el G-1 es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido, acetonitrilo y benceno; soluble en tetracloruro de carbono, poco soluble en metanol absoluto y etanol 90 % v/v, difícilmente soluble en etanol 70 % v/v y muy difícilmente soluble en agua. [Jorge, E. y Col., 1993 II]

En diversos estudios se ha evaluado la estabilidad del G-1 en estado sólido, disuelto en varios disolventes así como en presencia de algunos excipientes de uso tradicional en formulaciones farmacéuticas.

Jorge y col. [Jorge, E. y Col. 1993 I] realizaron un estudio de estabilidad acelerada del G-1 materia prima, en el cual evaluaron de forma cualitativa y cuantitativa la influencia de la temperatura, la luz y la humedad.

Se expusieron a la luz de una lámpara de sodio (λ = 589 nm) muestras de G-1 durante 91 días, las cuales no manifestaron cambios organolépticos y al ser analizadas por cromatografía de gases no presentaban evidencias de degradación. También se sometieron muestras de G-1 a condiciones de 100, 95, 86 y 76 % de humedad, a las cuales se les realizaron diariamente determinaciones del peso para determinar si existía incremento del mismo; a los 35 días se analizaron por cromatografía de gases, sin encontrarse evidencias de degradación. La influencia de la temperatura (40, 50, 60 y 70 ^{o}C) fue estudiada durante 90 días y se obtuvieron los mismos resultados.

También se realizó un estudio de estabilidad de vida de estante del G-1 materia prima en frascos de vidrio ámbar con tapa esmerilada y de rosca a temperatura ambiente. Transcurrido un año no se encontraron alteraciones cualitativas ni cuantitativas, por lo que se propuso como fecha de vencimiento dos años a temperatura ambiente.

Los estudios del comportamiento en disolución, evidencian que el G-1 es inestable en aceite de girasol, etanol absoluto; etanol comercial y 2–propanol, mostrando una mayor estabilidad en alcohol bencílico. [Landry, F., 1990; Jorge, E., 1993] Se ha comprobado que es estable en acetonitrilo y en mezcla de acetonitrilo/agua (80:20 % v/v), durante, al menos, una semana. Existe una fuerte acción de la luz sobre la degradación del G-1 en disolución, lo cual se le atribuye a una interacción específica disolvente / G-1, catalizada por la luz. [Molina, R. & Rosado, A., 1994]

En un estudio sobre productos de degradación del G-1 en mezclas de agua y diferentes disolventes a pH ácido, básico y neutro, se demostró la rápida degradación del mismo en estas condiciones, y se identificó el 5-bromofurfural como unos de los productos de degradación. [Molina, R. & Rosado, A., 1994]

2.3. Actividad biológica y toxicidad del G-1

El G-1 ha mostrado actividad *in vitro* como bactericida - fungicida de amplio espectro; comprobándose su efectividad frente a 908 cepas de bacterias Gram negativas y 119 cepas Gram positivas. [González, O. y Col., 1993, I; González, O. y Col., 1993, III] Estos estudios *in vitro* también sugieren que el G-1 es un compuesto antibacteriano con una potente acción frente a bacterias Gram negativas enteropatógenas [González, O. y Col., 1993, IV]

González, O. y colaboradores determinaron su actividad frente a 288 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 62 de *Pseudomonas maltophila*, 49 de *Candida albicans* y 38 de dermatofitos de cuatro especies. [González, O. y Col., 1993, II; González, O. y Col., 1993, III]

Por otra parte hay trabajos que recogen la evaluación de la actividad *in vitro* del G-1 frente a 40 cepas de hongos filamentosos de siete especies, en especial dermatofitos detectándose solamente un 7,5% de cepas resistentes. [Estrada, E., 1993, II]

Estudios realizados por Blondeau y col. en 1997, amplían y corroboran estos resultados de actividad *in vitro* frente a 2702 microorganismos multi-resistentes. [Blondeau, J.M., 1997]

Como resultado de un estudio de toxicidad aguda por las vías oral y percutánea, en ratas Spragüe Dawley machos y hembras, el G-1 ha sido clasificado como ligeramente tóxico, con valores de dosis letal media de 1856,3 – 1506,2 mg/kg y 2370 – 2205 mg/kg de masa corporal, respectivamente. [Cortes, R.R., Pérez, T., Reiner, T., 1997] Los estudios subcrónicos y crónicos por vía tópica, no registran manifestaciones clínicas relacionadas con daños orgánicos de interés toxicológico por lo cual permiten su utilización por esta vía de administración. [Cortes, R.R., 1997; Cortes, R.R., Pérez, T., Reiner, T., 1997]

En cuanto al criterio del riesgo genotóxico se han tomado en cuenta los resultados de diez pruebas de mutagénesis y/o genotoxicidad realizadas a este ingrediente farmacéutico activo, incluidos estudios teóricos [Estrada, E., 1998], estudios *in vitro* [Pant, K.J., 1996; Pérez, G., 1996 & Xu J., 1996] y estudios *in vivo* [Carballo, N., 1997, I, II, III, IV]; de los cuales, los tests de Ames y Aberraciones cromosómicas en CHO fueron positivos. En general, los resultados de las pruebas de mutagénesis sugieren que el G-1 se puede utilizar de forma segura como medicamento tópico en enfermedades infecciosas. [Pant, K.J., 1996]

Teniendo en cuenta su actividad biológica y los resultados de los estudios toxicológicos realizados, el G-1 constituye una molécula con posibilidades de incluirse en la terapéutica como antiinfeccioso. En la actualidad se amplían los estudios de toxicidad, de preformulación y mecanismo de acción.

Hasta el momento se han otorgado al Centro de Bioactivos Químicos tres registros de productos que poseen al G-1 como ingrediente farmacéutico activo:

- Queratofural®: ungüento oftálmico de uso veterinario, empleado en infecciones oculares bacterianas. Registro otorgado en 1993. [Queratofural, 2001]

- Vitrofural®: esterilizante químico empleado como aditivo a los medios de cultivo utilizados en la producción de vitroplantas, con su uso se elimina el proceso de autoclave. Registro otorgado en 1999. [Vitrofural, 1999]

- Dermofural®: ungüento tópico de uso humano empleado en el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel producidas por hongos y bacterias. Registro otorgado en 2007. [Dermofural, 2007]

2.4. Métodos de extracción de fármacos desde fluidos biológicos

En los organismos vivos del reino animal, existen numerosos fluidos biológicos, entre los que se encuentran la sangre, el sudor, la orina, las lágrimas, el semen, etc. Cada uno de ellos cumple funciones específicas y están formados por numerosos compuestos e incluso corpúsculos y estructuras, por lo que pueden considerarse matrices complejas cuando se van a estudiar o a determinar alguno de sus componentes o sustancias que se sospechen estén contenidas en él.

Uno de los fluidos biológicos más importantes y complejos es la sangre, la cual está compuesta por muchos tipos de corpúsculos, estos elementos constituyen alrededor de un 45 % de su contenido, lo que se conoce con el nombre de hematocrito. El otro 55 % es plasma sanguíneo, un fluido acuoso, amarillento y salado que conforma el medio líquido de la sangre, en el que se encuentran en suspensión millones de células y que además de transportarlas, también lleva los alimentos y las sustancias de desecho recogidas de las células. El plasma, cuando se coagula la sangre, origina el suero sanguíneo.

El plasma sanguíneo está formado por: agua (96 %), proteínas plasmáticas (albúmina, fibrinógeno, protrombina y aglutininas), factores de coagulación de la sangre, inmunoglobulinas (anticuerpos),

hormonas, otras proteínas (varias), sustancias inorgánicas (sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato), azúcares, enzimas, lípidos, amoniácidos, productos de degradación como urea y creatinina. [http://enciclopedia.us.es; http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre]

Cuando se van a realizar estudios farmacocinéticos es necesario determinar los fármacos y/o sus metabolitos en los fluidos biológicos, fundamentalmente en la sangre, estas determinaciones resultan complejas debido a las características de la matriz y muchas veces a la baja concentración de los analitos, por lo que no se pueden analizar de forma directa y se hace imprescindible el empleo de técnicas de extracción y purificación. Entre los métodos más usados con este fin están la extracción en fase sólida y la dispersión en matriz sólida.

2.4.1. Extracción en fase sólida (SPE)

Es un método de separación de muestras que permite concentrar y purificar analitos en disolución mediante su retención en una fase sólida y posterior elución con un disolvente apropiado. [Thurman, E. M., 1998; Bulletin 910, 1998; Colin, F. y Col., 2002; Solid phase extraction, 2005]

Los mecanismos de retención incluyen interacciones (dipolo – dipolo), formación de puentes de hidrógeno, fuerzas de dispersión hidrófoba e interacciones electrostáticas (iónicas), lo cual dependerá de la composición de la fase sólida utilizada.

Los materiales utilizados para la extracción en fase sólida se encuentran en tres formatos básicos: discos, cartuchos y jeringas (figura 2).

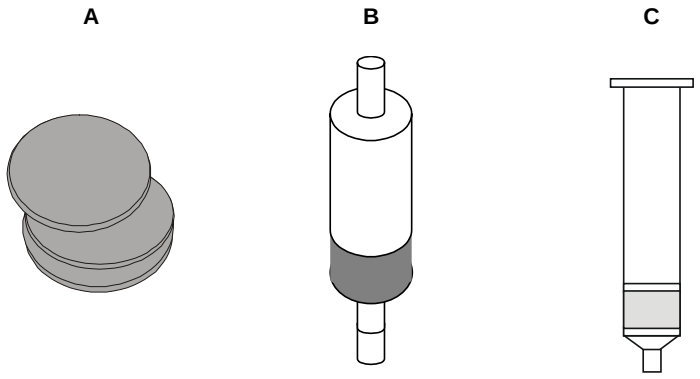


Figura 2. Formatos de los materiales para SPE: discos (A), cartucho (B) y jeringa (C). [Thurman, E. 1998]

Los cartuchos y las jeringas suelen construirse de polipropileno, el material absorbente estará contenido entre dos fibras de polipropileno o polietileno. Los discos se construyen introduciendo pequeñas partículas de adsorbentes (8 a 12 µm de diámetro), en una matriz inerte de fibras de politetrafluoroetileno (PTEE) o de fibra de vidrio. Los discos están disponibles en diferentes diámetros, desde 4 hasta 90 mm, el tamaño considerado “estándar” es de 47 mm. En las jeringas el volumen varía entre 1 y 25 mL y esto puede contener de 50 mg a 10 g de adsorbente. [Thurman, E. M., 1998]

Las etapas de trabajo de la extracción en fase sólida se encuentran en la figura 3 y se detallan a continuación.

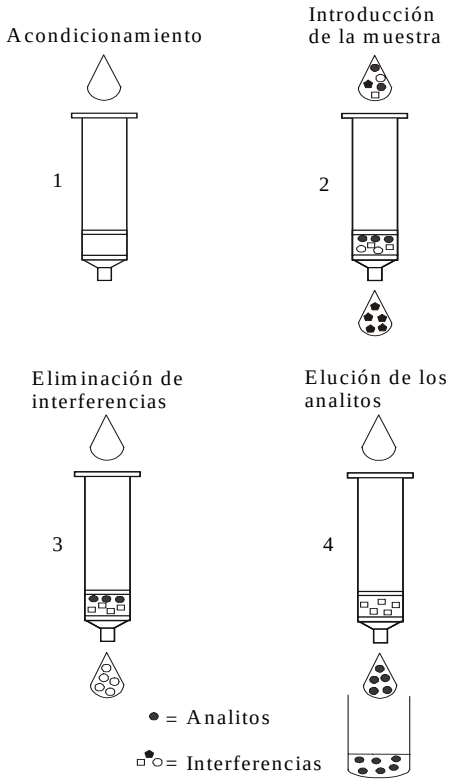


Figura 3. Proceso de extracción en fase sólida. [Thurman, E. M., 1998]

Pretratamiento de la muestra (si es necesario): consiste en una simple dilución para reducir la viscosidad, o ajustar pH para favorecer uno u otro mecanismo de retención, someter la muestra a un proceso de filtración para eliminar partículas sólidas, etc.

Acondicionamiento de la fase sólida: Es importante especialmente cuando se usan fases de baja polaridad, acondicionar el material antes de aplicar la muestra. El acondicionamiento consiste en humedecer la fase sólida con un disolvente orgánico, para crear una interfase que facilite la interacción de los analitos, contenidos en una matriz polar con el adsorbente. Para el acondicionamiento se recomienda utilizar alrededor de 1 mL de disolvente por cada 100 mg de adsorbente.

Paso de la muestra a través de la fase sólida: Puede hacerse por gravedad, aplicando presión o vacío, o por centrifugación. La elección de uno u otro método dependerá del tiempo y del volumen de muestra a analizar.

La magnitud del flujo de muestra a través del adsorbente condiciona el tiempo de interacción entre éste y el analito, por lo tanto el flujo tiene una marcada influencia sobre la eficacia de la extracción, lo que deberá ser tenido en cuenta durante el desarrollo del método.

Lavado (elución de interferencias): Consiste en lavar la fase con agua o con otro disolvente apropiado, para eliminar selectivamente componentes de la matriz que pudieran interferir en el análisis posterior.

Elución de los analitos: Una vez determinado el disolvente óptimo para eluir a los analitos, los puntos importantes a controlar son el flujo y el volumen de elución. Ambos deberán ser optimizados durante el desarrollo del método, teniendo en cuenta el mecanismo de retención. Por ejemplo, se conoce que con fase de intercambio iónico debe usarse flujos más bajos que con otras fases. Respecto al volumen de elución deberá utilizarse una cantidad mínima de disolvente con el objetivo de alcanzar el máximo factor de preconcentración. En muchas ocasiones resulta más eficiente eluir en dos pasos con X/2 mL de disolvente que en uno con X mL.

2.4.1.1. Aplicaciones de la extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida, desde su surgimiento, es una técnica muy empleada en el análisis de fármacos, metabolitos y contaminantes, entre otros, presentes en matrices complejas, como los fluidos biológicos y generalmente se emplea combinada con técnicas separativas como la cromatografía líquida y la cromatografía de gases. Ejemplo de estas aplicaciones se muestran a continuación.

Phillips, D. y Col. en 1990 determinaron ácido aminocaproico en orina de caballo mediante SPE con columna de sílice enlazada y cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. [Phillips, D. y Col., 1990] Smith, C. y Col. en el año 2002 determinaron en orina hidrocarburos aromáticos policíclicos aplicando hidrólisis enzimática, como segundo paso extracción en fase sólida, seguida de una derivatización del analito y finalmente cuantificación por cromatografía de gases con espectrometría de masas para la detección. [Smith, C. y Col., 2002] Baniceru, M. y Col. emplearon cartuchos de Chromosorb 104 (acrylonitrile–divinylbenzene polymer) para la extracción de mepivacaína en muestras de suero humano, con determinación por cromatografía de gases y detector de ionización por llama; obtuvieron recuperaciones de 95 %. [Baniceru, M. y Col., 2004]

Hasegawa, C. y Col. determinaron tres relajantes musculares (tlerisona, eperisona y tizanidina) en muestras de sangre total y orina utilizando cartuchos para SPE de C18 y cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo; obtuvieron recuperaciones entre 82 % y 97 %. [Hasegawa, C. y Col., 2005] Fox y Col. emplearon la combinación SPE y cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas para determinar en muestras de suero, plasma y sangre total fluoxiteno y norfluoxiteno; aumentando así la limpieza de los extractos y la sensibilidad y selectividad del análisis, obtuvieron recuperaciones de 96,5 % y 91,4 %, respectivamente. [http://www.innosep.cn/old/Research%202/2RP08.pdf]

En suero y orina, Stubbs, C. y Col. determinaron 2 antibióticos macrólidos (eritromicina y josamicina) empleando cartuchos con adsorbente de fase C18 para la SPE y cromatografía líquida para la

cuantificación. [Stubbs, C. y Col., 1990] Empleando el mismo tipo de cartucho y cromatografía líquida para el análisis, Casas, M. y Col. determinaron varios tipos de 1,4-benzodiacepinas y compuestos relacionados en muestras de plasma y orina en una sola corrida analítica, reduciendo considerablemente el tiempo y esfuerzo empleado. [Casas, M. y Col., 1992]

Chi Kong, L. y Col. en el año 1997 establecieron un procedimiento para "screening" toxicológico, optimizando por SPE el aislamiento de una gran cantidad de drogas (ácidas, básicas y neutras) para ser analizadas en suero y orina por cromatografía líquida, fase reversa, con detección ultravioleta-visible, empleando gradiente de elución. [Chi Kong, L. y Col., 1997] Con metodologías semejantes González, P.E. y Col. determinaron ciclosporina A en sangre total [González, P.E. y Col., 1997] y Castillo, A. y Col. carbofurano en diferentes matrices. [http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-Agrarias/A-030.pdf] Garlucci, G. y Col. compararon el empleo de cartuchos y discos para realizar la extracción en fase sólida (C18) del anticancerígeno mitomicina C en plasma humano y plasma ultrafiltrado con determinación por cromatografía líquida, obtuvieron mejores resultados de sensibilidad y limpieza de la muestra empleando los discos. [Garlucci, G. y Col., 1999]

En el año 2000 Bakalova, R. y Col. determinaron malondialdehído en muestras de tejido homogenizado y suero, empleando la combinación SPE y cromatografía líquida con un paso previo de derivatizacion del analito; con la aplicación de la SPE incrementaron significativamente la selectividad y el tiempo de vida de la columna cromatográfica. El límite de detección obtenido fue de 10 ng/mL. [Bakalova, R. y Col., 2000] Covaci, A. y Schepens, P. determinaron contaminantes organoclorados en fluidos biológicos humanos (suero, sangre, leche, semen y fluido folicular) empelando como adsorbente fase C18 para la extracción en fase sólida. [Covaci, A. & Schepens, P., 2001]

Römsing, S. y Col. en el año 2003 emplearon cartuchos Waters Oasis HLB para la extracción de melantonina en muestras de plasma humano y determinación por cromatografía líquida con detector fluorescente, realizaron determinaciones por debajo de los 0,10nmol/L. También probaron esta metodología en saliva y obtuvieron 50 pmol/L como límite de cuantificación [Römsing, S. y Col., 2003 I, II]

Para la separación de ácidos biliares, fosfolípidos y lípidos neutros, incluyendo ácidos grasos libres en muestras de fluido intestinal humano, Persson E. y Col. emplearon la SPE (C18) y cromatografía líquida, obtuvieron recuperaciones de más de 90 % y coeficientes de variación menores de 5 %. [Persson E. y Col., 2003] Jasińska, A. y Col. probaron dos adsorbentes (octadecyl (C_{18}), cyclohexyl (C_6H_{11})) para realizar la extracción de olanzapina en muestras contaminadas de albúmina y obtuvieron mejores recuperaciones que al emplear solamente cromatografía líquida con detector ultravioleta-visible. [Jasińska, A. y Col., 2005]

Un ejemplo de SPE automatizada y acoplada con cromatografía líquida (detector fluorescente) fue utilizada por Mulder, E. y Col. para determinar ácido 5-hidroxindol-3-acético en orina, demostrando más precisión en los resultados y menos tiempo de análisis que con la extracción líquido-líquido.

[Mulder, E. y Col., 2005] Ondra, P. y Col. analizaron las posibilidades y dificultades de identificar y determinar nuevos hipnóticos (flunitrazepan y zoldpen) en sangre empleando extracción líquido-líquido y SPE. [Ondra, P. y Col., 2005]

2.4.2. Extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) [Technical Note[111]. Argonaut Technologies. Inc. 2002]

La dispersión en matriz sólida (MSPD) es una técnica de preparación de muestras usada para matrices sólidas, semisólidas e incluso muestras líquidas. Inicialmente fue desarrollada para extraer residuos veterinarios de matrices biológicas complejas tales como hígado, músculo y carne, pero en trabajos posteriores se ha demostrado la aplicabilidad de la técnica para extraer analitos orgánicos tales como drogas, esteroides y pesticidas de otros tipos de matrices.

Este procedimiento supera las desventajas de otros métodos de extracción al requerir poca manipulación de la muestra, emplear cantidades pequeñas de muestra y bajos volúmenes de disolventes. Las etapas de trabajo se muestran en la figura 4 y se detallan a continuación.

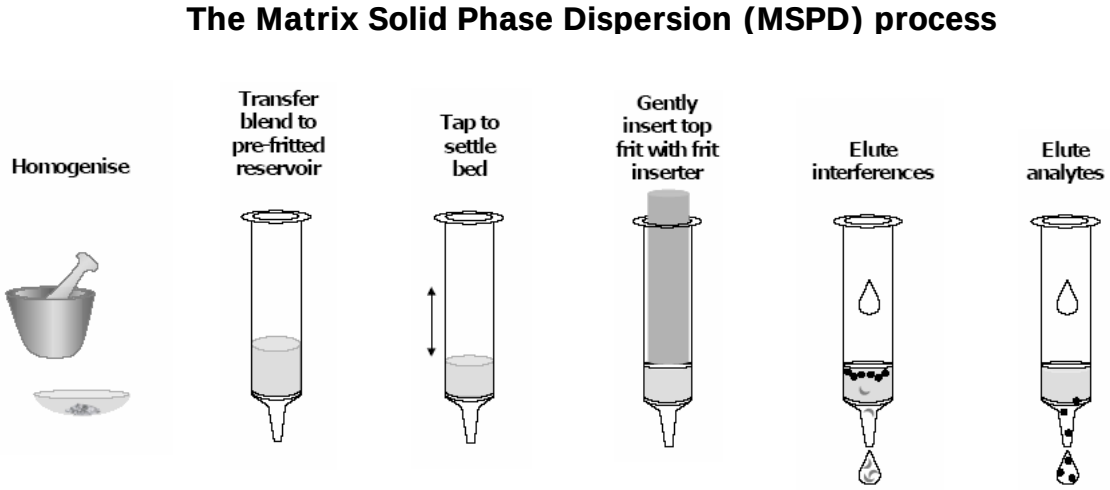


Figura 4. Esquema que representa los pasos de la técnica de MSPD. (Steven Barker, Austin Long and Charles Short. Lousiana State University. 1989 (U.S. patent # 5,272,094, issued Dec. 21, 1993)).

Pre-tratamiento de la muestra: La cantidad típica de muestra que se usa es 0,5 g, sin embargo, la concentración prevista del analito y los límites de detección de la técnica analítica se deben considerar durante el desarrollo del método. La muestra se debe colocar en un mortero de vidrio, y adicionar el adsorbente en proporción 1:4, aunque esta relación puede variar en dependencia del contenido de líquido en la matriz. A continuación se mezcla suavemente con la ayuda de un pistilo, las fuerzas mecánicas que se crean producen en el proceso de molienda la ruptura de la estructura del tejido, dispersando la muestra en el material adsorbente con la ayuda de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Finalmente se obtiene un polvo seco, uniforme y de flujo libre, lo que facilita su transferencia a una columna (jeringuilla) que contiene una frita inferior. Se recomienda

golpear ligeramente la columna mientras se treansfiere el polvo para conseguir un adecuado empaquetamiento.

Elución de interferencias: Su propósito es eliminar selectivamente compuestos indeseables que pudieran entorpecer la etapa de determinación analítica. Los disolventes típicos usados para la elución de interferencias son agua desionizada, metanol o acetonitrilo, entre otros. En sentido general, según la composición de la matriz utilizada, así será la variedad de disolventes a emplear.

El volumen de disolvente para el lavado puede disminuirse - e incluso obviarse este paso- con el uso de una co-columna compuesta por un material que tenga afinidad por las interferencias contenidas en la matriz biológica, de forma tal que cuando se proceda a la elución del analito el eluato no contenga interferencias o que, al menos, haya que aplicar un menor número de pasos de lavado. Esta co-columna se coloca en la parte inferior del cartucho.

Elución del analito: El disolvente de elución debe ser uno en el cual los analitos sean solubles y debe también ser compatible con la técnica final del análisis. Por ejemplo, para un análisis en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), un disolvente similar a la fase móvil es una buena opción y un disolvente volátil se selecciona generalmente para el análisis en cromatografía de gases (GC). Los disolventes típicos de elución son metanol, acetona, diclorometano, acetonitrilo u otros disolventes o mezclas de disolventes. Si el disolvente usado para la elución es inadecuado para el análisis por GC, HPLC u otra técnica, puede ser evaporado hasta sequedad después de la elución, redisolviendo el residuo seco en un disolvente más apropiado.

2.4.2.1. Aplicaciones de la extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD)

A pesar de que la MSPD lleva algunos años aplicándose, con muy buenos resultados, en matrices complejas y para una gran variedad de analitos, a diferencia de la extracción en fase sólida, no se encuentran en la literatura muchos reportes de su aplicación en fluidos biológicos como sangre, suero, plasma, semen, saliva, etc., lo que demuestra que es un tema no agotado completamente y que merita su estudio.

La combinación de la extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y la cromatografía para la cuantificación de analitos en matrices complejas ha sido ampliamente utilizada en los últimos años. Tanto la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como la cromatografía de gases (GC) han visto ampliadas sus utilidades.

La combinación de MSPD y HPLC se ha aplicado en diversos tipos de matrices y para disímiles analitos.

McGrane, M.*;* O'Keeffe, M. y Smyth, M. analizaron 5 penicilinas en leche. [McGrane, M. y Col., 1998] Otros antibióticos como macrólidos y lincomicina han sido determinados en leche y yogurt. [Bogialli, S. y Col., 2007] En el año 2007 se detectaron y cuantificaron 6 sulfonamidas en carne de cerdo y pollo. [Kunihiro, K., 2007]

Arribas, A. y colaboradores analizaron herbicidas en papas. [Arribas, A. y Col., 2007] En el año 2006 se determinaron 4 herbicidas (simazine, atrazine, diuron y terbuthylazine) en aceite de oliva. [García – Reyes, J.F. y Col., 2006] También en frutas (manzanas, naranjas, plátano, lechuga, uva y tomate) hay reportes de la determinación de residuos de fungicidas. [Wang, S.; Xu, Y.; Pan, C.; Jiang, S. & Liu, F., 2006] En sebo de carne y pollo Furusawa, N. llevó a cabo la separación de dichloro – diphenyl – trichlorothanes que son contaminantes de estas matrices. [Furusawa, N., 2006] Otros autores realizaron el aislamiento y purificación de compuestos del ácido benzoico en muestras naturales de *Melissal officinalis*. [Karasová, G., 2006] En el año 2005 Ruiz determinó microcystins (MCs)-MC-LR en hígado y riñón. [Ruiz, M., 2005] En ocasiones se compara más de una técnica de extracción, como es el caso de la determinación simultánea de imidacloprid 6 – chloronicotinic acid, carbaryl, sulfoxide aldicard y sulfone aldicard en las abejas melíferas por las técnicas de MSPD y LLE (extracción líquido-líquido) donde se llegó a la conclusión que la técnica MSPD mostró recuperaciones más altas y se obtuvo una mayor sensibilidad que con la LLE para la mayoría de los pesticidas, menos para el carbaryl. [Totti, S., 2006]

La combinación de MSPD y CG también se ha aplicado en diversos tipos de matrices y para disímiles analitos. En la mayoría de los casos se emplea detección por captura electrónica aunque la espectrometría de masas es también muy empleada.

Li-Bin, L. y colaboradores determinaron pesticidas en comidas (papas, zanahorias, manzanas, naranjas, pepinos y arroz) al igual que Dórea, H.S. y Lima Sobrinho, L**.** [Li-Bin, L. y Col., 2007; Dorea, H.S y Lima Sobrinho, L., 2004] Otros investigadores en el año 2003 habían empelado la misma metodología en nueces. [Husain, S.W. y Col., 2003] Valsamak, V.I.; Boti, V.I.; Sakkas, V.A. y Triantafyllos, A. aplicaron estas técnicas para determinar 20 pesticidas organoclorados y 8 bifenilos policlorados en huevos del pollo. [Valsamaki, V.I. y Col., 2006] En muestras biológicas que contenían grasa, Martínez y colaboradores utilizaron esta combinación para determinar 6 ésteres bifenilos polibromados (PBDES) y 7 bifenilos policlorados (PCBS). [Martínez, A. y Col., 2005] Gizaand y Sztwiertnia, U. determinaron azoxytrobin y trifoxytrobin en pulpa de manzanas. [Gizaand, I. y Sztwiertnia, U., 2003]

Ferrer, C.; Gómez, M.J.; García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba, A.R., determinaron 12 pesticidas que pueden encontrarse en aceite de oliva y aceitunas haciendo uso de la misma técnica MSPD y cuantificación por GC-MS y LC-MS, obteniendo los mejores resultados con GC-MS. [Ferrer, C. y Col., 2005] En el año 2005 se determinaron 266 pesticidas en jugo de manzana, utilizando la técnica MSPD y el método GC-MSD. [Chu, X.; Hu, X.; Yao, H., 2005] Lehotay, S.J.; Mastovská, K. y Yun, S.J. determinaron 32 pesticidas en leche, huevos y aguacate, ellos utilizaron dos técnicas de extracción, la QuEchERS (método mini-multiresiduo para el análisis de residuos de pesticidas en productos poco contaminados) y la MSPD y dos métodos de análisis: cromatografía de gases y cromatografía líquida, compararon las dos técnicas y llegaron a la conclusión que los mejores resultados se obtienen con la dispersión en matriz sólida. [Lehotay, S.J; Mastovska, K.; Yun, S.J., 2005]

La MSPD ha demostrado ser aplicable al aislamiento de drogas, pesticidas y otros contaminantes de los tejidos animales, frutas y verduras, en unión de técnicas separativas como la cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficacia. En estos casos los detectores más ampliamente utilizados son captura electrónica para cromatografía de gases y espectrometría de masas tanto para cromatografía líquida como de gases.

2.5. Técnicas analíticas cromatográficas empleadas en la determinación de fármacos en matrices biológicas

2.5.1. Generalidades de la cromatografía [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F., 2001]

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia. Se pueden separar las moléculas en función de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, sus constantes de ionización o en función de la disposición de sus enlaces. Como resultado, hay una gran cantidad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia, la cual tiene lugar en gases, líquidos y fluidos supercríticos.

Las técnicas cromatográficas se fundamentan en el empleo de una columna de cromatografía consistente en un tubo relleno con un material sólido sobre cuya superficie se enlazan las moléculas, conocido como soporte sólido, sorbente, fase estática, materia empaquetada o fase estacionaria. La muestra se introduce en una fase fluida en movimiento -un líquido o gas- denominada fase móvil. La fase móvil transporta la muestra a través de la fase estacionaria proporcionando la separación. Las interacciones físicas tienen lugar en la superficie de la fase estacionaria con la misma superficie del soporte sólido, con líquidos que estén en contacto con esa superficie o con moléculas enlazadas a dicha superficie.

En los análisis modernos es posible detectar los componentes separados midiendo los cambios que se producen en una serie de diferentes propiedades físicas o químicas: conducción de corriente eléctrica, absorción de luz y habilidad para conducir el calor, por citar solo algunos. Para esto se utiliza el detector.

El detector registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasa por él. (El cambio sucede a medida que cada componente llega, fluye a través de la columna y pasa por el detector). Estos cambios son producidos en forma de gráfica observándose la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo. Esta gráfica que recoge la respuesta del detector en función del tiempo se denomina cromatograma.

La gran aplicabilidad de los métodos cromatográficos se debe a la amplia variedad de condiciones en que pueden utilizarse para separar los componentes de una sustancia. Se pueden utilizar

distintas fases móviles (gases, líquidos o fluidos supercríticos) y distintas fases estacionarias (mineral, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos).

En cromatografía la separación de una sustancia tiene lugar en gases, líquidos o fluidos supercríticos, de ahí la denominación de cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), respectivamente.

2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F., 2001]

El gran poder y utilización de la cromatografía líquida reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores, por eso la cromatografía líquida trata una gran cantidad de combinaciones.

La separación por cromatografía líquida no se produce por un único tipo de interacción entre los analitos y la fase estacionaria, siempre existen otras interacciones, pero la predominante indicará el tipo de cromatografía.

A partir de los inicios de la década del sesenta nació la técnica de HPLC que ha jugado un papel fundamental en los laboratorios tanto analíticos como de química orgánica y bioquímica. Dentro de todas las variedades que puede tener esta técnica, una ampliamente utilizada y de interés en este trabajo es la cromtorafía líquida en fase reversa.

2.5.2.1. Cromatografía líquida en fase reversa [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F. 2001]

En la cromatografía en fase reversa la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La fase estacionaria que más se utiliza está formada por grupos no polares unidos a la sílice, siendo el más utilizado el grupo orgánico $-C_{18}H_{37}$ (grupo octadecilo), aunque también se utilizan $-C_2H_5$ y $-C_8H_{17}$. Para denominar a este tipo de fase estacionaria se usan las abreviaturas C-18, C-2 y C-8, respectivamente. Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice. Cuanto más larga sea la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve menos polar. Como resultado las cadenas más largas interaccionan con más fuerza con los solutos que se disuelven en fases orgánicas.

La unión de estas cadenas largas sobre la superficie no es completa, o sea, parte de la superficie de la sílice queda entre las regiones de la superficie hidrófoba, esto hace que disminuya la eficacia de la separación, produciendo ensanchamientos o colas en los picos. Para mejorar la superficie de la fase reversa, estas áreas se recubren, lo que significa que en una segunda reacción, grupos orgánicos de cadena corta ($-CH_3$) se unen a la superficie en la que los grupos de cadena larga no se habían unido.

Los enlaces silicio-oxígeno se pueden hidrolizar en medio básico, o sea, la sílice se disuelve lentamente en fases móviles de elevado pH, esto provocaría que el grupo orgánico unido a ella se desprenda de la superficie, dejando expuesta una superficie de sílice de la fase normal, por lo que en las mismas condiciones experimentales, los índices de retención pueden cambiar con el tiempo cuando se modifique la superficie. Con el fin de mantener constantes las condiciones de separación, se pueden añadir al eluyente grupos orgánicos que se unan fuertemente, aunque no covalentemente, a la superficie de la sílice. Estos reactivos orgánicos se retienen en la superficie de la sílice que no estaba recubierta y, como consecuencia, se regenera continuamente el recubrimiento. Ejemplos de tales aditivos son las aminas, como la trietilamina.

La cromatografía en fase reversa es relativamente popular, ya que en las separaciones los picos tienden a ser agudos y simétricos. Aquí los disolventes poco polares son los eluyentes más poderosos.

2.5.2.2. Instrumentación [Cela, R., 2002]

En la figura 5 se observa el diagrama esquemático de la instrumentación necesaria y recomendable en HPLC.

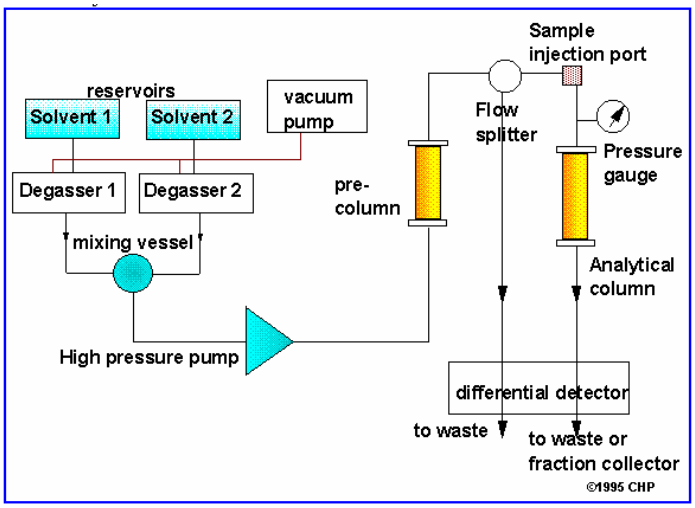


Figura 5. Esquema de un instrumento de HPLC [http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm]

Un sistema moderno de cromatografía líquida está compuesto por cuatro elementos básicos:

- Un sistema capaz de gestionar e impulsar la fase móvil y que consta de:

• Sistema de almacenamiento, es decir, contenedores que garanticen la disponibilidad de fase móvil al sistema en condiciones apropiadas de modo que se evite la degradación o contaminación de los disolventes empleados para estos fines.

• Desgasificador, el cual se encarga de eliminar la presencia de gases disueltos en la fase móvil. El más usado es el que consiste en aplicar vacío en el exterior de un tubo o membrana porosa insertado en el conducto de los disolventes.

- Bomba para impulsar la fase móvil, las más usuales en los laboratorios son las de doble pistón recíproco.

- Mezclador, el cual se emplea cuando se precisa modificar la composición de la fase móvil durante la elución, actualmente los más empleados son los sistemas de mezcla en baja presión ya que son mucho más favorables económicamente al utilizar una sola bomba.

- La columna cromatográfica.

Se construyen normalmente en acero, aunque también las hay construidas en vidrio, material polimérico y en el caso de microcolumnas, de sílice fundida. El material de relleno se mantiene en el interior del tubo mediante cierres porosos de metal o vidrio. Este material de empaquetamiento sirve para construir el lecho cromatográfico pudiendo o no estar implicado en los procesos de separación. Cuando la fase estacionaria es líquida el material sólido actúa simplemente como soporte de dicha fase líquida. En otras ocasiones el material sólido se modifica de manera que interviene directamente en el mecanismo de separación. La sílice es el soporte más habitual en HPLC, debido a sus especiales características mecánicas y químicas: una parte importante del material consiste en poros, que en su mayoría parecen estar interconectados, el esqueleto del material entre los poros es extremadamente delgado, a pesar de lo cual resiste la presión ejercida por la fase móvil, puede prepararse con una distribución de tamaño de partícula bastante restringida que proporciona buenos empaquetados de columna. Tiene la limitación de su estabilidad a pH alcalino, por lo que no se recomienda su utilización con fases móviles a pH superior a 8.

- Un sistema que permita la inserción de las muestras.

- Sistema de inyección de la muestra: las válvulas de inyección rotatorias son las más empeladas debido a su mayor simplicidad para efectuar el cambio de posiciones y sus menores exigencias en cuanto a materiales, por lo que son menos costosas que otros sistemas (figura 6).

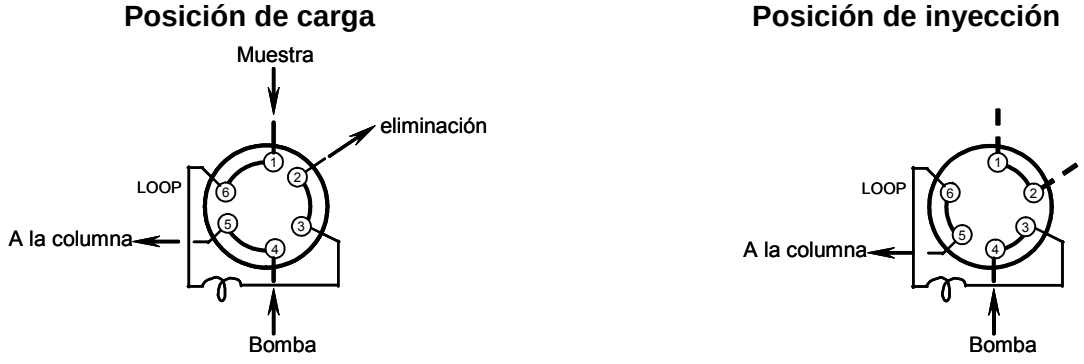


Figura 6. Esquema de válvula para inyección de muestras en HPLC.

- Un sistema capaz de informar del resultado de la separación.

• Detectores: su función es proporcionar información sobre la presencia de las especies separadas en la columna cromatográfica, al no existir un detector universal deberá elegirse uno en función de las características de las especies de interés o bien si no se dispone del más adecuado, derivatizar las especies para hacerlas detectables con la instrumentación disponible.

Dentro de los tipos de detectores empleados se encuentran de fluorescencia, de índice de refracción diferencial, amperométrico, de conductividad, de dispersión de luz, etc. Pero sin dudas el más utilizado en los laboratorios analíticos es el de absorción UV/Visible, ya que la mayoría de las moléculas orgánicas absorben radiación en esta región del espectro, además posee una excelente sensibilidad. Actualmente se dispone de una amplia variedad de instrumentos que permiten desde la detección a una longitud de onda fija hasta los sistemas de matriz de fotodiodo que permiten el registro en tiempo real del espectro de los compuestos eluidos de la columna.

2.5.3. Cromatografía de gases (GC) [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F. 2001; Cela R., 2002]

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que la fase móvil es un gas; comúnmente se emplean helio y nitrógeno, mientras que la fase estacionaria, contenida en una columna, es un sólido o un líquido impregnado en un soporte sólido inerte, o una película líquida que recubre uniformemente las paredes de la columna, en ella se produce la separación de los solutos.

Cuando la fase estacionaria es de baja polaridad la separación se produce en base a la volatilidad relativa de los compuestos, la cual está en función de la temperatura de ebullición y esta a su vez está en correspondencia con la masa molar y la distribución espacial de la molécula.

La cromatografía de gases es el método de elección para la separación de sustancias volátiles y térmicamente estables. Este campo de aplicación involucra un enorme número de sustancias orgánicas y organometálicas, así como gases permanentes, lo cual convierte a la técnica en una de las más versátiles y potentes en el laboratorio analítico.

Ninguna otra técnica de separación es capaz de proporcionar una resolución equivalente y a la vez, una sensibilidad tan elevada. Esto significa que, en realidad, la principal limitación de la técnica está en la estabilidad térmica de los componentes de la mezcla o de la propia matriz.

2.5.3.1. Instrumentación [Skoog, D. & Leary, J.; 1994]

La cromatografía de gases se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno) y el detector, figura 7.

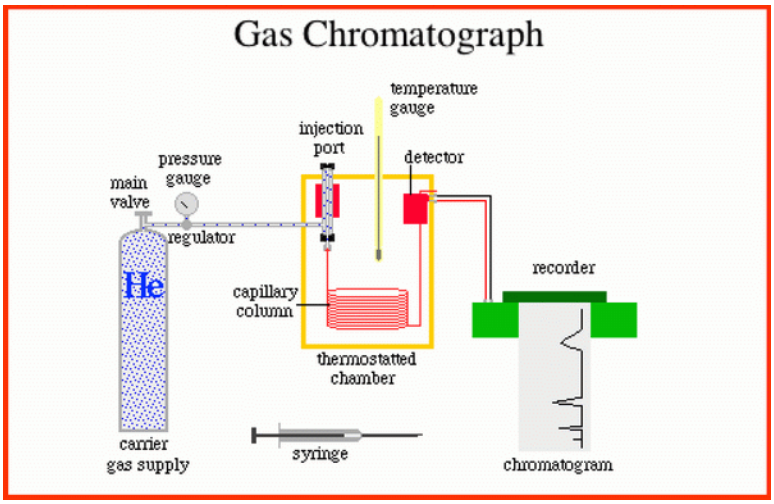


Figura 7. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

Sistema de inyección de muestra [Skoog, D. & Leary, J., 1994]

La inyección de la muestra es un apartado crítico, se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara debe estar a 50 ºC por encima de la temperatura de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona llamado septa o septum, figura 8.

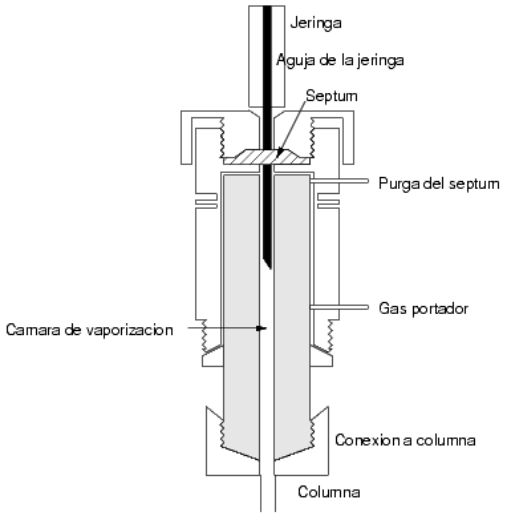


Figura 8. Inyector de muestra para un cromatógrafo de gases (GC).

Columna [Skoog, D. & Leary, J., 1994]

La columna es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo. En la cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y

las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes en la actualidad (año 2005) debido a su mayor rapidez y eficacia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 50 metros. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o sílice fundida. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

Hay numerosos factores que afectan la eficacia de una columna, entre ellos los más importantes son: su longitud, diámetro, temperatura, material del cual está elaborada y enrollado, tamaño de las partículas del relleno, naturaleza de las fases, cantidad de fase estacionaria, velocidad del gas portador y cantidad de muestra inyectada.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un peróxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres que tiene como resultado la formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica.

Detectores [Skoog, D. & Leary, J., 1994]

En cromatografía de gases un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal de tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará y se obtendrá mediante un registrador gráfico o integrador, permitiendo indicar el momento que eluyen de la columna los componentes.

Entre los detectores que se emplean en cromatografía de gases se encuentran el detector de conductividad térmica, el de ionización por llama, el de captura electrónica, el de fotometría de llama, el de nitrógeno – fósforo, el de ionización de llama alcalina y el detector de espectrometría de masas, entre otros.

De ellos hay dos ampliamente utilizados y de interés en este trabajo: el de ionización por llama y el de captura electrónica.

- El detector de ionización por llama es prácticamente un detector universal que funciona mediante la pirólisis del efluente en una llama de hidrógeno/aire con exceso estequiométrico de oxígeno. En ausencia absoluta de compuestos no se producen iones, pero cuando pasan por el detector componentes separados de la muestra, estos reaccionan en la llama para producir cationes y electrones en la corriente del efluente. Las especies cargadas conducen la electricidad entre dos electrodos convenientemente colocados y entre los cuales existe diferencia de potencial. Cuanto

más carbonos tenga la molécula, más fragmentos se producirán y más sensible será el detector a ese compuesto. La corriente generada se amplifica para producir la respuesta.

En la figura 9 se observa el esquema de funcionamiento de un detector de ionización por llama.

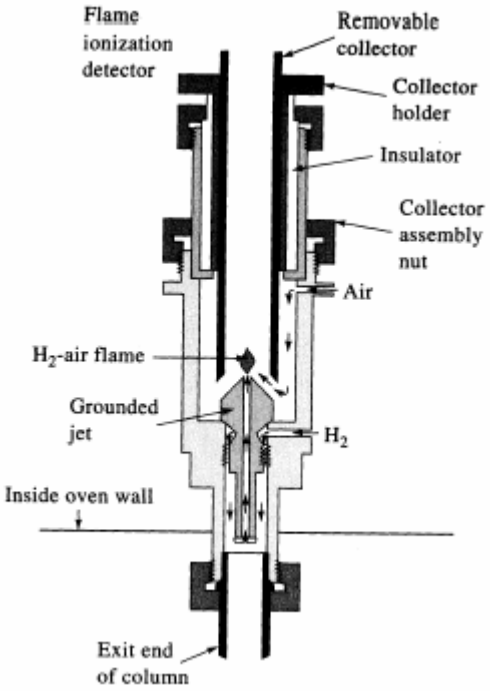


Figura 9. Esquema de un detector de ionización por llama.

• El detector de captura electrónica consiste en una cavidad que contienen dos electrodos y una fuente de radiación. Las colisiones entre los electrones (emisión B) emitidos por la fuente de ^{63}Ni o ^{3}H y el gas portador (metano más argón o más nitrógeno), producen un plasma que contienen electrones e iones positivos y estos electrones son atraídos hacia el ánodo. Cuando pasa por el detector un compuesto que contiene átomos electronegativos, algunos de los electrones serán capturados, produciendo iones negativos y la corriente de electrones hacia el ánodo disminuirá. El primer detector de captura electrónica utilizaba una fuente de CC con un potencial constante, pero los instrumentos modernos utilizan pequeños pulsos para atraer a los electrones. Estos pulsos son lo suficientemente largos como para recoger los electrones más móviles, pero no los iones más pesados y lentos .Este método produce una distribución más uniforme de iones en plasma, lo que por otro lado, desencadena una respuesta más estable y un intervalo lineal mayor. La manera más normal de utilizar estos pulsos es definir una corriente constante que se mantenga y después un circuito de realimentación ajusta la frecuencia de los pulsos para mantener la corriente deseada (figura 10).

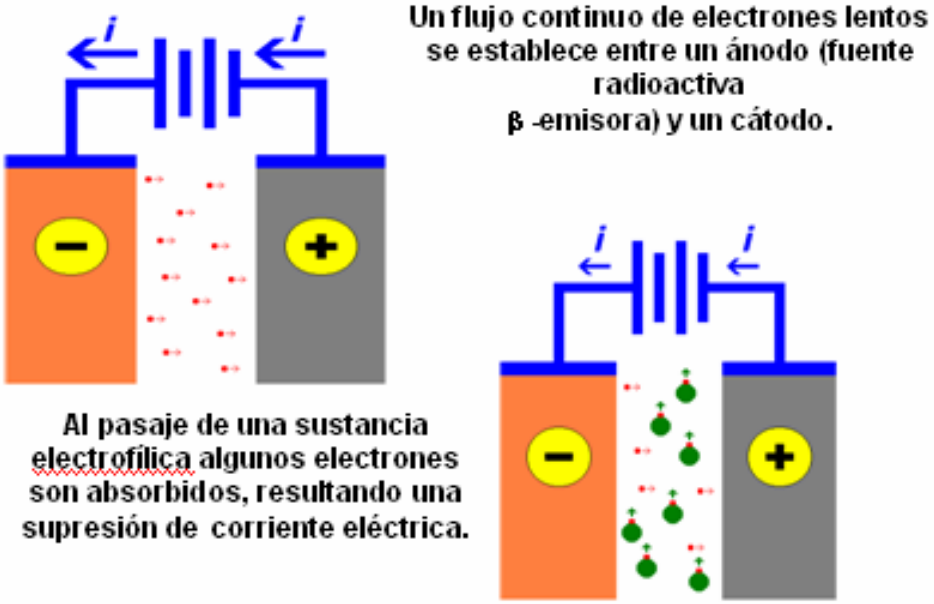


Figura 10. Principio de funcionamiento del detector de captura electrónica.

Los factores de respuesta de un detector de captura electrónica son función del tipo y del número de átomos electronegativos que existen en una molécula determinada. Por ejemplo, la respuesta para un compuesto orgánico policlorado como los que se encuentran en los pesticidas puede llegar a ser un millón de veces más grande que la de un hidrocarburo. De hecho la selectividad y sensibilidad de un detector de captura electrónica es ideal para el análisis de muestra que contienen trazas de estos compuestos.

2.6. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; ICH., 2005]

Validación de un método analítico: Es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requerimientos para la aplicación analítica deseada. [Castiñeira Díaz, M., & González San Miguel, H.M., 2002; ICH., 2005]

Existen características de funcionamiento que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina. Dichas características son las siguientes.

Características de practicabilidad: Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Características de idoneidad: Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.

Características de fiabilidad: Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación y selectividad.

2.6.1. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico, es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (la cantidad) de analito en la muestra. [ICH., 2005]

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta, así como los intervalos de concentración del analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona además, con la sensibilidad de calibrado o coeficiente diferencial entre la señal medida y la concentración del analito. Debe definirse la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Fernández, A., 1996]

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre disoluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito. El número de disoluciones 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. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Fernández, A., 1996]

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos:

Se debe efectuar una interpretación estadística de la regresión:

a) Coeficiente de correlación (r)

Refleja el grado de relación entre las variables *X* (concentración), y *Y* (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte relación entre *X* e *Y*, es decir, existe correlación con una probabilidad elevada.

$$r = \frac{\sum (X - \bar{\bar{X}})(Y - \bar{\bar{Y}})}{\sqrt{\sum (X - \bar{\bar{X}})^2 \sum (Y - \bar{\bar{Y}})^2}} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) - \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}} \qquad (1)$$

En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien en el análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990). [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996].

b) Ensayos de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

I. Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f).

El factor de respuesta es la relación existente entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente, por lo que el coeficiente de variación de respuesta puede tomarse como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5 % indican falta de linealidad. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

Factores de respuesta: $f_i = \frac{Y}{X}$ (2)

Media de *f:* $\bar{f} = \frac{\sum f_i}{n}$ (3)

Desviación estándar de *f*: $Sf = \sqrt{\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1}}$ (4)

Coeficiente de variación de *f:* $CVf = \frac{Sf}{\bar{f}} 100$ (5)

II. Significación estadística de la varianza de la pendiente b de la recta de regresión.

La pendiente b se llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

La varianza de la pendiente S^2b se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor varianza mejor linealidad. Se determina según:

$$Sb^2 = \frac{S^2Y,X}{\sum (X - \bar{X})^2} = \frac{S^2Y,X}{\sum X^2 - \frac{\left(\sum X\right)^2}{n}} \quad (6)$$

Siendo S^2Y, X la varianza del error experimental total, varianza residual o varianza de regresión de *Y* sobre *X*.

El valor de S^2Y, X se obtiene mediante las ecuaciones siguientes:

$$S^2Y,X = \frac{\sum (Y-\bar{Y})^2 - \left(\sum (X-\bar{X})(Y-\bar{Y})\right)^2 \Big/ \sum (X-\bar{X})^2}{n-2} = \frac{\sum Y^2 - a\sum Y - b\sum XY}{n-2} = \frac{\sum (Y-\bar{Y})^2}{n-2}(1-r^2) \quad (7)$$

La desviación estándar o error estándar de la pendiente *Sb* y la desviación estándar relativa Sb_{rel} *(%)*, también pueden ser empleadas para expresar la linealidad. Sus fórmulas son:

$$Sb = \sqrt{Sb^2} \quad (8)$$

$$Sb_{rel}(\%) = \frac{Sb}{b}100 \quad (9)$$

Criterio de aceptación Sb_{rel} *(%)* ≤ 2%.

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión: $b \pm tSb$ siendo *t* el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida (p = 0,05)

Otro test estadístico de *b* se deduce de la expresión:

$$t_{\exp} = \frac{|b|}{Sb}. \quad (10)$$

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. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

c) Ensayo de proporcionalidad

En el caso ideal el valor de la intercepción con el eje de ordenadas: valor de (a) debe ser cero pues indica el error sistemático del método.

La varianza del término independiente se calcula según:

$$Sa^2 = Sb^2 \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2Y, X}{\sum X^2 - \frac{\left(\sum X\right)^2}{n}} \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2Y, X}{\sum \left(X - \bar{X}\right)^2} \frac{\sum X^2}{n} \quad (11)$$

Siendo S^2Y, X la varianza del error experimental total.

La desviación o error estándar del término independiente es:

$$Sa = \sqrt{S^2{}_a} \quad (12)$$

$$Sa_{rel}(\%) = \frac{Sa}{a}100 \quad (13)$$

I. 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 estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

II. La significación estadística de *a* se puede deducir también de la expresión:

$$t_{\exp} = \frac{|a|}{Sa} \quad (14)$$

En la tabla de t se halla el grado de significación para n-2 grados de libertad. Hipótesis nula a = 0. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

2.6.1.1. Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado, o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito, es igual al valor de la pendiente de la curva de calibrado a una concentración determinada. En el caso de una calibración lineal, la pendiente *b* de la recta de regresión coincide con la sensibilidad de calibrado y con el factor de respuesta. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

La sensibilidad indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones en la concentración del analito.

En un método analítico sensible, ligeros incrementos de concentración conducen a incrementos notables de señal o respuesta.

2.6.1.2. Valores aceptables de los parámetros de linealidad [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

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

b. Coeficiente de correlación: $r \geq 0{,}99$

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

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

2.6.2. Exactitud [ICH., 2005]

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta como un valor verdadero o un valor de la referencia aceptado y el valor hallado.

Si esta diferencia es pequeña, la exactitud es buena. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Fernández, A., 1996] La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto.

Las desviaciones por exceso pueden ocurrir cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es adecuada. En este caso debería modificarse el método para hacerlo más efectivo. Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos muy laboriosos, con varias 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 el porcentaje es bajo, se pueden utilizar factores de corrección en los cálculos finales que compensen la pérdida de analito, debidas a las manipulaciones previas. [Castro, M., 1989]

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero.

En un método analítico el recobrado del analito no tiene que ser necesariamente 100 %, pero la extensión de recobrado de un analito y del estándar interno debe ser consistente, precisa y reproducible. [FDA, 2001]

2.6.3. Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas.

Debe investigarse la precisión utilizando muestras homogéneas, auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea se emplean muestras artificialmente preparadas o una disolución de la muestra.

La precisión puede ser considerada a tres niveles: la repetibilidad, la precisión intermedia y reproducibilidad. [ICH., 2005]

- Repetibilidad: expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un corto intervalo de tiempo. También se conoce como precisión de intra-ensayo. [ICH., 2005]

- Precisión intermedia: expresa las variaciones dentro del laboratorio: días diferentes, diferentes analistas, diferentes equipos. [ICH., 2005]

- Reproducibilidad: expresa la precisión entre los laboratorios (estudios colaborativos, normalmente aplicado a la estandarización de metodología). [ICH., 2005]

Expresión de la precisión de un método analítico:

a) Desviación estándar y coeficiente de variación

El valor aceptable de precisión de un método analítico depende de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

Media aritmética: $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$ (15)

Desviación estándar: $S = \sqrt{\frac{\sum \left(X_i - \bar{X} \right)^2}{n}}$ (16)

Coeficiente de variación: $CV = \frac{S}{\bar{X}} 100\%$ (17)

b) Límites de confianza [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

I. De los resultados individuales:

- Media más-menos la desviación estándar ($\overline{X} \pm S$) (18)

- Media más-menos dos veces la desviación estándar ($\overline{X} \pm 2S$) (19)

- Media más-menos la desviación estándar multiplicada por la *t* de Student

($\overline{X} \pm tS$) (20)

Estadísticamente esta última es la expresión más correcta ya que tiene en cuenta la distribución de Student cuando el número de réplicas es inferior a 30. Estando el valor de *t* de Student tabulada para n-1 grados de libertad y una significación, generalmente, del 95 %.

II. De los resultados promedio:

Los límites de confianza de la media de una serie de resultados son:

$$\overline{X} \pm tS_{\overline{x}} \quad (21)$$

siendo $S_{\overline{x}}$ la desviación estándar de la media $\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)$

Determinación de la repetibilidad: [ICH., 2005]

La repetibilidad debe evaluarse:

a) un mínimo de 9 determinaciones que cubren el intervalo especificado para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones/3 repeticiones de cada uno) o;

b) un mínimo de 6 determinaciones a 100% de la concentración de la prueba.

Determinación de la precisión intermedia: [ICH., 2005]

La extensión de este ensayo depende de las circunstancias en que se realice el procedimiento analítico. Las variaciones típicas que se pueden incluir son: día, analista, equipo, etc. No es necesario estudiar los efectos de estos factores de forma independiente. Puede realizarse a través de un diseño de experimento.

En cuanto a la precisión existen numerosos criterios sobre el coeficiente de variación máximo aceptable de un método analítico en función de los límites de aceptación del resultado, del número de réplicas, de las características de la muestra y de las propias características de método analítico.

Respecto a este punto la Food and Drug Administration en el 2001 destaca que en la validación de método bioanalíticos el coeficiente de variación no debe ser mayor de un 15 %, excepto para concentraciones cercanas al límite de cuantificación donde el coeficiente de variación no debe exceder el 20 %. [FDA, 2001]

2.6.4. Límite de detección y cuantificación [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F., 2001]

La precisión y la exactitud de un ensayo dependen sobre todo de tres factores: la magnitud de la señal del fondo (nivel constante de señal, también denominado línea base), la magnitud de la señal del analito y el nivel de ruido (fluctuación aleatoria indeseable que, dependiendo del tiempo, cambia el registro de la señal).

Estas ideas son cualitativas y raramente se incluyen en la información de los resultados, por lo que se necesitan parámetros cuantitativos de calidad como el límite de detección y cuantificación.

La ICH ha definido el límite de detección y el límite de cuantificación así: [ICH., 2005]

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud. Es un parámetro de ensayo cuantitativo para niveles bajos de compuestos en la muestra, y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

Determinación de los límites de detección y cuantificación:

Se pueden utilizar diferentes procedimientos:

a) Relación Señal / Ruido.

b) Estudio de la menor cantidad detectable.

c) Estimación del límite de detección mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración.

d) Análisis repetido del blanco de la muestra.

e) Extrapolación a concentración cero de muestras que contienen baja concentración de analito.

En el análisis repetido de un blanco se analizan una serie de blancos de la muestra ($n \geq 10$) y se calcula la media $\bar{y}_{bl}$ y la desviación estándar s_{bl} de las respuestas obtenidas.

Las fórmulas a utilizar varían en función de:

- El procedimiento: métodos con corrección de lectura frente al blanco o métodos sin corrección.

- El grado de ajuste de la recta de calibración.

- Del número de réplicas que se efectúan.

2.6.5. Especificidad [ICH., 2005]

La especifcidad es la capacidad de un método analítico de detectar inequívocamente el analito en presencia de compuestos que pueden estar presentes en la muestra (impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc).

Esto implica en ensayos de identificación asegurar la identidad del analito en cuestión y en ensayos cuantitativos asegurar que todo el procedimiento analítico ejecutado brinda una respuesta exacta del contenido del analito en la muestra.

La tendencia mayoritaria es la utilización de métodos relativamente específicos (cromatografía líquida y de gases) en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados.

La especificidad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipamiento

- Balanza analítica Sartorius BP121S, máx. 120 g, d = 0,1 mg.

- Centrífuga MLW T60.

- Cromatógrafo de gases PYE UNICAM SERIE 304 PHILIPS (Holanda), detector de ionización por llama y columnas de vidrio de 1 y 2 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas.

- Estufa HS62A regulada a 70 ºC.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC) Knauer, detector UV de longitud de onda variable y columna C-18 (Supelco) de dimensiones 15 cm x 4,6 mm, 5 µm y lazo de inyección de 10 µL.

- Baño ultrasónico Sonorex, modelo RK 52.

- Cromatógrafo de Gases DANI GC1000, con inyector split/splitless, detector de captura electrónica y columna capilar VB-5 (5% Fenil) metilpolisiloxano, Valcobond ®, de 30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 1,5 micras de espesor de película de fase estacionaria.

- Generador de Nitrógeno (fase móvil). Domnick hunter, (Dukesway, Team Valley Trading Estate, England), presión máxima: 145 psi.

3.2. 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.

- Plasma humano. Suministrado por el Banco de Sangre Provincial de Villa Clara (Anexo 3).

- Muestras puras de 5-bromofurfural, monobromado, G-0, UC-244 y UC-245 obtenidas en el Laboratorio de Síntesis del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas.

- Silicagel. Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,04 mm, Merck.

- Fase estacionaria C-18 (endcaped). Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,035 mm, Fluka.

- Acetona p.a., Merck.

- Acetonitrilo para HPLC, Panreac.

- Ácido clorhídrico fumante 37 % p.a., Quinsa.

- Ácido fórmico p.a., BDH.

- Ácido tricloroacético p.a., Fluka.

- Agua destilada y desionizada.

- Benzoato de bencilo p.a., Merck.

- Cloroformo p.a., Fluka.

- Cloruro de sodio p.a., BDH.

- Etanol clase A.

- n-hexano para cromatografía, Merck.

- Metanol p.a., Panreac.

- Ninhidrina p.a., Merck.

- Tetracloruro de carbono p.a., Panreac.

3.3. Materiales

- Mortero de ágata, 6 cm de diámetro con pistilo de ágata.

- Placas cromatográficas de sílica gel IB2 de 20 cm x 20 cm, Baker-flex.

- Placas cromatográficas de sílica gel 60 de 5 cm x 20 cm, Merck.

- Placas cromatográficas fluorescentes de sílica gel 60, F254, Merck.

- Jeringuillas plásticas de 10,0 mL.

- Viales plásticos tipo eppendorf con tapa, de 1,5 mL.

- Micropipetas Hamilton de 10 µL.

- Cámara de yodo para revelar en cromatografía de capa delgada.

- Atomizador para revelar en cromatografía de capa delgada con ninhidrina.

- Cámaras cromatográficas de 3 cm x 8 cm x 8 cm y 7,5 cm x 27,5 cm x 24,5 cm.

- Micropipetas Eppendorf de 20 µL – 200 µL y de 100 -1000 µL.

- Microjeringuillas Hamilton de 10 µL y 100 µL.

- Cartuchos *Supelclean*^{TM} *LC-18* de 3 mL, lote Sp2403J, SUPELCO.

- Tubos de ensayos vidrio de 3,5 mL, con tapa de teflón.

- Frascos de vidrio de 3,5 mL con tapa de teflón.

- Jeringuillas de vidrio de 1,0 mL.

- Agujas tipo 20G para jeringuillas.

- Material de uso habitual en el laboratorio.

3.4. Estudio de estabilidad de G-1 en plasma

3.4.1. Técnicas analíticas empleadas en el estudio de estabilidad de G-1 en plasma

3.4.1.1. Cromatografía de capa delgada (TLC)

Se utilizaron las condiciones descritas en el trabajo: Empleo de técnicas cromatográficas en la evaluación de impurezas del G-1. [Muro, D.; Morales, S. & Bravo, L., 1993]

Fase estacionaria: Placas de silicagel.

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

Volumen de inyección: 10 µL.

Revelador: cámara de yodo.

3.4.1.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas en el trabajo: Validación de la técnica de determinación por cromatografía líquida de alta eficacia del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control, [Laboratorio de C. Calidad, CBQ, 2005; Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S., 2007 I] en cuanto a tipo de columna (Supelco RP C-18 de 15 cm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvil (acetonitrilo - agua 80:20), flujo de fase móvil (0,3 mL/min) y volumen de inyección (10 µL).

En base a las características de absorción del G-1 en la región UV-Vis, se varió la longitud de onda de detección (254 nm en el procedimiento original), buscando la máxima sensibilidad de la determinación analítica.

3.4.2. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía de capa delgada (TLC)

Para este estudio se constituyó una muestra tomando 0,5 mL de plasma humano y añadiendo 0,5 mL de una disolución de G-1 a 200 mg/L en acetonitrilo : agua (50 : 50 % v/v). De esta forma el plasma contenía una concentración de G-1 de 100 mg/L. Esta muestra se conservó en frasco ámbar a temperatura ambiente y se analizó cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos el resto del tiempo, hasta completar tres horas.

En los análisis se utilizaron placas de silicagel de 3 cm x 7 cm, en las cuales se aplicaron 10 µL de muestra y de una disolución de referencia de G-1 (100 mg/L en hexano). Como revelador se empleó una cámara de yodo.

3.4.3. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La muestra de estudio se constituyó tomando 8 mL de plasma humano y añadiendo 8 mL de una disolución de G-1 a 1000 mg/L en acetonitrilo : agua (50 : 50 % v/v). De esta forma el plasma contenía una concentración de G-1 de 500 mg/L.

La muestra se conservó en frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 1 mL a tiempo cero; 15 y 30 minutos; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 22,5 y 49,5 horas. A cada alícuota se le añadieron 3 mL de acetonitrilo para desnaturalizar las proteínas [http://www.utadeo.edu.co] y la disolución sobrenadante se analizó por HPLC.

Con vistas a identificar los posibles productos de degradación se prepararon disoluciones de referencia de 5-bromofurfural y monobromado a 50 mg/L en acetonitrilo : agua (50 : 50 % v/v). Se añadió 1 mL de la disolución de 5-bromofurfural a la alícuota tomada a las 5,5 horas y 1 mL de la disolución de monobromado a la alícuota tomada a las 22,5 horas. A cada tubo se le añadió 3 mL de acetonitrilo para desnaturalizar las proteínas y la disolución sobrenadante se analizó por HPLC.

3.5. Determinación de G-1 en plasma mediante extracción en fase sólida (SPE) y cuantificación por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama (GC-FID)

3.5.1. Extracción en fase sólida (SPE)

En el desarrollo del método se trabajó en paralelo con muestras de plasma conteniendo G-1 y muestras de agua destilada, a las que también se adicionó G-1, con el objetivo de estimar la posible influencia de los componentes del plasma en los procesos de retención y elución del G-1 durante la extracción en fase sólida.

3.5.1.1. Preparación de las disoluciones

Se pesó con exactitud alrededor de 0,1000 g de G-1 y se disolvió en acetona en un matraz aforado de 10 mL (disolución A, concentración 0,01 g/mL). Se tomó una alícuota de 0,1 mL de la disolución A y se disolvió hasta 10 mL en matraz aforado con acetona (disolución B, concentración de 100 µg/mL).

3.5.1.2. Preparación de las muestras

3.5.1.2.1. Preparación de las muestras en agua destilada

A tres tubos de ensayo de 3,5 mL de capacidad que contenían 0,4; 0,3 y 0,2 mL de la disolución B se les adicionó 0,6; 0,7 y 0,8 mL de agua destilada, respectivamente, obteniéndose muestras con concentraciones de 40; 30 y 20 µg/mL de G-1. Los tubos se agitaron vigorosamente, de forma manual, durante un minuto para homogeneizar el contenido. Posteriormente, se añadió a cada muestra 0,2 mL de ácido tricloacético (25 %) para desnaturalizar las proteínas. [http://www.utadeo.edu.co] Las

muestras se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 2000 r/m. Se colectó el sobrenadante y se desechó el precipitado. Este proceso se repitió 8 veces para cada concentración.

3.5.1.2.2. Preparación de las muestras en plasma humano

Se repitió el procedimiento descrito en 3.5.1.2.1, sustituyendo el agua destilada por plasma.

3.5.1.3. Proceso de extracción

En las extracciones se utilizaron cartuchos *Supelclean™ LC-18* 3 mL, lote Sp2403J, SUPELCO.

3.5.1.3.1. Acondicionamiento del cartucho

Antes de la utilización de cada cartucho, es necesario someterlo a un proceso de acondicionamiento para solvatar y equilibrar el material adsorbente a fin de crear una interfase apropiada entre éste y la muestra, lo cual facilita la transferencia de los analitos y favorece su retención.

A los cartuchos se les pasó 3 mL de agua destilada para el acondicionamiento, este proceso se realizó gota a gota, acoplando jeringuillas de polietileno al extremo superior del cartucho mediante un adaptador diseñado al efecto (figura 11).

Una vez acondicionado el cartucho se utilizó sin dejarlo secar.

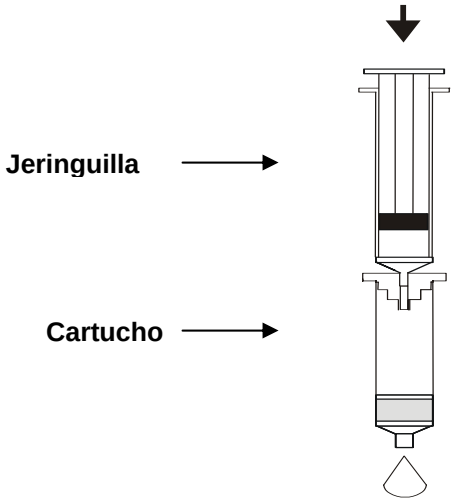


Figura 11. Montaje para el acondicionamiento del cartucho. Acoplamiento de la jeringa a la parte superior del cartucho

3.5.1.3.2. Extracción de las muestras

Las disoluciones sobrenadantes obtenidas según se describió en 3.5.1.2.2 se hicieron pasar a gravedad a través de los cartuchos de extracción, a continuación se secaron con corriente de nitrógeno, durante 1 hora. Seguidamente se eluyó el G-1 retenido en el cartucho con 2 mL de cloroformo.

Los eluatos se recogieron en recipientes de vidrio de 3,5 mL, con tapa de teflón, protegidos de la luz. Finalmente, se volatilizó el disolvente de extracción (cloroformo) mediante corriente de nitrógeno, para almacenar las muestras secas y refrigeradas, hasta el momento de la cuantificación.

3.5.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-FID

Teniendo en cuenta la técnica descrita por Bravo Sánchez, L. y col., [Bravo, L. y Col., 1999] se realizó el análisis del comportamiento cromatográfico a una disolución patrón de G-1 en acetona de 40 µg/mL, a partir del cual se adecuaron los parámetros: volumen de inyección, flujo, longitud de la columna, atenuación y rango. Para corregir los errores asociados a la inyección manual de las muestras se usó el benzoato de bencilo que es el estándar interno recomendado en dicha técnica. Se utilizaron las mismas temperaturas del horno (200 °C), del inyector (230 °C) y del detector (280 °C).

3.5.3. Validación del procedimiento de extracción (SPE) y determinación cromatográfica (GC-FID) de G-1 en plasma

Como el objetivo de este estudio fue solo demostrar la aplicabilidad de la técnica de SPE para la extracción de G-1 desde muestras de plasma, se realizó una validación reducida, donde se evaluaron los parámetros: linealidad y límites de detección y cuantificación.

3.5.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

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 el acondicionamiento y elución del cartucho.

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

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

$$\text{DL ó QL} = \frac{\overline{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b}$$

Donde:
DL= límite de detección y QL = límite de 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.
$\overline{y}_{bl}$ = media de la respuesta de los n blancos.

3.5.3.2. Linealidad

Se pesó con exactitud alrededor de 0,1000 g de G-1, se transfirió cuantitativamente a un matraz de 10 mL y se disolvió con acetona (disolución 1, concentración de 10 mg/mL). De la disolución 1 se tomaron 0,25 mL y se diluyeron con acetona en un matraz de 25 mL (disolución 2, concentración 100 µg/mL). De la disolución 2 se tomaron alícuotas de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 mL, que se

llevaron a matraces de 10 mL, a cada una de ellas se le añadió 20 µL del estándar interno con una concentración de $3{,}12 \cdot 10^{-5}$ mol/L y se completó el volumen con acetona obteniéndose disoluciones de concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL, respectivamente. De cada disolución se tomaron 4 µL y se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Se construyeron dos curvas de calibración en el intervalo de masas de 0,0016 hasta 0,02 µg con puntos intermedios en 0,0033; 0,004; 0,0066; 0,008; 0,0100; 0,0120; 0,1338 y 0,1600 µg.

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 también una prueba de t de student, para evaluar la sensibilidad del calibrado, donde se planteó 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} (%) ≤ 2 %.

-Intervalo de confianza del intercepto: i (que contenga al cero).

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.

3.6. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

3.6.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo para la extracción en MSPD

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

Para rellenar los cartuchos que se van a emplear en la MSPD es necesario obtener un polvo - formado por la mezcla de muestra líquida y adsorbente - que tenga adecuada fluidez; por lo que es necesario estudiar la proporción de esa mezcla.

Dada las características de polaridad de la molécula de G-1 se ensayó la dispersión de las muestras en dos adsorbentes de uso común como son la silicagel y la fase enlazada C-18.

Se preparó una disolución de G-1 en acetonitrilo : agua (80 :20 % v/v) a 1000 mg/L. Partiendo de 1 g de cada adsorbente se probó realizar la mezcla con diferentes volúmenes de disolución (0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL).

En el caso del plasma, se preparó una muestra de la forma siguiente: a 0,5 mL de plasma humano se le añadieron 0,5 mL de la disolución anterior, de forma tal que el plasma contenía una concentración de G-1 de 500 mg/L.

Partiendo de 1 g de cada adsorbente se probó realizar la mezcla con diferentes volúmenes de muestra (0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL).

Las mezclas se realizaron en un mortero de ágata con pistilo y se conformó el cartucho de MSPD vertiendo dicha mezcla en jeringuillas plásticas de 10 mL.

3.6.1.2. Estudio de eliminación de interferencias (lavado del cartucho)

Una vez conformado el cartucho de MSPD que contiene a la muestra de plasma (conteniendo G-1) dispersa en el material adsorbente (silicagel o fase C-18), 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 % v/v) y (95:5 % v/v).

- 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 TLC, según técnica descrita en 3.4.1.1, 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.

3.6.1.3. Determinación del volumen de elución

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.

3.6.2. Estudio de la unión de G-1 a proteínas plasmáticas

Con vistas a determinar posibles 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 para desnaturalizar las proteínas en cada caso, [http://www.utadeo.edu.co] se agitó y el sobrenadante se analizó por HPLC. La presencia de G-1 en la disolución de lavado sería una evidencia de su unión a proteínas plasmáticas.

3.6.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para el análisis por HPLC de las muestras de plasma extraídas mediante el procedimiento de MSPD se emplearon las condiciones descritas en 3.4.1.2.

3.6.4. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (HPLC) de G-1 en plasma

3.6.4.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

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 elución 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 se describió en 3.5.3.1.

3.6.4.2. Linealidad

Se realizó una curva de calibración en un intervalo 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 [Sb_{rel} (%)] y el intervalo de confianza del intercepto (i). Se realizó también una prueba de t de Student para evaluar la sensibilidad del calibrado, donde se planteó como hipótesis nula que la pendiente es igual a cero ($b = 0$) y como alternativa ($b \neq 0$).

Se tuvieron en cuenta los criterios de aceptación descritos en 3.5.3.2.

3.6.4.3. Precisión

3.6.4.3.1. Repetibilidad

Se siguió el procedimiento para la preparación, lavado y elución del cartucho a una muestra preparada de la siguiente forma: 0,5 mL de plasma al que se adiciona 0,5 mL de una disolución de G-1 en acetonitrilo: agua (80:20 % v/v) de concentración 1000 mg/L de modo que la concentración final de G-1 en la muestra es 500 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.

3.6.4.4. 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. Se siguió el procedimiento para la preparación, lavado y elución del cartucho y el eluato se analizó por HPLC.

3.6.4.5. Especificidad

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, descrito en 3.4.3.

3.7. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD)

3.7.1. Extracción mediante MSPD. Empleo de una co-columna de silicagel para la retención de interferencias polares

A partir de los resultados obtenidos en 3.6.1, se decidió estudiar los efectos del uso de una co-columna en la extracción mediante MSPD.

Antes de introducir en la columna la muestra de plasma con G-1 dispersa en fase C-18, se rellenó la parte inferior de la jeringuilla con 1 g de silicagel, conformando así una co-columna con el objetivo de retener selectivamente a las sustancias interferentes lo que permitiría obtener un eluato “limpio” sin necesidad de ejecutar el lavado del cartucho antes de la elución (figura 12).

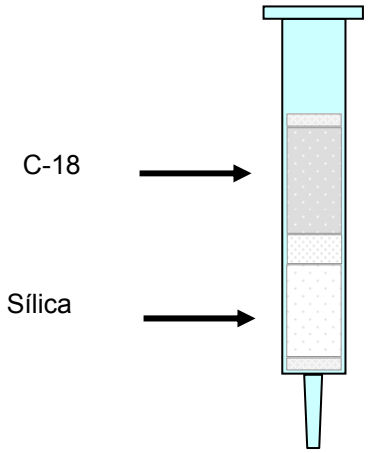


Figura 12. Esquema del cartucho para la extracción empelando MSPD.

En estas condiciones se ensayó la elución con acetonitrilo y con n-hexano. Para confirmar la retención selectiva de las principales interferencias (proteínas plasmáticas) en la silicagel, se recogieron porciones de los mililitros 1; 3 y 5 del eluato, se analizaron por TLC 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.

3.7.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-ECD

3.7.2.1. Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector

Se utilizaron las temperaturas descritas en el trabajo: Validación de la técnica de determinación por cromatografía gaseosa del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control.: temperatura del horno 200 °C, del inyector 230 °C y del detector, 280 °C. [Bravo, L. y Col., 1999; Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S., 2007 II]

3.7.2.2. Selección del flujo de fase móvil

Se inyectaron disoluciones de G-1 muestra de referencia utilizando flujos de fase móvil (Nitrógeno) de 0,3; 0,5; 0,7 y 1 mL/min. Se calculó en cada caso el número de platos teóricos (N) en base al pico del G-1 utilizando la siguiente ecuación:

$$N = 16\left(\frac{tr}{W}\right)^2$$

donde: tr es el tiempo de retención
W el ancho de la base del pico.

3.7.2.3. Volumen de inyección

En todos los casos se inyectó manualmente, modo splitless, un volumen de muestra de 1 µL y se realizó la corrección de los errores asociados a la inyección manual mediante el uso de un estándar interno.

3.7.2.4. Selección del estándar interno

Se inyectaron disoluciones patrón de diferentes compuestos, con estructura semejante a la del G-1 y con propiedades en dicha estructura que garanticen una respuesta apropiada al utilizarse el detector de captura electrónica. Se incluyeron en este análisis los compuestos denominados G-0, UC-244, UC-245 y el benzoato de bencilo. En todos los casos se evaluó la medida en que cada uno cumple los requisitos exigidos para un estándar interno.

3.7.3. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (GC-ECD) de G-1 en plasma

3.7.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

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 y elución del cartucho.

Se realizaron tres inyecciones de este blanco por GC-ECD y se integraron los picos.

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se procedió según se describió en 3.5.3.1.

3.7.3.2. Linealidad

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 mg/L y 8 mg/L, con valores intermedios de 2; 4; 5 y 6 mg/L en hexano.

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales y siguiendo la metodología ICH [ICH., 2005] se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación lineal (r), y se realizaron los test de student para intercepto y pendiente así como el Análisis de Varianza para comprobar la bondad de ajuste. Los criterios para la evaluación de la regresión lineal son:

- Ecuación de la recta: $y = a \cdot x + b$
- Coeficiente de correlación. $r > 0,999$
- t-test para el intercepto: tcal < ttab para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad.
- t-test para la pendiente: tcal > ttab para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad.
- ANOVA para la bondad de ajuste: Fcal < Ftab (0,05 y n_1, n_2).

3.7.3.3. Precisión

3.7.3.3.1. Repetibilidad instrumental

Se inyectaron 6 réplicas de una disolución patrón de G-1 a 2 mg/L con estándar interno en n-hexano. Se calculó la media de la respuesta, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

3.7.3.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración

Se analizaron tres muestras a 1, 2 y 6 mg/L (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración) con tres réplicas en cada caso, siguiendo todos los pasos en la confección y elución del cartucho. Se calculó el CV por grupo y el CV total. Se compararon las varianzas entre los grupos mediante un análisis de varianza.

Criterios de evaluación: Si en el ANOVA Fcal<Ftab, puede concluirse que desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre las varianzas a los diferentes niveles de concentración.

3.7.3.3.3. Precisión intermedia

Se analizaron tres muestras a la concentración de 2 mg/L en tres días sucesivos, siguiendo todos los pasos en la confección y elución del cartucho. Se calculó el coeficiente de variación por día y el global. Se compararon las medias y las varianzas entre los grupos.

Criterios de evaluación: Si en el ANOVA Fcal < Ftab para α=0,05 y 2,6 grados de libertad, puede concluirse que desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos a los diferentes días.

3.7.3.4. 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 2 mg/L, siguiendo todos los pasos en la confección y elución del cartucho.

3.7.3.5. Especificidad

Se compararon los cromatogramas de una disolución de G-1, muestra de referencia, con los de las muestras de plasma conteniendo G-1 y de blancos preparados con la matriz de las muestras sin adición de G-1. Se observó si aparecía algún pico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al G-1.

3.8. Procesamiento estadístico de los datos

Se utilizaron los programas Statgraphics Plus for Windows 4.1, Professional Version, 1999 y Microsoft® Office Excel 2003.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Generalidades

El desarrollo de los procedimientos de determinación de G-1 en plasma que aquí se describe se hizo utilizando muestras preparadas en el laboratorio a base de plasma humano suministrado por el Banco Provincial de Sangre (anexo 3) al que se adicionó un volumen adecuado de una disolución de G-1 con vistas a simular el comportamiento de muestras reales. A estos efectos el término “muestras reales” se refiere a aquellas tomadas a pacientes tratados con formulaciones de G-1.

El G-1 es un producto muy difícilmente soluble en agua (y por tanto, en plasma, que contiene 96 % de agua) pero muy soluble en acetonitrilo [Jorge, E. y Col., 1993 II] por ello, para la preparación de las disoluciones de G-1 a incorporar al plasma fue necesario utilizar pequeños volúmenes de acetonitrilo como co-solvente. El volumen de acetonitrilo utilizado en cada caso fue el mínimo necesario para garantizar la solubilidad completa del G-1 en medio acuoso.

Debido a la compleja composición de la matriz - por la diversidad de compuestos que potencialmente pueden estar presentes - y a la dificultad para predecir la concentración nominal de los fármacos en la muestra, debido a que los mismos, desde su administración, están expuestos a los sistemas metabólicos del organismo y a potenciales efectos degradativos, los estudios de determinación de fármacos en plasma y otros fluidos biológicos tienen una alta complejidad. Todo esto hace necesario estudiar la estabilidad de los analitos de interés en la matriz en cuestión, utilizar procedimientos de extracción con vistas a aislarlos y concentrarlos, así como emplear técnicas separativas, generalmente cromatográficas, para la determinación analítica.

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 límite de detección y cuantificación, la linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

Las metodologías evaluadas a lo largo de este trabajo incluyen la cromatografía de gases con detectores de ionización por llama y de captura electrónica y la cromatografía líquida de alta eficacia, combinadas con técnicas de preparación de muestras como la extracción en fase sólida y la dispersión en matriz sólida.

4.2. Estabilidad de G-1 en plasma

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 de la estabilidad del producto mezclado con plasma, seguido por TLC y HPLC.

Para los análisis efectuados por TLC se empleó como revelador la cámara de yodo para detectar la mancha correspondiente al G-1 con Rf = 0,6, [Muro, D.; Morales, S. & Bravo, L., 1993] aunque esta mancha puede ser observada a simple vista si se utilizan placas de silicagel, con o sin indicador fluorescente, debido a su color amarillo (figura 13), 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 µg. [Pérez, M., 1999]

Figura 13. Cromatograma de G-1 (acetonitrilo : agua 50:50, 200 mg/L); fase móvil tetracloruro de carbono : cloroformo (10:1).

Para los análisis efectuados por HPLC se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas en Materiales y Métodos (3.4.1.2), excepto la longitud de onda a la que se realizó la detección, la cual se estableció de la siguiente manera:

En la figura 14 se observa que el espectro ultravioleta - visible del G-1 disuelto en acetonitrilo – agua 80:20 presenta dos máximos de absorción, uno a 254 nm aproximadamente y el otro, más intenso, a 380 nm. Para el control de la calidad de lotes de G-1 materia prima es utilizada la detección a 254 nm con vistas a cuantificar en una misma corrida el G-1 y las potenciales impurezas de dichos lotes. [Laboratorio de C. Calidad, CBQ, 2005]

Sin embargo, en este caso se trata de determinar el G-1 en muestras en las que se prevén concentraciones nominales muy bajas - debido a las bajas dosis que se administran y a la probable metabolización del analito en el organismo - por lo que para las determinaciones de G-1 en muestras de plasma se escogió la longitud de onda donde el coeficiente de extinción molar es máximo, es decir, 380 nm, para obtener una mayor sensibilidad en la detección.

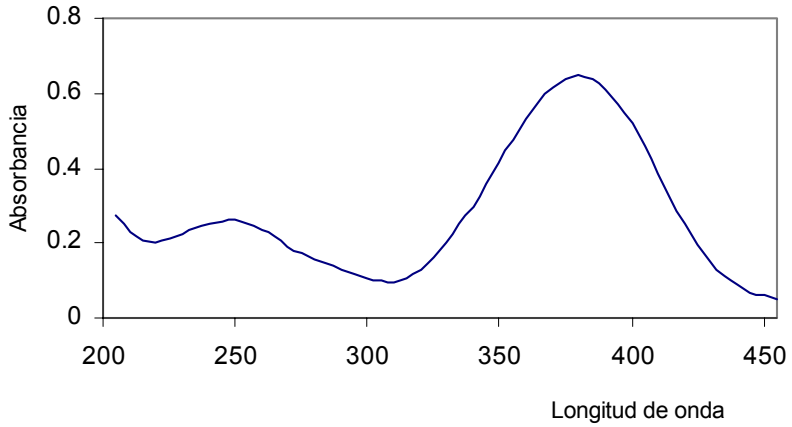


Figura 14. Espectro ultravioleta – visible del G-1 en acetonitrilo : agua (80:20 % v/v)

4.2.1. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía de capa delgada (TLC)

En el análisis a tiempo cero se observó una mancha con el mismo Rf, color y tamaño de la disolución de referencia de G-1, 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 tamaño e 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 el 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]

4.2.2. Evaluación de la estabilidad de G-1 en plasma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El uso del método de HPLC para evaluar este estudio de estabilidad debería permitir, sobre la base del perfil de los cromatogramas obtenidos, disponer de información adicional acerca del proceso de degradación. 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.

En la figura 15 se muestra un cromatograma típico 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 solo 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 (figura 15) 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 una disminución del área del pico de G-1. Todo esto indica que la degradación del G-1 en el plasma comienza de forma inmediata.

Los picos secundarios mencionados anteriormente van aumentando gradualmente su área a medida que disminuye el área del pico de G-1 en el tiempo. Sin embargo, este comportamiento no sigue una tendencia regular pues, transcurrido algún 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. Después, 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.

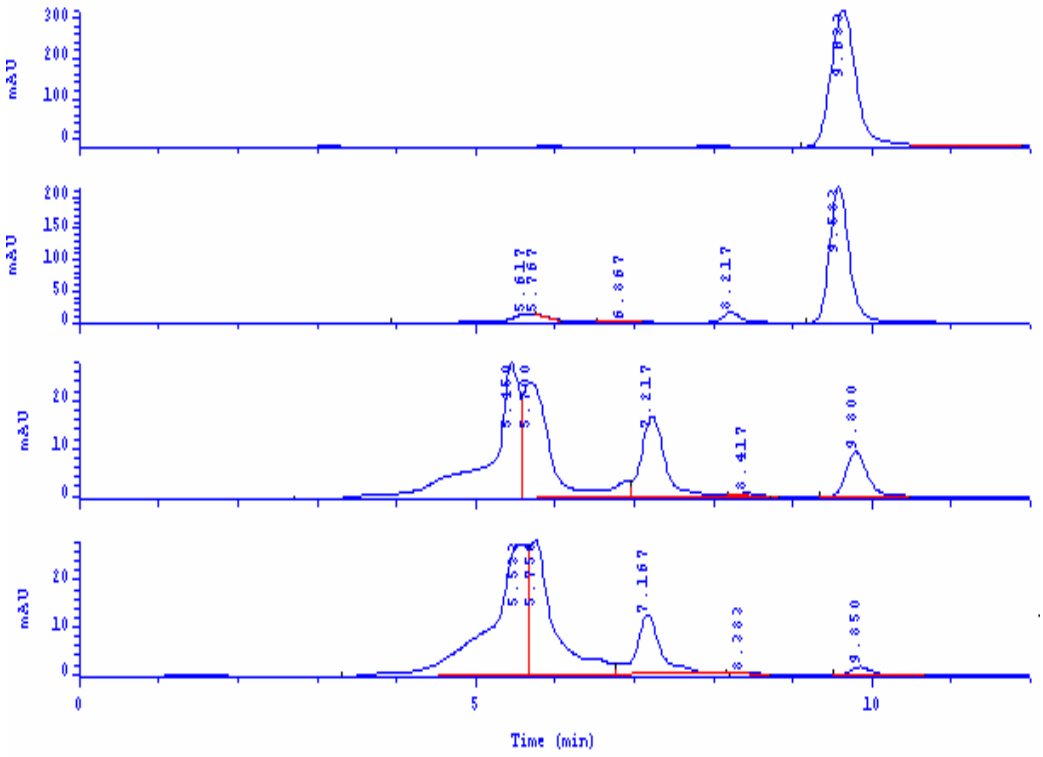
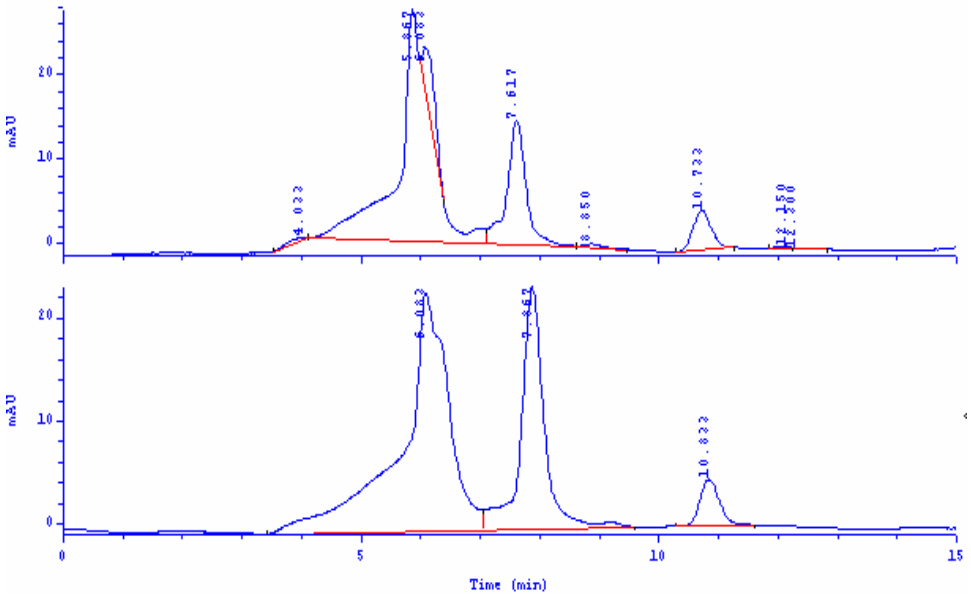


Figura 15. Cromatogramas correspondientes al G-1 y al estudio de estabilidad del G-1 en plasma humano.

Para la identificación de algunos de los picos secundarios que aparecen en los cromatogramas de las muestras de G-1 en plasma del estudio de estabilidad, 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 16 se observa cómo el pico correspondiente a tr = 7,617 minutos aumentó considerablemente su área por la adición a la muestra de 5-bromofurfural.



t = 5,5 h

Muestra contaminada con 5-bromofurfural

Figura 16. 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 tr = 8,282 minutos con la adición a la muestra del producto monobromado (figura 17).

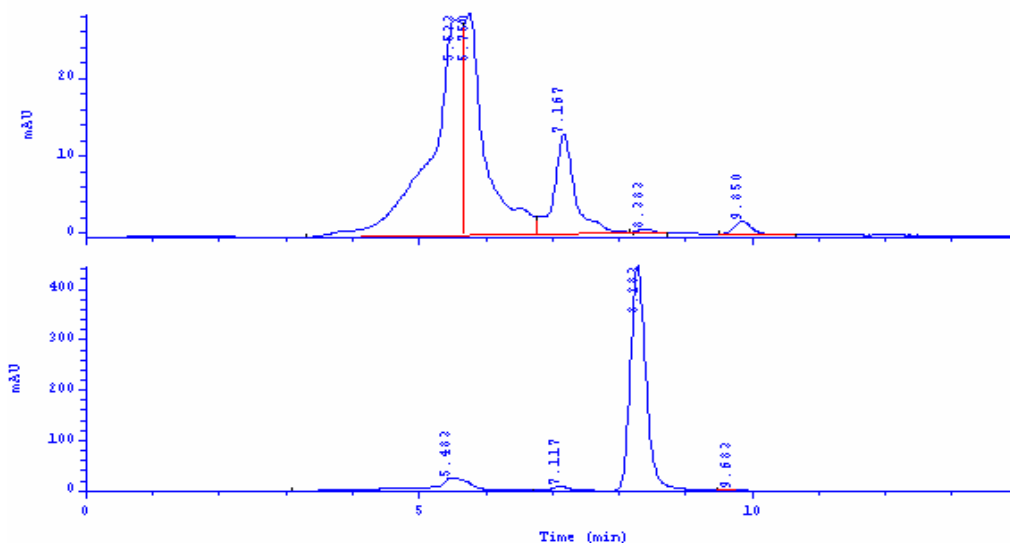


Figura 17. Cromatogramas de la muestra del estudio de estabilidad del G-1 en plasma a las 22,5 horas y la contaminada con monobromado.

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.

4.3. Determinación de G-1 en plasma mediante extracción en fase sólida (SPE) y cuantificación por cromatografía de gases, con columna empacada y detector de ionización por llama (GC-FID)

4.3.1. Extracción en fase sólida (SPE)

Los ensayos realizados aquí perseguían únicamente la demostración de concepto respecto a la aplicabilidad de la técnica de SPE para la extracción de G-1 desde muestras de plasma. El desarrollo completo así como la optimización del procedimiento debe ser objeto de trabajos futuros.

Es por eso que se siguió una secuencia de trabajo basada en el conocimiento teórico que se dispone respecto al comportamiento de absorción, solubilidad y demás características químico-físicas del G-1 por lo que, según se describe a continuación, se seleccionaron parámetros de extracción estándar para moléculas con propiedades similares a las del G-1.

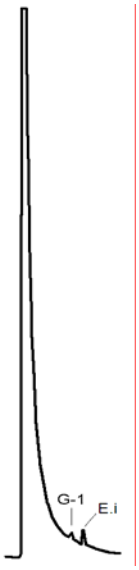
Como material adsorbente se seleccionaron cartuchos de fase reversa C18, que son los recomendados para retener moléculas orgánicas de baja polaridad, como el G-1. El acondicionamiento de los cartuchos se hizo con agua destilada lo que crea una interfase apropiada para la posterior introducción de las muestras acuosas, mientras que el eluyente empleado fue cloroformo que es un disolvente en el que el G-1 es fácilmente soluble. [Jorge, E. y Col., 1993 II] El volumen de elución utilizado fue de 2 mL, lo cual fue suficiente para eluir cuantitativamente al G-1. Esto fue

comprobado mediante el análisis por TLC de una segunda porción de 2 mL de cloroformo que se hizo pasar a través de los cartuchos ya eluidos, donde no se detectó presencia de analito.

4.3.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-FID

Partiendo de las condiciones descritas por Bravo y colaboradores,[Bravo, L. y Col., 1999] para la determinación cromatográfica de la pureza de lotes de G-1, se procedió a ajustar los parámetros a fin de utilizar la técnica en la evaluación de muestras de plasma conteniendo G-1 que habían sido extraídas mediante el procedimiento de SPE descrito anteriormente.

Primeramente se realizaron inyecciones de una disolución patrón de G-1 en acetona a una concentración de 40 µg/mL y no se observó la presencia de picos en el cromatograma. Considerando que en la técnica original se trabaja con concentraciones nominales de G-1 del orden de los 10 000 µg/mL, se realizaron varias inyecciones disminuyendo paulatinamente el valor de la atenuación hasta observar la presencia de picos en el cromatograma, lo que ocurre con atenuación de 16 (figura 18).



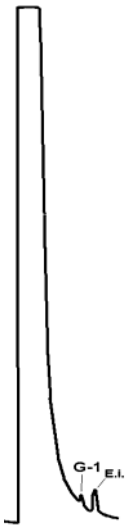
Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 2 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 12 mL/min
Columna de vidrio de 1 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10^2
Detector: Ionización por llama

Figura 18. Cromatograma obtenido bajo las condiciones descritas por Bravo Sánchez y col (1999), modificando la atenuación a 16.

Bajo estas condiciones, las alturas de los picos, tanto de G-1 como de estándar interno (E.i.; benzoato de bencilo), son aún insuficientes, por lo que se aumentó el volumen de inyección a 4 µL. Los resultados de la separación cromatográfica se muestran en la figura 19.

Al inyectar 4 µL de la muestra, la banda correspondiente al disolvente (acetona) es más ancha, lo que unido a que el pico correspondiente al G-1 es pequeño y aparece a un tiempo de retención muy cercano al de la acetona, puede dificultar la cuantificación del pico correspondiente al G-1 en las muestras.

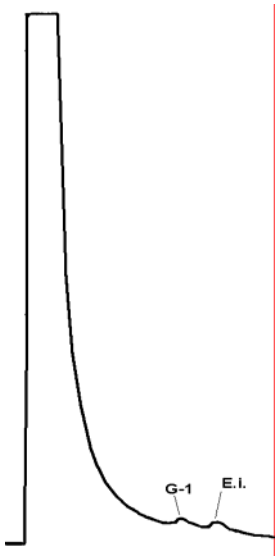


Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 4 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 12 mL/min
Columna de vidrio de 1 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10^2
Detector: Ionización por llama

Figura 19. Cromatograma obtenido al inyectar 4 µL del patrón de G-1 en acetona de concentración 40 µg/mL.

La disminución del flujo de la fase móvil hasta 5 mL/min con vistas a aumentar los tiempos de retención, tampoco conduce a resultados satisfactorios, probablemente por una pérdida de eficacia, según se evidencia en la forma de los picos obtenidos en la figura 20.

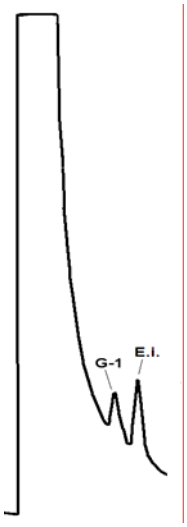


Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 4 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 5 mL/min
Columna de vidrio de 1 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10^2
Detector: Ionización por llama

Figura 20. Cromatograma obtenido al inyectar 4 µL del patrón de G-1 en acetona de concentración 40 µg/mL, a flujo de fase móvil 5 mL/min.

Se retomó el flujo de 12 mL/min y se modificó otro parámetro de detección, en este caso el rango que se fija en 10 con el objetivo de aumentar la altura de los picos obtenidos. Los resultados se reflejan en la figura 21.



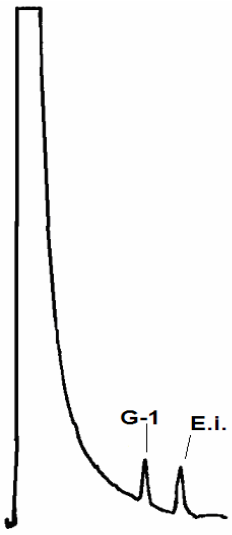
Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 4 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 12 mL/min
Columna de vidrio de 1 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10
Detector: Ionización por llama

Figura 21. Cromatograma obtenido al inyectar 4 µL del patrón de G-1 en acetona de concentración 40 µg/mL, a flujo de fase móvil 12 mL/min y modificación del rango 10.

A esta escala, la detección de los picos es adecuada, aunque no se resuelven hasta la línea base, por lo que se decidió utilizar una columna de mayor longitud (2 m), y aumentar el flujo a 22 mL/min.

Los resultados obtenidos, tal y como se muestra en la figura 22, son satisfactorios: picos con altura adecuada y completamente resueltos.



Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 4 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 22 mL/min
Columna de vidrio de 2 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10
Detector: Ionización por llama

Figura 22. Cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

4.3.3. Validación del procedimiento de extracción (SPE) y determinación cromatográfica (GC-FID) de G-1 en plasma

En este caso, atendiendo a los propósitos del estudio, se aplicó un procedimiento de validación reducido en el que solo se evaluó la linealidad y los límites de detección y cuantificación.

4.3.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación de G-1 por cromatografía de gases bajo las condiciones especificadas es:

Límite de detección: $DL = \overline{X} + 3SD$ 0,001411 µg

Límite de cuantificación: $QL = \overline{X} + 5SD$ 0,001534 µg

4.3.3.2. Linealidad

Los valores experimentales, obtenidos mediante la técnica de cromatografía de gases, que corresponden con las curvas de calibración de G-1 se muestran en la figura 23 y la tabla 1.

Para la evaluación de la linealidad se realizó 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.

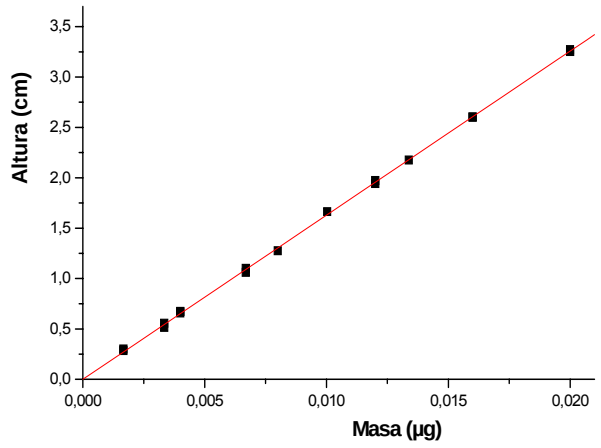


Figura 23. Curva de Calibración para el G-1 en acetona. Método GC-FID.

Tabla 1. Valores experimentales obtenidos para las curvas de calibración de G-1 en acetona (n=18). Método GC-FID.

X (Masa µg)	Y (Altura cm.)	f=Y/X (Factor de respuesta)
0,00167	0,2856	171,0180
0,00167	0,3000	179,6407
0,00334	0,5143	153,9820
0,00334	0,5570	166,7575
0,0040	0,6739	168,4750
0,0040	0,6719	167,9675
0,0040	0,6576	164,4125
0,00669	1,1000	164,4245
0,00669	1,0603	158,4948
0,0080	1,2758	159,4688
0,01003	1,6633	165,8285
0,01200	1,9718	164,3200
0,01200	1,9423	161,8583
0,01338	2,1757	162,6054
0,01600	2,6000	162,5000
0,01600	2,6043	162,7700
0,0200	3,2518	162,5910
0,0200	3,2718	163,5905

Según se expone en la tabla 2, los parámetros de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que esta técnica es lineal en el intervalo de masas comprendidas entre 0,00167 y 0,0200 µg.

Tabla 2. Parámetros de la recta de regresión de G-1 en acetona, n=18. Método GC-FID.

Parámetro	**Valor experimental**	**Criterio de aceptación**
Número de datos (*n*)	18	-
Intervalo de linealidad (µg)	0,00167-0,0200	-
Coeficiente de correlación (*r*)	0,9998	r ≥0,99
Pendiente (*b*)	162,86	-
Desviación estándar relativa de la pendiente (Sb_{rel} (%)).	0,50	$Sb_{rel} \leq 2,00$ %
Ordenada en el origen (*a*)	0,00016411	-
Intervalo de confianza de *a*	-0,01518 ≤ a ≤ 0,01551	que contenga el cero
Coeficiente de variación de los factores respuesta (CV_f (%)).	3,30	$CV_f \leq 5$ %
Test estadístico de *b* (t tab 14, p=0,05)	199,97	$t_{exp} \geq 1,746$

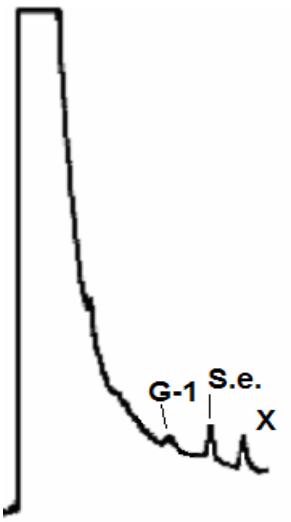
4.3.4. Aplicación del método a una muestra de plasma humano conteniendo G-1

Se preparó una muestra de G-1 en plasma, a la concentración de 40 µg/mL, tal y como se describe en 3.5.1.2 y 3.5.1.3, se redisolvió en acetona -que contenía el estándar interno- y se analizó bajo las condiciones cromatográficas establecidas previamente.

En la figura 24 se observa el cromatograma obtenido para la muestra. A los tiempos de retención del G-1 y el estándar interno aparecen picos bien definidos, además de un tercer pico de identidad desconocida a tiempo de retención superior.

Si bien el pico correspondiente al G-1 es perfectamente cuantificable, no se determinó su contenido pues al tratarse de una muestra única, este valor individual carece de utilidad. El objetivo de analizar esta muestra es valorar el desempeño del método en el análisis de muestras de G-1 para estudios farmacocinéticos, lo cual se consigue.

El pico de mayor tiempo de retención no pudo ser identificado en este trabajo, no obstante, en trabajos previos se ha demostrado la limitada estabilidad del G-1 en medios acuosos y su susceptibilidad al metabolismo en medios biológicos, por lo que este pico puede corresponder a un metabolito o producto de degradación del ingrediente farmacéutico activo.



Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección: 4 µL
Gas portador: N_2
Flujo: 22 mL/min
Columna de vidrio de 2 m de longitud y 4 mm de diámetro, con relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas
Atenuación: 16
Rango 10
Detector: Ionización por llama

Figura 24. Cromatograma obtenido de una muestra de G-1 en plasma a concentración 40 µg/mL, extracción en fase sólida, bajo las condiciones establecidas.

4.4. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

4.4.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo para la extracción en MSPD

4.4.1.1. 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 Note[111]. 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 en el material adsorbente y del propio contenido de líquido en la muestra, para determinar una buena relación, 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 silicagel y la fase C-18. 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.

Al realizar las mezclas en diferentes proporciones de disolución de G-1 y adsorbente se obtuvo que cada gramo de silicagel admite 2 mL de la disolución de G-1. En el caso del plasma conteniendo G-1, cada gramo de silicagel es capaz de incorporar 1 mL de muestra, obteniéndose un polvo fino y uniforme. Los resultados obtenidos usando como adsorbente la fase C-18 fueron los mismos que los correspondientes a la silicagel.

De acuerdo a los resultados obtenidos se describe en la figura 25 como se realizó la confección de los cartuchos para la determinación de G-1 mediante MSPD.

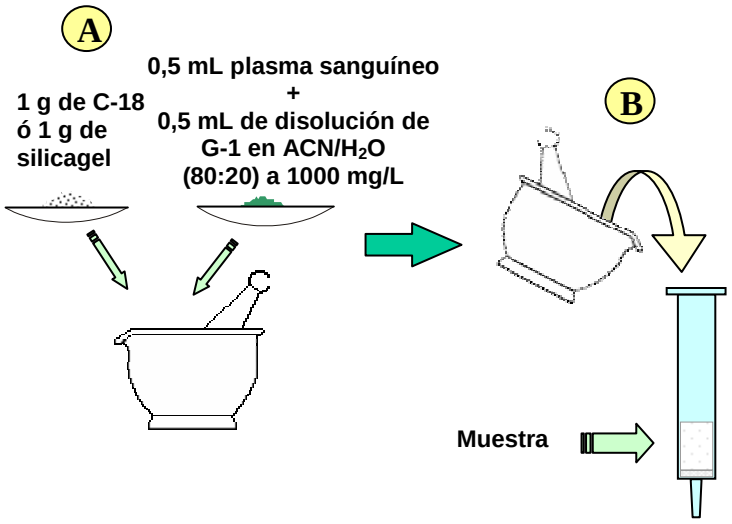


Figura 25. Esquema general de confección de los cartuchos.

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.

4.4.1.2. 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.

Al utilizar la técnica de TLC descrita en Materiales y Métodos para este estudio de eliminación de interferencias, además de emplear cámara de yodo para revelar la mancha de G-1, también se empleó ninhidrina al 2 % en etanol 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 las condiciones en que se desarrolla el análisis por TLC las proteínas no corren, quedan retenidas en el punto de aplicación, por lo tanto la

evidencia positiva de que sean arrastradas del cartucho de MSPD durante el lavado es una mancha violeta en el punto de aplicación del cromatograma.

En la tabla 3 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 TLC.

Tabla 3. Resultados obtenidos por TLC al analizar los lavados realizados con las diferentes disoluciones y los dos adsorbentes.

Disoluciones de lavado	Silicagel		C-18	
	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 % v/v)	+	+	+	+
Agua : metanol (95:5 % v/v)	+	+	+	+
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.

4.4.1.3. Determinación del volumen de elución

Para la elución 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 elución 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

elución de los cartuchos con dos fracciones de 4 mL de acetonitrilo que una vez mezcladas, se analizan por HPLC.

Es posible incluir un paso de evaporación a sequedad del eluato, redisolver el residuo en la fase móvil e inyectarlo en el cromatógrafo.

Finalmente es necesario insistir en que este volumen de elución 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.

4.4.2. 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.

4.4.3. Análisis de los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para el análisis por HPLC de las muestras de plasma extraídas mediante el procedimiento de MSPD se emplearon las condiciones descritas en 3.4.1.2

4.4.4. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (HPLC) de G-1 en plasma

4.4.4.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación de G-1 por HPLC bajo las condiciones especificadas es:

Límite de detección: DL = $\frac{\overline{X} + 3S}{b}$ 0,32 mg/L

Límite de cuantificación: QL = $\frac{\overline{X} + 10S}{b}$ 0,96 mg/L

4.4.4.2. Linealidad

Se evaluó la linealidad de la determinación de G-1 mediante HPLC en el intervalo de concentración comprendido entre 1,2 mg/L y 90 mg/L de G-1 puro disuelto en fase móvil (acetonitrilo : agua (80:20 % v/v)). Los valores experimentales que corresponden con la curva de calibración de G-1 se muestran en la figura 26 y la tabla 4.

Los parámetros de linealidad calculados cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, según se expone en la tabla 5, lo que indica que la técnica es lineal para el intervalo de concentraciones estudiado.

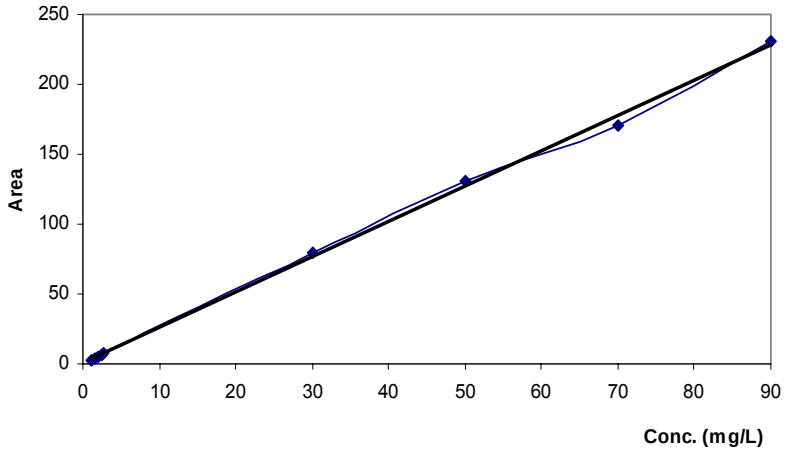


Figura 26. Curva de calibración para el G-1 en acetonitrilo : agua (80:20 % v/v) por HPLC.

Tabla 4. Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de G-1 en acetonitrilo : agua (80:20 % v/v) 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 5. Parámetros de la recta de regresión de G-1 en acetonitrilo : agua (80:20 % v/v) por HPLC.

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

4.4.4.3. Precisión

4.4.4.3.1. 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 está dentro del intervalo aceptable para métodos bioanaliticos (CV ≤ 15 %).

No obstante, debido a la demostrada inestabilidad del G-1 en medios acuosos como es 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.

4.4.4.4. 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 %. 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 %. La literatura internacional al respecto no exige que para aceptar un método como apto, la exactitud sea de un 100 %, siempre que se pueda demostrar que el valor obtenido sea consistente, preciso y reproducible. [FDA, 2001]

Ahora, 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.

4.4.4.5. Especificidad

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 (ver figura 15, 16 y 17).

4.5. Determinación de G-1 en plasma mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y cuantificación por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD)

4.5.1. Extracción mediante MSPD. Empleo de una co-columna de silicagel para la retención de interferencias polares

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 silicagel para la limpieza de las muestras de plasma dispersas en fase C-18. Se evaluó la elución habitual con acetonitrilo y además, con n-hexano, un disolvente apolar con bajo poder eluyente respecto a la silicagel.

En la evaluación del ensayo por TLC se comprobó que la elución 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 TLC, con lo que se demostró la efectividad de la co-columna de silicagel para retener interferencias polares. Este hecho, unido al limitado poder de elución del n-hexano para desorber dichas interferencias, permite obtener un eluato relativamente limpio que puede inyectarse directamente en el sistema de cromatografía de gases con detección por captura electrónica.

Como la detección por captura electrónica en cromatografía de gases no permite el análisis de muestras cuya matriz sea acuosa, ni de disoluciones preparadas en disolventes con átomos

electroatrayentes en su estructura, el eluato obtenido a partir del empleo de la co-columna puede analizarse directamente en este sistema.

4.5.2. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de G-1 por GC-ECD

4.5.2.1. Selección del flujo de fase móvil

Es conocido que según las teorías básicas de la cromatografía, la eficacia de un sistema, expresada en términos de número de platos teóricos (N) depende del tiempo de contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria, el cual, a su vez, depende del caudal de la fase móvil. Por esa razón, los estudios de eficacia generalmente se realizan determinando “N” o la altura equivalente de plato (H) como una función del flujo de fase móvil.

En el caso de la determinación de G-1 mediante GC-ECD con columna capilar, para la determinación del flujo adecuado se ensayaron varios valores de caudal de fase móvil, tomando como referencia inicial el flujo de 1 mL/min que es el valor más frecuentemente recomendado cuando se trabaja con este tipo de columnas.

Según se describe en la tabla 6, la disminución sucesiva del flujo originó un incremente marcado de N para el pico correspondiente al G-1, con el consiguiente aumento del tiempo de retención. Un comportamiento similar se aprecia para el benzoato de bencilo que se utilizó como estándar interno.

Tabla 6. Comportamiento de la eficacia del sistema cromatográfico a diferentes flujos de fase móvil.

	Benzoato de Bencilo			G-1		
Flujo (mL/min)	Tiempo de retención	Ancho pico (min)	Eficacia (N)	Tiempo de retención	Ancho pico (min)	Eficacia (N)
0,3	6,007	0,321	4935	4,977	0,349	3058
0,5	3,973	0,26	4073	3,320	0,297	2186
0,7	3,100	0,263	2206	2,583	0,28	1663
1,0	2,407	0,219	1897	2,013	0,278	882

Para ambas señales, al pasar de valores de flujo de 0,5 mL/min a 0,3 mL/min, el aumento de la eficacia es comparativamente menos marcado que el incremento en los tiempos de retención, además de que se observa un ligero crecimiento del ancho de la base de los picos. Por estas razones se escogió el valor de 0,5 mL/min, con el que se consigue un balance adecuado entre eficacia y tiempo de análisis.

4.5.2.2. Selección del estándar interno

Como es ampliamente conocido, en los sistemas cromatográficos que no cuentan con un inyector automático se hace necesario utilizar un estándar interno para corregir los errores asociados a la

inyección manual. También en los casos en que el análisis vaya precedido de un proceso de extracción, suele adicionarse el estándar interno desde el comienzo de la extracción para estimar las pérdidas de analitos debido a la manipulación de la muestra.

Para que una sustancia pueda ser usada como estándar interno debe cumplir los siguientes requisitos. [Cela, R., 2002]

- La sustancia no debe estar presente en la muestra.
- Debe resolverse correctamente (R ≥ 1,5), con respecto a cualquiera de los componentes de la muestra.
- Resultar retenida en el sistema de manera similar a las especies con respecto a las cuales será utilizada como estándar interno.
- No contener impurezas.
- No reaccionar con ninguno de los componentes de la muestra ni alterarse por la matriz de las mismas.

Como se ha explicado antes en Materiales y Métodos, los compuestos ensayados con este fin fueron el G-0, el UC-244, el UC-245 y el benzoato de bencilo.

Los dos primeros fueron descartados debido a tener, bajo las condiciones de análisis utilizadas, un comportamiento de retención muy diferente al del G-1. Además, al no contarse con muestras de referencia certificadas, la inyección de las muestras disponibles originaron al menos un pico secundario en el cromatograma, lo cual también los invalida para ser usados como estándar interno.

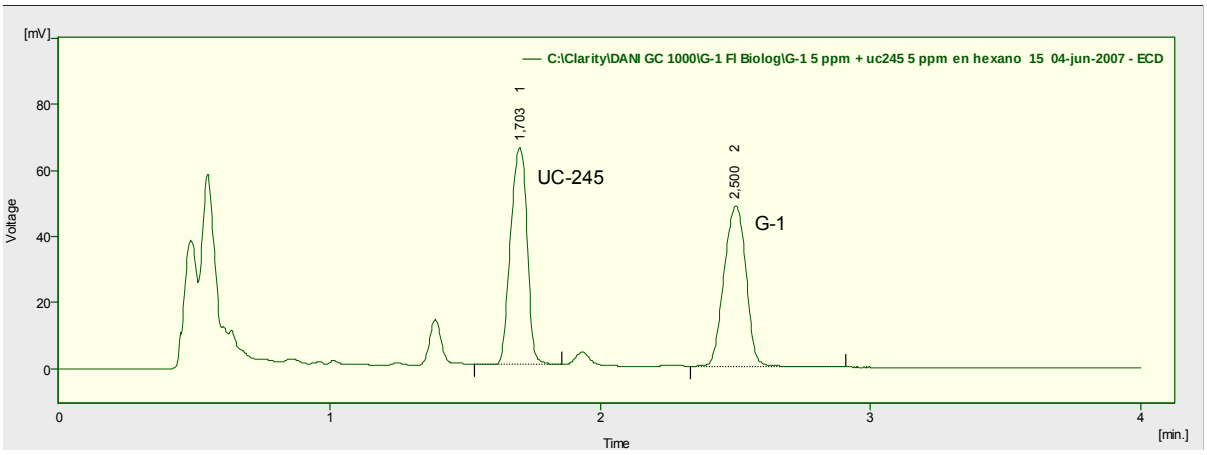


Figura 27. Cromatograma correspondiente a la inyección de G-1 muestra de referencia con adición de UC-245.

La muestra disponible de UC-245 originó una sola señal a un tiempo de retención cercano, menor, que el correspondiente al G-1. Ver figura 27. Como se observa en la figura 28, el benzoato de bencilo también originó un único pico pero a un tiempo de retención superior al del G-1.

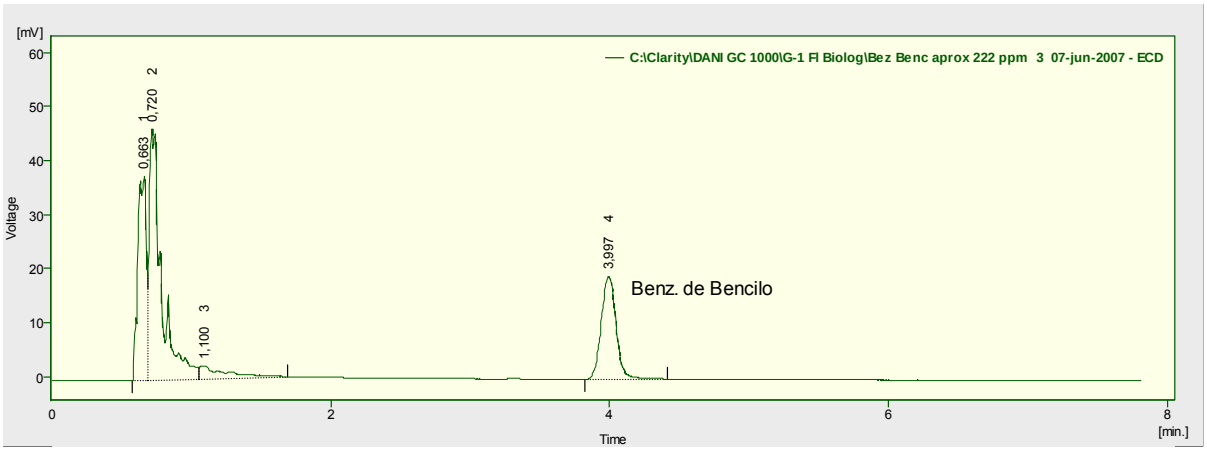


Figura 28. Cromatograma correspondiente a la inyección de una disolución de benzoato de bencilo en n-hexano.

Aun cuando ambos compuestos cumplen los requisitos básicos, se escoge como estándar interno al benzoato de bencilo que exhibe un tiempo de retención mayor que el G-1 (figura 29), lo que supone un menor riesgo de solapamiento entre el pico del estándar interno y los correspondientes a potenciales productos de la degradación del G-1 en contacto con el plasma. Sería razonable esperar que, a menos que se trate de reacciones de adición u otro tipo de asociaciones moleculares, la degradación del G-1 conduzca a la formación de compuestos de menor masa que este y mayor volatilidad, por lo que aparecerían en el cromatograma a tiempos de retención inferiores al del G-1.

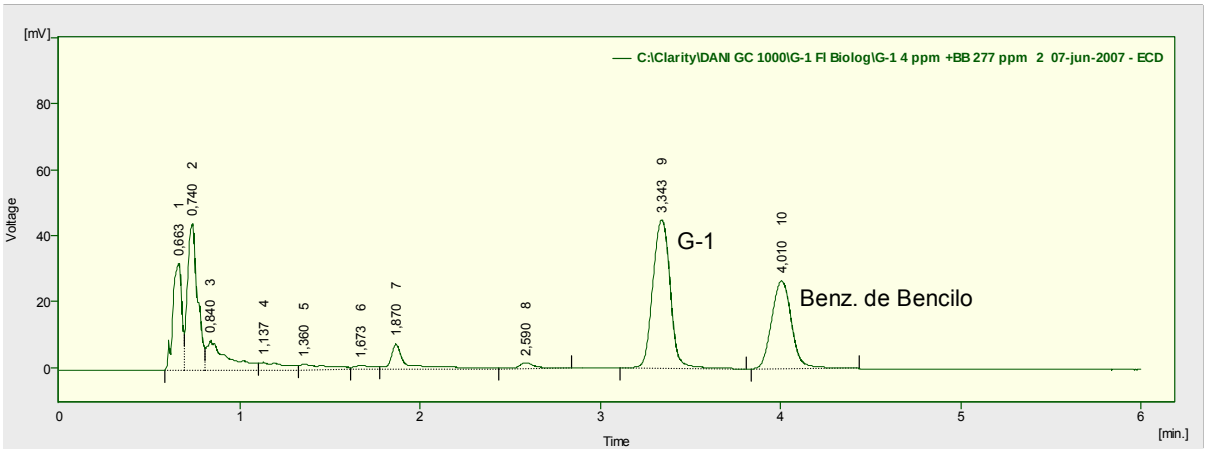


Figura 29. Cromatograma correspondiente a la inyección de G-1 muestra de referencia con adición de benzoato de bencilo.

Por demás se dispone de una experiencia de trabajo con el benzoato de bencilo que es precisamente el estándar interno usado en las determinaciones de G-1 por cromatografía de gases y detección con ionización por llama.

4.5.3. Validación del procedimiento de extracción (MSPD) y determinación cromatográfica (GC-ECD) de G-1 en plasma

4.5.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación para la determinación del G-1 mediante cromatografía de gases y detección por captura electrónica son:

Límite de detección: DL = $\frac{\overline{X} + 3S}{b}$ 0,0741 mg/L

Límite de cuantificación: QL = $\frac{\overline{X} + 10S}{b}$ 0,1452 mg/L

Estos valores son seis veces más bajos que los obtenidos al determinar el G-1 en plasma con extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

4.5.3.2. Linealidad

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración de G-1 en el intervalo de 0,5 a 8 mg/L, así como los parámetros para evaluar la calidad de la regresión se muestran en las tabla 7 y 8, así como en la figura 30.

Tabla 7. Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de G-1 por GC-ECD.

	Concentración (mg/L)	Rp1	Rp2
Estándar 1	0,5008	0,1538	0,1450
Estándar 2	2,013	0,7981	0,8348
Estándar 3	4,026	1,4834	1,5260
Estándar 4	5,008	1,8206	1,8731
Estándar 5	6,039	2,2078	2,1380
Estándar 6	8,128	2,9741	2,9038

**Rp: relación de respuestas (área del pico del patrón de G-1 dividido el área del pico del estándar interno)*

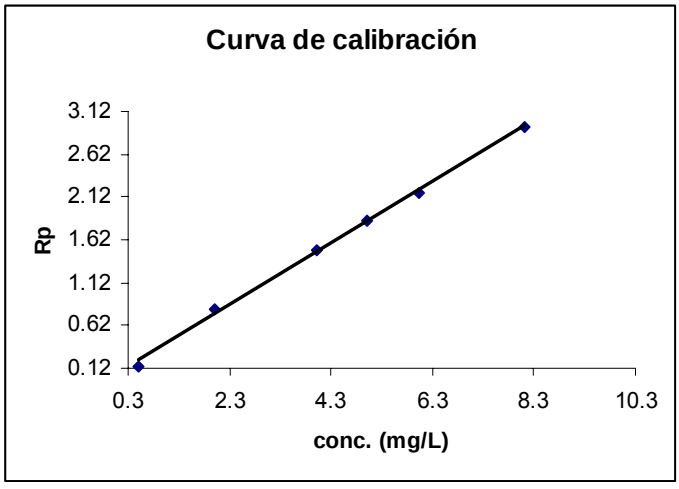


Figura 30. Curva de calibración para G-1 por GC-ECD.

Tabla 8. Parámetros estadísticos de la recta de regresión de G-1 por GC-ECD.

Parámetros	Resultados
Ecuación de la recta y = a·x + b	Y= 0,35929 X + 0,031716
Coeficiente de correlación, r ≥ 0,999	r = 0,9990
t-test para el intercepto: tcal < ttab para α=0,05 y n-2 grados de libertad	tcal: 1,068 ttab: 2,776
t-test para la pendiente: tcal > ttab para α=0,05 y n-2 grados de libertad	tcal: 60,125 ttab: 2,776
ANOVA para la bondad de ajuste: Fcal < Ftab,	Fcal: 3,64 Ftab: 4,53

Finalmente, como se aprecia en la figura 31, la distribución de los residuales es aleatoria, con aproximadamente la misma cantidad de residuales positivos que negativos por lo que se cumple la condición de homogeneidad de varianzas.

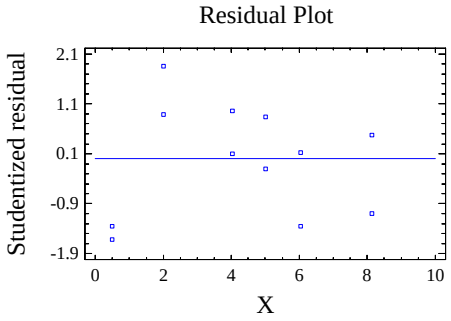


Figura 31. Distribución de los residuales en la regresión.

En resumen, los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

4.5.3.3. Precisión

4.5.3.3.1. Repetibilidad instrumental

La precisión de un método analítico expresa la correspondencia entre una serie de mediciones obtenidas por análisis múltiples de una muestra homogénea. En el caso de la “precisión del sistema” o “precisión instrumental”, se evalúa solamente el error asociado a la medición analítica y se determinada analizando repetidas veces una misma muestra en un corto periodo de tiempo.

En cromatografía de gases, la repetibilidad del volumen de inyección es un factor crítico cuando se trabaja con instrumentos que carecen de sistema de inyección automática. Por tal razón es una práctica habitual el uso de un estándar interno para corregir esos errores relativos a la inyección.

En la siguiente tabla se exponen los resultados de 6 inyecciones sucesivas de una disolución de G-1 a 2 mg/L con benzoato de bencilo como estándar interno (volumen de inyección, 1 µL).

Tabla 9. Resultados de la repetibilidad instrumental.

Inyección	Respuesta (Rp)	Variabilidad
Inyección 1	6,8062	
Inyección 2	6,9925	Media: 6,5273
Inyección 3	6,3712	Desv, Estándar: 0,1355
Inyección 4	6,2353	Coef, de variación: 2,076 %
Inyección 5	6,1442	
Inyección 6	6,6146	

**Rp: relación de respuestas (área del pico del patrón de G-1 dividido el área del pico del estándar interno)*

La variabilidad de la respuesta, expresada como desviación estándar relativa fue de aproximadamente un 2 %, con una adecuada correspondencia entre las respuestas obtenidas para las inyecciones repetidas. Dicho resultado demostró que con este procedimiento es posible minimizar los errores potenciales asociados a la inyección manual de las muestras y con ello conseguir la precisión instrumental requerida. En consecuencia, para todas las determinaciones realizadas en este trabajo, se sigue el procedimiento de inyectar cada muestra por duplicado y utilizar para los cálculos el valor medio de la respuesta para ambas inyecciones.

4.5.3.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración

Según las normativas ICH 2005 para la validación de métodos analíticos, la repetibilidad de un procedimiento debe ser demostrada con un mínimo de 9 determinaciones, cubriendo el intervalo lineal específico para el mismo (por ejemplo, tres réplicas a tres niveles de concentración) o un mínimo de 6 determinaciones al nivel medio de concentración.

En la tabla 10 se exponen los resultados obtenidos del análisis de muestras de plasma a tres niveles de concentración (niveles bajo, medio y alto del intervalo lineal) con tres réplicas en cada caso.

Tabla 10. Resultados de la repetibilidad a tres niveles de concentración de G-1.

	Conc 1 mg/L	Conc 2 mg/L	Conc 6 mg/L
Resultado Réplica 1	0,666 mg/L	1,591 mg/L	4,776 mg/L
Resultado Réplica 2	0,944 mg/L	1,875 mg/L	5,943 mg/L
Resultado Réplica 3	0,707 mg/L	1,973 mg/L	6,583 mg/L
Media	0,772 mg/L	1,813 mg/L	5,767 mg/L
Desv, Estándar	0,150	0,198	0,916
Coef, de variación	19,415 %	10,939 %	15,889 %

Según los resultados del ANOVA realizado, las varianzas a los tres niveles de concentración no difieren significativamente Fcal (0,17) < Fcrítica (5,14) para α=0,05 y 2,6 grados de libertad. Además, los valores de desviación estándar relativa en cada grupo están dentro de los límites

admisibles para métodos bioanalíticos, es decir, CV≤15 %, excepto para el menor nivel de concentración donde se acepta un CV de hasta un 20 %. [FDA, 2001]

4.5.3.3.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa la precisión bajo la influencia de variaciones intra-laboratorio, como por ejemplo, diferentes días, analistas, instrumentos, etc.

La tabla 11 contiene los resultados obtenidos para el análisis de muestras de plasma humano con adición de G-1 a 2 mg/L, tres días sucesivos y preparando tres réplicas cada día.

Tabla 11. Resultados del estudio de la precisión intermedia.

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3
Muestra 1	1,591 mg/L	2,141 mg/L	2,282 mg/L
Muestra 2	1,875 mg/L	2,371 mg/L	2,413 mg/L
Muestra 3	1,973 mg/L	1,973 mg/L	2,092 mg/L
Media	1,813 mg/L	2,162 mg/L	2,262 mg/L
Desv, estándar	0,198	0,200	0,161
CV “por día”	10,939 %	9,239 %	7,140 %
CV “global”		12,544 %	

Según los resultados del análisis de varianza, las concentraciones medias determinadas a los diferentes días son significativamente diferentes entre sí (Fcal (15,88) > Fcrítica (5,14) para α=0,05 y 2,6 grados de libertad). Sin embargo, las varianzas asociadas a esas concentraciones medias por día no son significativamente diferentes. (Fcal (2,00) < Fcrítica (5,14) para α=0,05 y 2,6 grados de libertad).

Además, tanto los valores de desviación estándar relativa (CV) para cada día como la cifra global, están dentro de los límites admisibles para métodos bioanalíticos, en los que se aceptan valores de CV que no excedan el 15 %. [FDA, 2001]

4.5.3.4. 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 2 mg/L fue de 90,7 %.

Este valor es superior a la recuperación media (67,2 %) que se obtuvo al emplear la extracción mediante dispersión en matriz sólida (MSPD) y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), donde en el proceso de extracción se lavaba el cartucho con agua destilada para eliminar interferencias (básicamente proteínas plasmáticas). Sin embargo, con el procedimiento de extracción empleado ahora, las proteínas quedan retenidas en la co-lumna sin que sea necesario lavar el cartucho con agua. Los resultados sugieren que el menor contacto del G-1 con el agua (limitado aquí a la interacción con la matriz acuosa del plasma)

conduce a una menor degradación del mismo, con lo que se incrementa el por ciento de recuperación.

4.5.3.5. Especificidad

A continuación se exponen los cromatogramas registrados para el n-hexano utilizado en la elución de los cartuchos de MSPD (figura 32) y el correspondiente a la disolución resultante del lavado de 1 g del material C-18 y 1 g de silicagel con el mismo disolvente (figura 33).

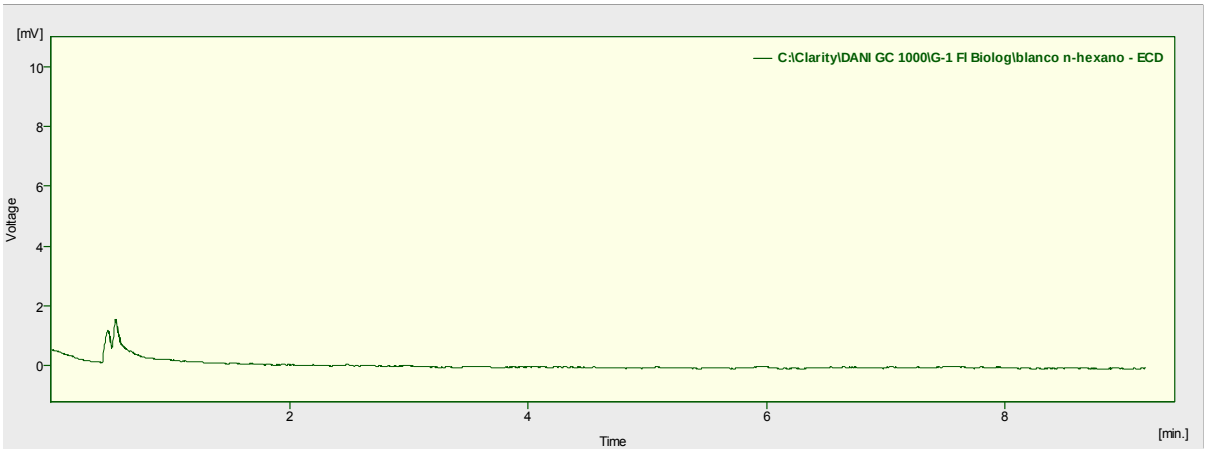


Figura 32. Cromatograma correspondiente a la inyección de n-hexano puro.

Como puede apreciarse, ni el disolvente ni los materiales adsorbentes (C-18 y silicagel) contienen impurezas capaces de originar señales potencialmente interferentes durante el análisis del eluato que se obtiene en el proceso de extracción del G-1 desde el plasma, mediante MSPD. Es decir, que estos resultados descartan al n-hexano, al material C-18 y a la silicagel como fuentes de señales potencialmente interferentes en el cromatograma final.

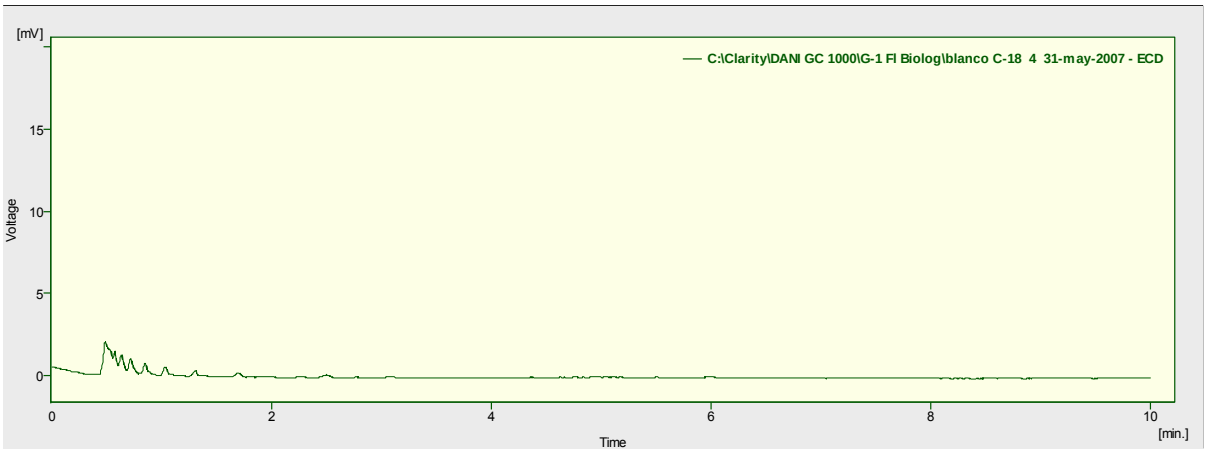


Figura 33. Cromatograma correspondiente a la inyección de la disolución de lavado de 1 g de material C-18 con n-hexano.

La figura 34 contiene el cromatograma correspondiente a un blanco (plasma con estándar interno y sin adición de G-1) sometido al proceso de MSPD y analizado según el procedimiento de GC-ECD descrito en este trabajo.

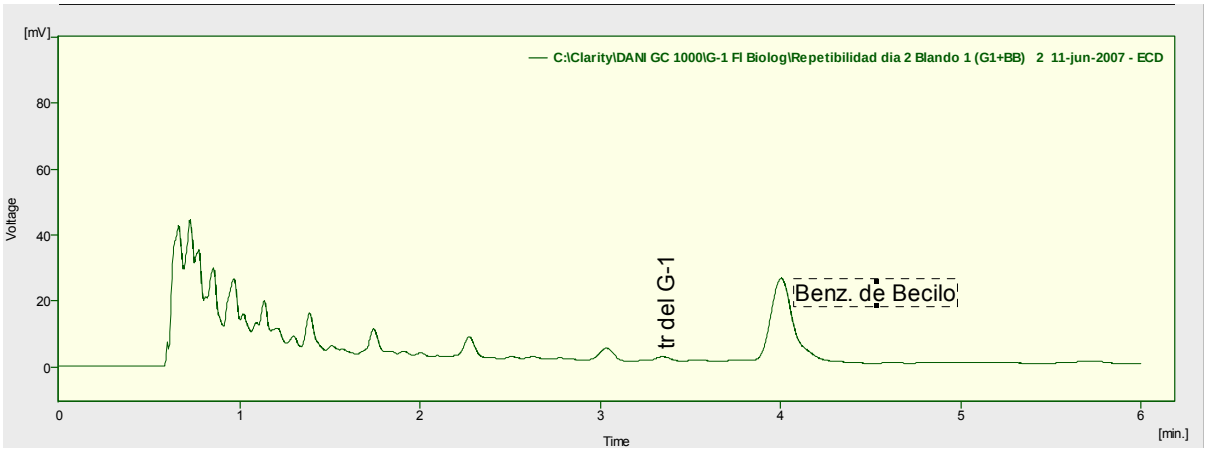


Figura 34. Cromatograma correspondiente a la extracción por MSPD de un blanco (plasma con estándar interno).

En el intervalo alrededor del tiempo de retención del G-1 (aproximadamente 3,3 minutos) no aparecen señales debido a componentes del plasma que pudieran interferir en la determinación del G-1. No obstante, en la posición que se indica en el cromatograma, aparece una señal no cuantificable que, debido a su escasa intensidad, no se puede distinguir con certeza del ruido (oscilaciones normales) de la línea base. Esto aparentemente se debe a contaminación con G-1 presente en el material utilizado en la preparación de la muestra o en componentes del instrumento (por ejemplo, el septum y otras partes del inyector) y que se hacen evidentes al utilizarse un sistema de detección tan sensible como el de captura electrónica, con límite de detección para el G-1 en el orden de las pocas partes por billón (74,1 μg/L).

En la figura 35 se exhibe un cromatograma típico de la extracción de G-1 desde plasma mediante MSPD y análisis por GC-ECD

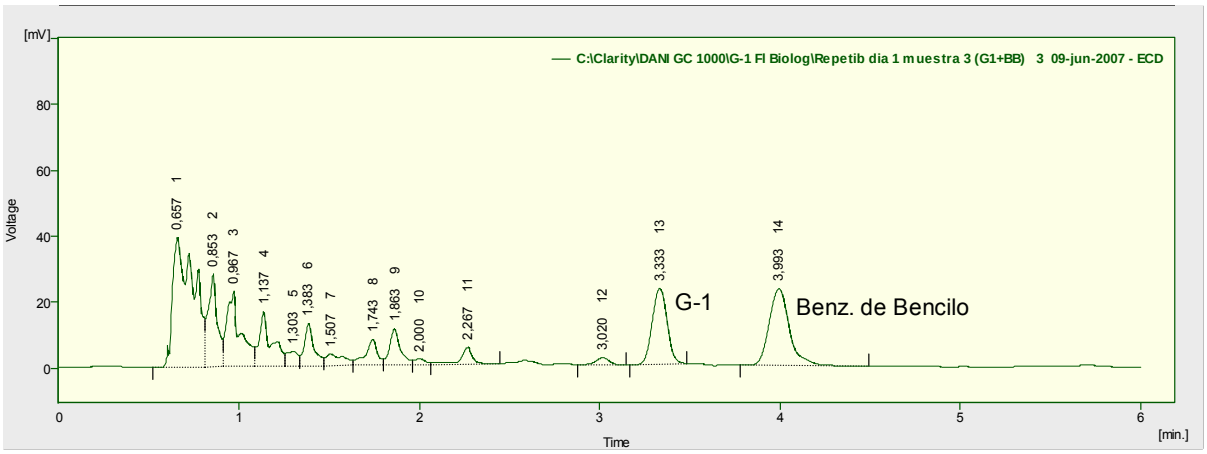


Figura 35. Cromatograma correspondiente a la extracción de G-1 desde una muestra de plasma mediante MSPD y análisis por GC-ECD.

5. CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones empleadas, se demostró la utilidad de la extracción en fase sólida como alternativa para la concentración y purificación de muestras de G-1 en plasma humano.
2. La técnica analítica de cuantificación de G-1 por cromatografía de gases con columna empacada y detector de ionización por llama resultó ser sensible (DL = 0,001411 µg y QL = 0,001534 µg) y lineal en el intervalo de masas entre 0,00167 µg y 0,0200 µg.
3. El procedimiento para la extracción de G-1 en muestras de plasma humano mediante dispersión en matriz sólida y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia resultó ser sensible (DL = 0,32 mg/L y QL = 0,96 mg/L), lineal en el intervalo de concentraciones de 1,2 mg/L a 90 mg/L, preciso, exacto y específico.
4. El procedimiento para la extracción de G-1 en muestras de plasma humano mediante dispersión en matriz sólida y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica resultó ser sensible (DL = 0,0741 mg/L y QL = 0,1452 mg/L), lineal en el intervalo de concentraciones de 0,5 mg/L a 8 mg/L, preciso, exacto y específico.

6. RECOMENDACIONES

1. Aplicar los procedimientos de dispersión en matriz sólida y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia y de gases a muestras reales obtenidas de animales de experimentación, a los que se haya administrado, por vía sistémica, alguna formulación de G-1.
2. Estudiar la utilidad de los procedimientos descritos en el estudio de determinación de G-1 en tejidos, órganos (hígado) y otros fluidos biológicos (orina) con vistas al estudio farmacocinético de este producto.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Arribas, A., Bermejo, E., Chicharro, M. & Zaprdiel, A. (2007). Application of matrix solid-phase dispersion to the propham and maleic hydrazide determination in potatoes by differential pulse voltammetry and HPLC. 71, 430-43.

2. Bakalova, R., Mileva, M., Kotsev, C., Bardarov, V. & Ribarov, S.(2000). Determination of malondialdehyde in biological samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 22(5): 267.

3. Baniceru, M.; Croitoru, O.; Popescu, S.M., & Popescu, A.I. (2004). Analysis of Mepivacaine in Human Serum by Gas Chromatography After Solid-Phase Extraction. J. Chromatographia. 59 (5-6), 351-354.

4. Blondeau, J.M., González, O. & Medina, R. (1997). In vitro evaluation of G-1: A novel antimicrobial compound. Technical Report. Saskatoon. Department of Clinical Microbiology, St. Paul's Hospital.

5. Bogialli, S., Dicorcia, A., Lagana, A., Mastrantoni, V. & Sergi, M. (2007). A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide flash and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 21, 237-246.

6. Bravo, L.R., Jiménez, E., Muro, D., Calvo, A.M., Morales, S., Consuegra, S., Rodrígez, M. & Valdés, T. (1999). Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.Revista Afinidad. 479.

7. Bulletin 910. Guide to solid phase extraction. Supelco 1998.

8. Calpena Campnamy, A.C. (1990). Validación de los métodos analíticos. Barcelona, Universidad de Barcelona.

9. Carballo, N. & Col. (1997) I. Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de las células germinativas del ratón Cenp: NMRI. informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

10. Carballo, N. & Col. (1997) II. Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de médula ósea en rata Cenp: SPRD. Informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

11. Carballo, N. & Col. (1997) III. Evaluación Mutagénica del G-1. Ensayo de Anormalidades de la cabeza del espermatozoide del ratón Cenp: NMRI. informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

12. Carballo, N. & Col. (1997) IV. Evaluación Mutagénica del G-1. Ensayo de micronúcleos en la médula ósea del ratón Cenp: NMRI. Informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

13. Carlucci, G.; Mazzeo, P.; Guadagni, S. & Palumbo, G. (1999). Mitomycin C in biological fluids: Comparison of disk and cartridge solid-phase extraction and quantitation by HPLC in human plasma and ultrafiltrate. Chromatographia, 50 (9-10), 561-564.

14. Casas, M.; Berrueta, L.A.; Gallo, B. & Vicente, R. (1992). Solid phase extraction conditions for the selective isolation of drugs from biological fluids predicted using liquid chromatography. Chromatographia, 34 (1-2), 79-82.

15. Castillo, A., y Col. Metodologías usadas para la determinación de Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato) en muestras de distinto origen. [on line] Disponible en URL: http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-Agrarias/A-030.pdf. [citado 18 de enero de 2005].

16. Castiñeira Díaz, M. & González San Miguel, H.M. (2002). Centro de medicamentos 2. La Habana. Félix Varela.

17. Castro Cels, M., Gastón Fora, S., Pujol Forn, M., Sans Roca, J.M. & Vicente Pla, L. (1989). Validación de métodos analíticos. Monografía A.E.F.I.

18. Cela, R., Lorenzo, R. & Casais, M. (2002). Técnicas de Separación en Química Analítica., España, Síntesis Santiago de Compostela.

19. Chi-Kong, L.; Ting, L.; Kam-Ming, A. & Yan-Wo, C. (1997). Uniform SPE procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC/photodiode-array detection. Clinical Chemistry, 43/2, 312-325.

20. Chu, X. & Yao, H. (2005). Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. 1063, 201-210.

21. Colin, F., Ajith, D. & revathy, S. J. (2002). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. J. Chromatography A, 885 17-39.

22. Cortés, R.R. (1997) Algunos aspectos toxicológicos del G-1. Centro de Bioactivos Químicos. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.

23. Cortés, R.R., Pérez, J.A, & Reinir, T. (1997). Some Toxicological issues of ophthalmic ointment Queratofural. 20, 292-293.

24. Covaci, A & Schepens, P. (2001). Persistent organochlorine pollutants in human boy fluids. Analytical Letters, 34 (9), 1449 – 1460.

25. Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N° M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2007.

26. Desnaturalización y reconocimiento de proteínas. Laboratorio de Bioquímica. Universidad de Bogotá. [on line] Disponible en URL:http://www.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/bioquimica/guia_2_1.pdf. [citado 19 de mayo de 2006].

27. Determinación cuantitativa de aminoácidos. [on line] Disponible en URL: http://www.monografías.com/trabajos7/amin/amin2.shtml. [citado 19 de marzo de 2006].

28. Dorea, H. & Lima Sobrinho, L. (2004). Analysis of Pesticide Residues in Rice Using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD). 15 690-694.

29. Estrada, E. (1998). Structure-mutagenicity relationsshipsin 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. Mut. Res., 420, 67 -75.

30. Estrada, E., Castañedo, N.R. & Pomés, R. (1993) I. Análisis estructural del G-1. En Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

31. Estrada, E., Rodríguez, J., González, O., Silveira, E.A., Castañedo, N.R. & (1993) II. Actividad antifúngica del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) frente a hongos filamentosos. En Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

32. FDA (Food and Drug Administration). (2001). Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation.

33. Fernández Serret, A. (1996). Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. , La Habana, Editorial Pueblo y Educación.

34. Ferrer, C., Gómez, M., García-Reyes, J., Ferrer, I., Thurman, E. & Fernández -Alba, A. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 1069, 183-194.

35. Fox, D.; Long, G.; Telepchak, M. & Heebner, E. Fluoxitene and norfluoxitene analysis using SPE and Gc/MS detection. United Chemical Technologies, Inc. [on line] Disponible en URL: http://www.innosep.cn/old/Research%202/2RP08.pdf. [citado 2 de febrero de 2005].

36. Furusawa, N. (2006). Separating DDTs in edible animal fats using matrix solid-phase dispersion extraction with activated carbon filter, Toyobo-KF.44, 498-503.

37. García-Reyes, J., Ferrer, C., Thurman, E., & Fernández -Alba, A & Ferrer, I. (2006). Analysis of herbicides in olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry.54, 6493-500.

38. Gizaand, I & Sztwiertnia, U. (2003) Gas Chromatographic Determination of Azoxystrobin and Tifloxystrobin residues in apples. 226 -229.

39. González, O., Ramírez, T., Silveira, E. A., Herrada, N. & Machado, R. (1993) I. Estandarización de la técnica para la evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica del producto G-1 frente a los hongos dermatofitos. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

40. González, O., Ramírez, T., Silveira, E.A., Medina, R., Delgado, M.S., Castañedo, N.R. & Col. (1993) II. Mínima Concentración Inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género Candida. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

41. González, O., Silveira, E., Castañedo, N., Magariño, O. y Gómez, R. (1993) III. Actividad antimicrobiana del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

42. González, O., Silveira, E. A., Reyes, T., Hidalgo, P. y Chirino-Trejo, J. (1993) IV. Actividad antifúngica *in vitro* del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias enteropatógenas. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

43. González, P.E., Bonet, R.L., Suardíaz, P.J., Meleán, C.J. & Valdés, S,R. (1997). Determinación de ciclosporina A en sangre total mediante la cromatografía líquida de alta resolución con extracción en fase sólida. Bioquimia, 22(2): 689-692.

44. Hasegawa, C.; Kumazawa, T.; Fujishiro, M.; Lee, X.; Marumo, A.; Shoji, Y.; Sato, J.; Seno, H.& Sato, K. (2005). Extraction of Muscle Relaxants in Human Body Fluids by Solid-Phase Extraction. Analytical Letters, 38 (9), 1379 – 1388.

45. Husain, S.W., Kiarostami, V., Morrovati, M. & Tagebakhsh, M.R. (2003). Multiresidue Determination of diazinon and ethion in pistachio nuts by use of matrix solid phase dispertion with a lanthanum silicate co-column and gas chromatography., 208-214.

46. ICH Harmonised Tripartite Guideline (1995). International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability. Part VIII. Federal Register. FDA. USA, 60(40) 11260.

47. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). International conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology.

48. Jasińska, A; Starczewska, B.; Polkowska, M. & Puzanowska, H. (2005). Solid Phase Extraction of Olanzapine with Reverse Phase Sorbents Prior to UV and HPLC Analysis Analytical Letters, 38 (5), 815 – 824.

49. Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S. (1993) I. Validación de la técnica de determinación por cromatografía líquida de alta eficacia del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control En: Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N° M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2007.

50. Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S. (1993) II. Validación de la técnica de determinación por cromatografía gaseosa del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control En: Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N° M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2007.

51. Jorge, E., Jiménez, I., Bravo, L.R., Díaz, M., Diduk, N., Morales, S. & Col. Estudio de estabilidad de la materia prima para medicamentos G-1. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro

Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001. I.

52. Jorge, E.; Jiménez, I.; Calvo, A. & col. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Materia prima. Métodos de Control. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001. II.

53. Karasová, G., Lehotany, J., Klodzinska, E., Gadzala-Kopciuch, R. & Buszewski, B. (2006). Comparison of Several Extraction Methods for the Isolation of Benzoic Acid Derivatives from Melissa officinalis. 29, 1633-1644.

54. Kunihiro, K. (2007). Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography–mass spectrometry with photodiode array detection. 18, 301-305.

55. Laboratorio de Control de la Calidad, CBQ, UCLV. 2005. Procedimiento Normalizado de Operación G-1 puro. Determinación de la pureza por HPLC.

56. Landry, F. (1990). Estudio de estabilidad preliminar del G-1, compuesto furánico. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.

57. Lehotay, S.J., Mastovská, K. & Yun, S.J. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. 88, 630 - 638.

58. Li-Bin, L., Yuki, H., Ya-Ping, Q., Hai-Xia, Z & Jin-Ming, L. (2007). Development of automated online gel permeation chromatography–gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products. 845, 61-68.

59. Martínez, A., Ramil, M., Montes, R., Hernanz, D., Rubí, E., Rodrígez, I & Torrijos, R. (2005). Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated biphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection. 1072, 83-91.

60. McGrane, M., O'keeffea, M. & Smythb, M. (1998). Multi-residue analysis of penicillin residues in porcine tissue using matrix solid phase dispersion. 123, 2779 - 2783.

61. Molina, R. & Rosado, A. (1994). Estudio de los productos de degradación del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano en medio acuoso. CBQ, UCLV.

62. Mulder, E.; Anderson, G.; De Vries, E.; Minderaa, R. & Kema, I. (2005). Automated on-line SPE coupled with HPLC for measurement of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in urine.Clinical Chemistry, 51 (9), 1698-1703.

63. Muro, D.; Morales, S. & Bravo, L. Empleo de técnicas cromatográficas en la evaluación de impurezas del G-1. Trabajo de Diploma UCLV. 1993.

64. Ondra, P.; Zednikova, R. & Matlach, R. (2005). Possibilities and problems with identificaction and determination of new hypnotics. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc, 149(2), 469-472.

65. Pant, K.J. (1996). Evaluation of a test article in the Salmonella typhimurium/Escherichia coli plate incorporation mutation assay in the presence and absence of Aroclor-induced Rat Liver S-9 with a confirmatory Study. Techinal Report of G-1. Rockville. Maryland, Sitek Research Laboratory.

66. Pérez, M. Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la cuantificación de G-1 en dispersión sólida al 30 % con PEG-6000. Trabajo de Curso UCLV. 1998-1999.

67. Pérez, G., Saínz, O. & González, J. (1996). Evaluación in vivo del potencial del G-1 para inducir reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratón. Reporte técnico. Villa Clara, Cuba. Centro de Bioactivos Químicos; Unidad de Toxicología Experimental.

68. Persson, E.; Lofgren, L.; Hansson, G.; Abrahamsson, B.; Lennernas, H. & Nilsson, R. (2003). Simultaneous assessment of lipid classes and bile acids human intestinal fluid by SPE and HPLC methods. J. lipid research, 64, 24-26.

69. Phillips, D.; Tebbett, I.R. & Kalita, S. (1990). Solid phase extraction and analysis of horse urine for aminocaproic acid. J. Chromatographia, 30 (5-6), 30, 309-310.

70. Plasma Sanguíneo. Artículo de la Enciclopedia Libre Universal en Español. [on line] Disponible en URL: http://enciclopedia.us.es/index.php/Plasma_sangu%EDneo [citado 6 de febrero de 2007].

71. Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.

72. Ramírez, A. & González, M.M. Cinética de degradación del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. CBQ, UCLV. 1995.

73. Römsing, S.; Ulfberg, J & Bergqvist, Y. (2003) I. Determination of melatonin in human plasma with solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J. Clinical and Laboratory Investigation, 63 (1), 81-88.

74. Römsing, S.; Bökman, F & Bergqvist, Y. (2003) II. Determination of melatonin in saliva using automated solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J. Clinical and Laboratory Investigation, 66 (3), 181-190.

75. Rubinson, K.A. & Rubinson, J.F. (2001). Análisis Instrumental., Madrid. Pearson Educación, S.A.

76. Ruiz, M., Cameán, A., Moreno, I. & Picó, Y. (2005). Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. 1073, 257-262.

77. Sangre. De Wikipedia, la enciclopedia libre. [on line] Disponible en URL: http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre [citado 6 de febrero de 2006].

78. Schematic of an HPLC instrument. [on line] Disponible en URL: http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm [citado 29 de agosto de 2007].

79. Skoog, D. & Leary, J. (1994) Análisis Intrumental. 4ta edición.

80. Smith, C.J.; Huang, W.; Walcott, C.J. Turner, W.; Grainger, J. & Patterson, D.G. (2002). Quantification of monohydroxy-PAH metabolites in urine by solid-phase extraction with isotope dilution-GC-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372 (1), 216-220.

81. Solid phase extraction. Publisehd by Lotus® Freelance Graphics®. [on line] Disponible en URL: http://www.SPE_site1.htm. [actualizado 24-Apr-2002]. [citado 23 de marzo de 2005].

82. Steven Barker, Austin Long and Charles Short. Lousiana State University. 1989. (U.S. patent # 5,272,094, issued Dec. 21, 1993.

83. Stubbs, C.; Skinner, C. & Kanfer, I. (1990) Re-usability of solid-phase extraction columns during the HPLC analysis of some macrolide antibiotics in serum and urine. J. Chromatographia. 29 (1-2), 31-34.

84. Technical Note[111]. Argonaut Technologies. Inc.2002.

85. Thurman, E. M.; Mills, M. S. Solid Phase Extraction. Principles and Practic. John Willey & Sons. 1998 p. 344.

86. Totti, S., Fernández, M., Ghini, S., Picó, Y., Fini, F., Mañes, J. & Girotti, S. (2006). Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their may. metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. 69, 724-729.

87. United State Pharmacopoeia (USP 27), 2004.

88. Valsamak, V., Boti, V., Sakkas, V. & Albanis, T. (2006). Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. 573-574, 195-201.

89. Vitrofural®. Registro Central de Plaguicidas. N° de permiso 013/99, Tomo 3, Folio 249. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba. 1999.

90. Wang, S., Xu, Y., Pan, C., Jiang, S. & Liu, F. (2007). Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. 387, 673-685.

91. Xu, J. (1996). Test for Chemical induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow cells. Technical Report of G-1. Rockville. Maryland. Sitek Research Laboratory.

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** *Fecha de Fabricación:* 03-07-14
Folio: -- *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 ^{o}C – 92,0 ^{o}C*
b) Espectro UV-VIS	Cumple	*Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm*
Pérdidas por Desecación	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* *Enterobacteriacene* *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	J' Control de la Calidad
Firma	
Fecha	04-07-23

Anexo 2

CBQ

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

Certificado de Calidad

Producto **G-1**
Folio: 82-04
***Fecha de reanálisis:* 06-11**
Fecha de Fabricación: 03-03-27
Lote: 03-3-13

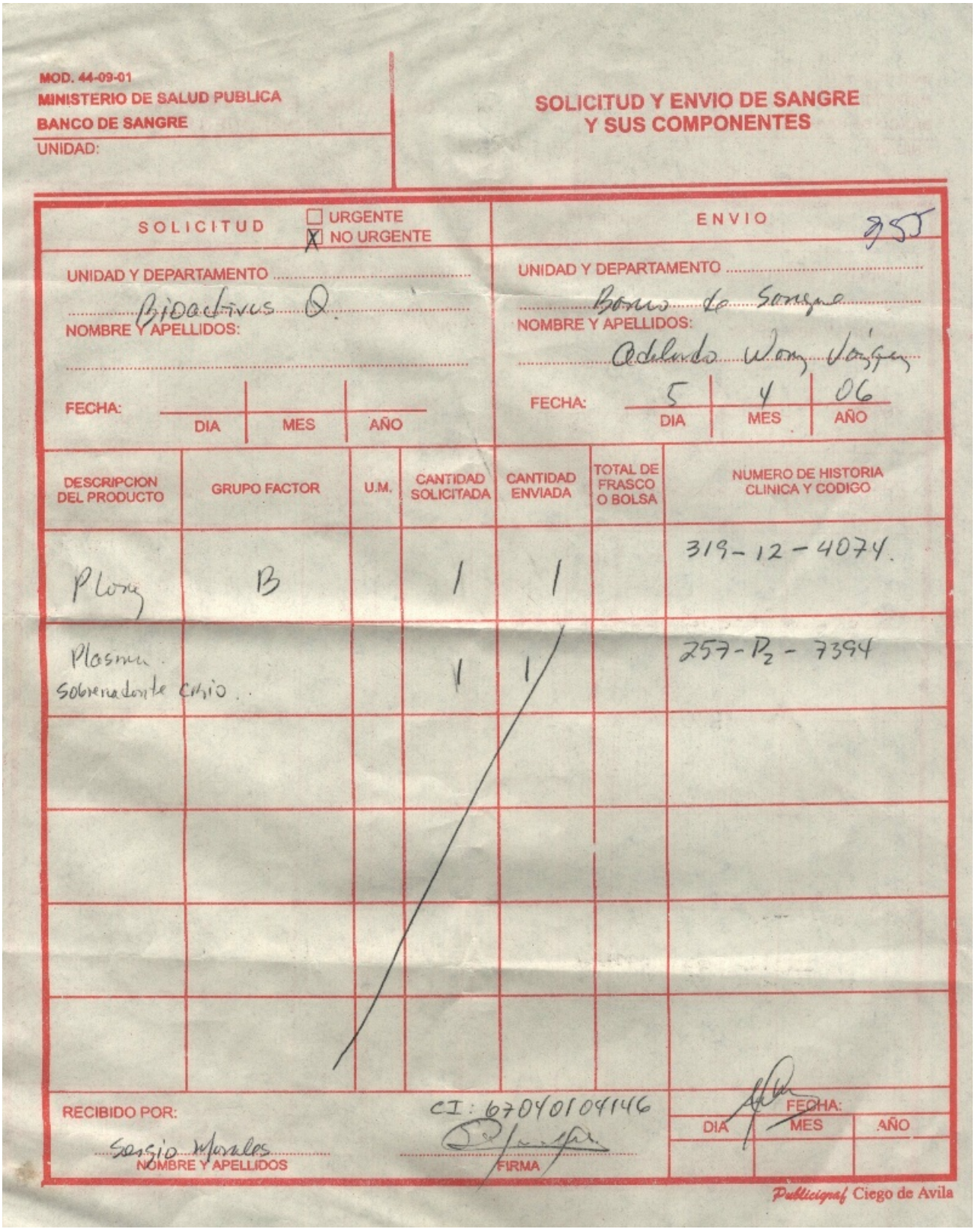
ENSAYOS	***RESULTADOS***	***LÍMITES***
Características Organolépticas		
a) Aspecto	Cumple	*Cristalino*
b) Color	Cumple	*Amarillo*
c) Olor	Cumple	*Característico*
Identificación		
a) Rango de Fusión	--	*89,0 ^{o}C – 92,0 ^{o}C*
b) Espectro UV-VIS	Cumple	*Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm*
Pérdidas por Desecación	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* *Enterobacteriacene* *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 ☐ URGENTE ☒ NO URGENTE

UNIDAD Y DEPARTAMENTO: Bioactivos Q.
NOMBRE Y APELLIDOS:
FECHA: DIA | MES | AÑO

ENVIO 955

UNIDAD Y DEPARTAMENTO: Banco de Sangre
NOMBRE Y APELLIDOS: Adelaida Wong Vargas
FECHA: 5 (DIA) | 4 (MES) | 06 (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 crio.			1	1		257-P2-7394

RECIBIDO POR: Sergio Morales (NOMBRE Y APELLIDOS) CI: 67040104146 (FIRMA)
FECHA: DIA | MES | AÑO

Publicigraf Ciego de Avila