

*Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
Facultad de Química-Farmacia.
Departamento de Farmacia.*

*Tesis para optar por el título de Licenciada en
Ciencias Farmacéuticas.*

*Título: Determinación de G-1 en plasma humano
empleando SPE y GC-ECD.*

Autora: Aylen Hernández García.

Tutores: Dr. Sergio Morales Fernández.

Msc. Amalia Maria Calvo

*Santa Clara.
2008.*



A través del estudio de las variables experimentales que influyen en el proceso de extracción en fase sólida, se establecieron las condiciones de trabajo para la extracción de G-1 a partir de muestras de plasma humano. Las muestras desproteinizadas se extrajeron empleando cartuchos de fase inversa RP C-8, acondicionados con dos volúmenes de 2 mL de acetonitrilo y dos volúmenes de 2 mL de agua destilada. Antes de la elución, los cartuchos fueron sometidos a un proceso de lavado con agua destilada y secados con corriente de nitrógeno. La elución del G-1 se realizó con dos porciones de 2 mL de n-hexano.

La técnica estudiada para la extracción de G-1 desde plasma humano mediante extracción en fase sólida y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica se sometió a un proceso de validación, siguiendo la metodología ICH, resultando ser lineal en el intervalo de 0,1 a 8 mg/L, precisa, exacta, específica y sensible, con límite de detección de 0,0067 mg/L y límite de cuantificación de 0,017 mg/L.

**ÍNDICE**

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades de la molécula de G-1.....	3
2.2. Actividad biológica y toxicidad del G-1.....	3
2.3. Solubilidad y estabilidad del G-1.....	4
2.4. Métodos de extracción de fármacos desde fluidos biológicos.....	5
2.4.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	5
2.4.1.1. Aplicaciones de la extracción en fase sólida (SPE).....	7
2.5. Fundamento teórico de la técnica analítica Espectrofotometría ultravioleta visible.	10
2.6. Técnicas cromatográficas empleadas en la determinación de fármacos en matrices biológicas.....	12
2.6.1. Generalidades de la cromatografía.....	12
2.6.2. Cromatografía de gases.....	12
2.7. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos....	14
2.7.1. Linealidad.....	14
2.7.2. Precisión.....	15
2.7.3. Especificidad.....	16
2.7.4. Exactitud.....	17
2.7.5. Límite de detección y cuantificación.....	18
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1. Equipamiento.....	20
3.2. Reactivos.....	20
3.3. Materiales.....	21
3.4. Evaluación de las variables experimentales que influyen en la extracción en fase sólida.....	21
3.4.1. Selección del adsorbente (fase sólida).....	21
3.4.2. Volumen de rotura.....	21
3.4.3. Acondicionamiento del cartucho.....	22
3.4.4. Flujo de introducción de la muestra en el cartucho de (SPE).....	22
3.4.5. Propiedades de la muestra.....	23
3.4.6. Lavado del cartucho (eliminación de interferencias).....	23
3.4.7. Secado del cartucho previo a la elución.....	23
3.4.8. Volumen de elución.....	23
3.5. Técnica empleada para la determinación de G-1 por cromatografía de gases y detector de captura electrónica.....	24
3.6. Validación del procedimiento de extracción en fase sólida y determinación por cromatografía de gases y detector de captura electrónica.....	24
3.6.1. Linealidad.....	24
3.6.2. Precisión	25
3.6.2.1. Repetibilidad instrumental.....	25
3.6.2.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración.....	25
3.6.2.3. Precisión intermedia.....	25
3.6.3. Exactitud.....	25
3.6.4. Especificidad.....	25
3.6.5. Límite de detección y cuantificación.....	26
3.7. Procesamiento estadístico de los datos.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Generalidades.....	27



4.2. Evaluación de las variables experimentales que influyen en la extracción en fase sólida.....	28
4.2.1. Selección del adsorbente (fase sólida).....	28
4.2.2. Volumen de rotura.	29
4.2.3. Acondicionamiento del cartucho.	30
4.2.4. Flujo de introducción de la muestra al cartucho de (SPE).	30
4.2.5. Propiedades de la muestra.....	31
4.2.6. Lavado del cartucho.....	31
4.2.7. Secado del cartucho previo a la elución.....	32
4.2.8. Volumen de elución.	33
4.3. Validación del procedimiento de (SPE) y determinación cromatográfica por GC-ECD de G-1 en plasma.....	34
4.3.1. Linealidad.....	34
4.3.2. Precisión.....	35
4.3.2.1. Repetibilidad instrumental.....	35
4.3.2.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración.....	36
4.3.2.3. Precisión intermedia.	37
4.3.3. Exactitud.....	38
4.3.4. Especificidad.....	38
4.3.5. Límite de detección y cuantificación.....	41
5. CONCLUSIONES	42
6. RECOMENDACIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	44
8. ANEXOS	



1. INTRODUCCIÓN

El 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno, o G-1, es un principio activo, sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas el cual se ha manifestado como un potente bactericida-fungicida de amplio espectro. Esta actividad ha sido comprobada frente a un gran número de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, levaduras y hongos, lo cual lo convierte en un excelente candidato a formular como medicamento antimicrobiano.

La obtención de formulaciones para uso sistémico a partir de este principio activo es uno de los proyectos en el que se trabaja actualmente en el Centro. Se conoce que para el registro de un medicamento es requisito indispensable, entre otros, la realización de ensayos que definan las propiedades y parámetros farmacocinéticos, que caractericen la absorción, distribución y excreción del fármaco, así como las posibilidades del mismo para llegar al sitio de acción.

El reto más importante al desarrollar métodos bioanalíticos con estos fines consiste en separar, selectivamente, el principio activo y/o sus metabolitos de los interferentes endógenos, lo que normalmente requiere de un proceso de preparación de muestras eficiente, una separación cromatográfica adecuada y un sistema de detección sensible.

Durante la preparación de la muestra se persigue eliminar componentes no deseados de la matriz, concentrar los analitos para alcanzar niveles detectables, obtener un extracto compatible con el proceso de separación cromatográfica y aislar los analitos de interés.

Desde su introducción comercial en 1979 la extracción en fase sólida (SPE) ha ido sustituyendo a los métodos de extracción líquido-líquido utilizados hasta entonces en la preparación de muestras para ensayos bioanalíticos, debido a una serie de ventajas de orden práctico, como la no formación de emulsiones, mejores recuperaciones de analitos, extractos más limpios, la posibilidad de eliminar selectivamente interferencias y componentes de la matriz, uso de volúmenes mucho más bajos de disolventes y por consiguiente una menor producción de desechos.



Otra ventaja de la SPE sobre la extracción líquido-líquido radica en que esta última requiere al menos dos y normalmente tres equilibrios sucesivos de las fases para lograr recuperaciones más altas. Además, la diversidad de adsorbentes y la posibilidad de utilizar una gran variedad de disolventes y mezclas como eluyentes, proporcionan a la SPE un grado muy alto de versatilidad, en comparación con la extracción líquido-líquido. La posibilidad de automatización del proceso de extracción ha sido mucho más explotada en la SPE que en la extracción líquido-líquido.

Finalmente, en cuanto a la determinación analítica de G-1 en muestras de plasma, se han descrito varios métodos, fundamentalmente basados en la espectrofotometría ultravioleta visible y los cromatográficos, dentro de ellos HPLC y GC. Estos últimos métodos suelen ser los más utilizados por sus ventajas en términos de selectividad y sensibilidad.

En consecuencia, los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General

- Disponer de una técnica analítica validada en la que se emplee la extracción en fase sólida (SPE) y la cromatografía de gases (GC-ECD) para la determinación de G-1 en plasma humano.

Objetivos Específicos

- Estudiar las variables experimentales relacionadas con la recuperación del G-1 en el proceso de extracción en fase sólida.
- Desarrollar y validar una técnica analítica aplicando la metodología de extracción en fase sólida combinada con la cromatografía de gases (GC-ECD) para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de la molécula de G-1

El 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno, conocido como G-1, es un principio activo, sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas, cuya fórmula estructural se muestra en la figura 1.

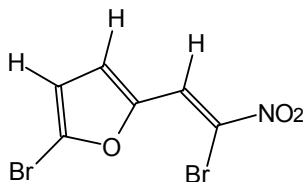


Figura 1. Estructura química del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.

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 magnético nuclear (RNM- ^1H). [Estrada, E., 1993 II]

2.2. Actividad biológica y toxicidad del G-1

El G-1 ha mostrado una potente 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]. Otros trabajos se refieren a su actividad frente a *Enterobacter* sp, *Klebsiella* y *Pseudomas aeruginosa*. Por otra parte, se obtuvieron resultados similares frente a 293 cepas de hongos gemantes del género *Candida*. [González, O., 1993 II; González, O., 1993 III] Esta actividad ha sido demostrada también frente a hongos dermatofitos y filamentosos. [Estrada, E., 1993; González, O., 1993]. Estudios más recientes corroboran estos resultados de actividad in vitro frente a 2702 microorganismos multi-resistentes. [Boldeau J.M., 1997] Como resultado de un estudio de toxicidad aguda por las vías oral y percutánea, en ratas Sprague Dawley machos y hembras, el G-1 ha sido catalogado como ligeramente tóxico, con valores de dosis letal media de 1856,3 mg/kg – 1506,2 mg/kg y 2370 mg/kg – 2205 mg/kg de masa corporal, respectivamente. [Cortés, 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. [Cortés, R.R., 1997; I, II]



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 principio 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 las 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] De acuerdo con los resultados de la actividad biológica y toxicidad de este principio activo, el G-1 constituye una molécula tentativamente favorecida como alternativa terapéutica en la línea de los antiinfecciosos. En la actualidad se amplían los estudios de toxicidad y de preformulación, que permitan la diversificación de este principio activo en cuanto a formas farmacéuticas para su posible empleo en el tratamiento de numerosas afecciones a través de las distintas vías de administración de fármacos.

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]
- ✚ Vitrofurul®: 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.^[Vitrofurul, 1999]
- ✚ Dermofurul®: ungüento tópico de uso humano empleado en el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel producidas por hongos y bacterias. Registro otorgado en 2007.^[Dermofurul, 2007]

2.3. Solubilidad y Estabilidad del G-1

Se han realizado varios estudios en la evaluación de la solubilidad y estabilidad del G-1, en estado sólido, disuelto en varios disolventes y en presencia de algunos excipientes de uso tradicional en formulaciones farmacéuticas. El G-1 es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido y benceno; soluble en tetracloruro de carbono, poco soluble en metanol absoluto y etanol 90°, difícilmente soluble en etanol 70°, y muy difícilmente soluble en agua.^[Jorge, E., 1993]



Algunos autores realizaron estudios de estabilidad del G-1 materia prima, donde se obtuvo que no sufrió degradación a una exposición de 35 días a condiciones de humedad de 100, 95, 86 y 76%, además, no se presentaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros evaluados en muestras expuestas durante 91 días a la luz. [Jorge, E. y Col. 1993 I]. Actualmente se realizan estos estudios de estabilidad del G-1 materia prima en los laboratorios DALTON en Canadá de acuerdo a lo establecido en las normas ICH para estudios de estabilidad de nuevos fármacos y nuevas formas farmacéuticas. [ICH., 2005] En estudios del comportamiento en disolución, se evidencia 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 solvente / G-1 catalizada por la luz. [Molina, R. & Rosado, A., 1994]

Molina y Rosado en 1995 [Molina, R. & Rosado, A., 1994] en un estudio sobre productos de degradación del G-1 en mezclas de agua y diferentes solventes a pH ácido, básico y neutro demostraron la rápida degradación del mismo en estas condiciones, con la formación de 5-bromofurfural. En un estudio de la cinética de degradación de G-1 en medio acuoso, se determinó que la degradación de este compuesto sigue una cinética pseudo-primer orden a pH, temperatura y fuerza iónica del medio constantes en el rango de pH 1,0 – 12,0, siendo más estable a pH 1,0.

2.4. Métodos de Extracción de fármacos desde fluidos biológicos

Los organismos vivos presentan numerosos fluidos biológicos los cuales cumplen funciones específicas dentro del organismo y estos a su vez están constituidos por numerosos compuestos y estructuras, consideradas como matrices biológicas complejas.

La determinación de los fármacos directamente en los diferentes matrices biológicas es muy compleja por lo que se hace necesario técnicas de separación, tales como:

2.4.1. Extracción por fase sólida (SPE)

Es un método de separación de muestras el cual 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; Colín, F. y Col., 2002; Solid phase extraction, 2002]

Aylen Hernández García.



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 en la extracción en fase sólida se presentan en los formatos de discos, cartuchos y jeringas.

Los cartuchos y las jeringas se construyen de polipropileno, el material adsorbente estará contenido entre dos fibras de polipropileno o polietileno. Los discos se construyen introduciendo pequeñas partículas de adsorbente (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 detallan a continuación y se muestran en la figura 2. [Thurman, E. M., 1998].

Pretratamiento de la muestra (si es necesario): consiste en una simple dilución para reducir la viscosidad, o ajustar pH y así favorece 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. 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, esto depende del tiempo y del volumen de la muestra.

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 eficiencia 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 la máxima sensibilidad. En muchas ocasiones resulta más eficiente eluir en dos pasos con $X/2$ mL de disolvente que en uno con X mL.

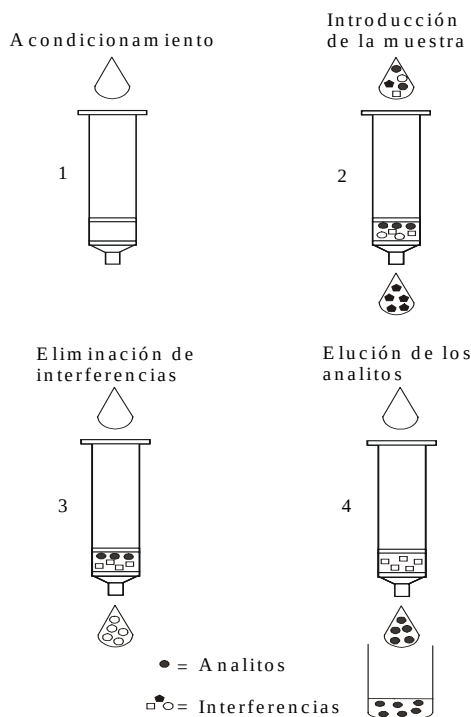


Figura 2. Proceso de extracción en fase sólida

2.4.1.1. Aplicaciones de la extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida, desde su surgimiento, es una técnica muy empleada en el análisis de diversos componentes 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.



En plasma y orina, Isoherranen, N. y col. en el 2000 determinaron gentamicina aplicando SPE relleno con sílice y HPLC. [Isoherranen, N. y col., 2000] Vyas, K. P. y col. en el 2000 utilizaron SPE con cartuchos SCX y cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas para la determinación de Rizatriptan en orina. [Vyas, K. y col., 2000]

En ese mismo año Burke, A. y col. analizaron en plasma y orina el (2,3-dinor-5,6 dihidroisoprostano F2 α -III) el cual es un producto de la oxidación del ácido γ -linolénico y un metabolito del isoprostano F2 α -III, para ello utilizaron SPE con cartuchos rellenos de C-18 y finalmente cuantificación por cromatografía de gases con espectrometría de masas para la detección. [Burke, A. y col., 2000]

En el 2001 Boos, K. y col. determinaron tramadol en plasma mediante SPE y HPLC con detector fluorométrico y ultravioleta. [Boos, K. y col., 2001] En plasma y orina Patrick, J. y col. en el 2001, aplicaron SPE con C-18 como relleno para la determinación de Ezetimibe y cromatografía líquida con espectrometría de masas para la detección, obtuvieron límites de cuantificación (LOQ) = 1,00 - 5,02 ng/mL. [Patrick, J. y col., 2001] Dufresme, CH. y col. en el 2001 analizaron sulfentanil en plasma mediante SPE con cartuchos MCX y finalmente cuantificación por cromatografía de gases con espectrometría de masas para la detección. [Dufresme, CH. y col., 2001]

Kim, I. y col. en el 2002 utilizaron SPE y cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas para la determinación de codeína en saliva y plasma humano. [Kim, I. y col., 2002] Dams, R. y Huestes, M. en el 2003 determinaron morfina en plasma utilizando SPE y HPLC. [Dams, R. y Huestes, M., 2003] En el 2004 Lagerstedt, S. y col. analizaron en plasma dos componentes, metanephrene y normetanephrene, para ello aplicaron SPE y cromatografía líquida con espectrometría de masas para la detección. [Lagerstedt, S. y col., 2004]

En el 2005 Pereda, D. y col. utilizaron cartuchos Absorbex RP-18 para la extracción de pentoxifilina en plasma y para la identificación emplearon HPLC con detector ultravioleta. [Pereda, D. y col., 2005] En ese mismo año Di Marco, A. y col. determinaron glucuronosil transferasa en microsomas mediante SPE y HPLC y la detección se llevó a cabo con espectrometría de masas. [Di Marco, A. y col., 2005] En el 2005 Maurer, H. determinó en sangre, plasma y fluidos orales diferentes tipos de drogas dentro de ellas anfetaminas, benzodiacepinas, anticonvulsivantes, opioides, serotonérgicos, neurolépticos y antidiabéticos, mediante SPE rellena con C-18 y cromatografía líquida



con detector espectrofotométrico de masas. [Maurer, H. y col., 2005] Aneesley, T. y col. en el 2005 usaron la combinación de SPE con cartuchos (Varían) y HPLC para la determinación del ácido micofenólico glucurónico en suero. [Aneesley, T. y col., 2005] En el 2005 Sobol, E. y col. emplearon la combinación de SPE con relleno C-18 y cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas para la determinación de 2, 2, 3,3-tetrametilciclopropano carbonil urea en orina y plasma. [Sobol, E. y col., 2005]

Gallardo, C. en el 2006 determinó en plasma glibenclamida y ketoconazol usando SPE con cartuchos rellenos de C-8, marca Waters, modelo Oasis y para la identificación y cuantificación de los analitos utilizó HPLC con detector fluorométrico y obtuvo por cientos de recuperación de 84 % y 70 %, respectivamente. [Gallardo, C., 2006]

Otros autores como Li, X. y col. en ese mismo año determinaron glibenclamida en plasma de rata pero sólo utilizaron HPLC con detector fluorométrico, con % de recuperación de 87 % y límite de cuantificación (LOQ) de 2,0 ng/mL para la glibenclamida. [Li, X. y col., 2006] En el 2006 Yao, J. y col. determinaron tres compuestos (triptolite, wilforlide y triptonide) en plasma humano, para ello emplearon la combinación de SPE con HPLC y detector de espectrometría de masas, obtuvieron límites de cuantificación (LOQ) de 0,25; 0,40 y 0,35 ng/mL respectivamente. [Yao, J. y col., 2006]

Charles, F. y col. en el 2006 emplearon SPE para la determinación de nicotina en orina y saliva, para la cuantificación e identificación del analito emplearon, para el caso de la saliva, cromatografía gaseosa y detector de ionización por llama; para el caso de la orina emplearon cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas, reduciendo de esta forma el esfuerzo y el tiempo empleado. [Charles, F. y col., 2006]

Dorani, H. y col. en el 2007 determinaron cuatro antibióticos en plasma (melagatran, ximelagatran, azitromicina y cefuroxime) utilizando SPE con cartuchos rellenos de C-18 marca Hypersil y cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas, obtuvieron límites de cuantificación (LOQ) de 10 ng/mL para los cuatro antibióticos. [Dorani, H. y col., 2007]

Haschke, M. y col. en el 2007 determinaron en plasma y orina humano 15-F2t Isoprostane usando la combinación SPE con adsorbente C-18 y HPLC con espectrometría de masas para la detección, con límite de cuantificación 0,025 ng/mL en ambas matrices biológicas. [Haschke, M. y col., 2007]

Para la separación de Isoprostane en orina Zhang, B. y col. en el año 2007 usaron cartuchos MCX y HLB Oasis, obteniéndose mejores resultados con los de HLB Oasis y para la cuantificación e identificación del



analito se empleó cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas. [Zhang, B. y col., 2007]

Person, E. y col. en el 2007 determinaron ácidos en fluido intestinal, para ello utilizaron la SPE con dos tipos de relleno C-18 y sílice y la cuantificación e identificación se llevó a cabo con HPLC. [Person, E. y col., 2007] En el 2008 Abraim, A. y col. emplearon cartuchos rellenos con C-18 para la SPE y el HPLC con detector ultravioleta (UV) para la cuantificación del verapamilo en plasma humano. [Abraim, A. y col., 2008]

2.5. Fundamento teórico de la técnica analítica Espectrofotometría Ultravioleta-Visible [Calpena Campany, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; www.ferber.hpg.ig.com; web2.senasica.sagarpa.gob.mx]

Es conocido que al hacer incidir energía radiante sobre una especie molecular, esta absorbe energía de la radiación sólo en regiones específicas del espectro, donde la radiación tiene la energía requerida para provocar cambios en los niveles electrónicos para los electrones de valencia, trayendo como resultado una transición electrónica. Esta energía puede ser cuantificada, lo que conduce a una banda de absorción a la longitud de onda de la energía involucrada. Este fenómeno, de forma general, constituye el basamento de la espectroscopia ultravioleta-visible. Las principales características de una banda de absorción son: posición, intensidad y forma.

La posición viene dada por la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para la transición electrónica. La intensidad de absorción de una banda puede expresarse como la absortividad molar en el máximo ($E_{\text{máx}}$) y depende de la probabilidad de interacción entre los fotones de la radiación y el sistema electrónico de la molécula.

La forma de la banda depende del número e intensidad relativa de los componentes vibracionales de una transición electrónica. [Pérez, C., 1985; Silverstein, R.M. 1977.] Los disolventes utilizados en técnicas analíticas que aplican la espectroscopia ultravioleta deben ser los apropiados tanto por su alto nivel de pureza, como por su transparencia en la zona de trabajo y sus posibles efectos en el sistema absorbente. La naturaleza del disolvente influye en la posición de los máximos de absorción. Es necesario emplear disolventes idénticos cuando se comparan espectros de absorción para fines de identificación.

El cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, es la base de los métodos de análisis cuantitativo, la cual establece que la fracción de la luz incidente que se absorbe por una muestra, es proporcional al número de moléculas encontradas en su camino, o sea, si la sustancia está disuelta en un disolvente, la absorción de la solución será proporcional a

Aylen Hernández García.



la concentración molar del soluto, siempre que el disolvente no presente absorción en la misma zona. [Pérez, C., 1985;]

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

(1)

Donde:

ε : Coeficiente de absorción (absortividad).

c: Concentración.

l: Espesor de la cubeta.

Si c se expresa en mol/L y l en cm, el coeficiente de absorción se convierte en coeficiente de extinción molar (absortividad molar). La intensidad de absorción se expresa generalmente en función de ε y la mayoría de las aplicaciones en espectrofotometría se basan en la ecuación antes mencionada.

El comportamiento de una sustancia respecto a la ley de Lambert-Beer debe comprobarse construyendo un gráfico de concentración contra absorbancia.

En ocasiones muchos sistemas varían su absorbancia en forma no lineal a altas concentraciones, ocurriendo desviaciones positivas y negativas de la ley; no es imprescindible que el sistema cumpla estrictamente la ley para poder usarse en el análisis, pues puede utilizarse sólo en el intervalo de concentración en que se cumpla.

Hoy en día no se acepta como regla espectrofotométrica la validez de esta ley para ningún sistema, si no ha sido previamente comprobada. Cuando se desarrolla un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de una sustancia se debe comprobar la validez de dicha ley para el disolvente empleado y en el intervalo completo de concentraciones en el que se va a trabajar.

La espectroscopía UV-VIS es una extensión de la colorimetría, ya que permite determinar la absorción de luz en una muestra, en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 700 nm. Para la determinación en la región ultravioleta es necesario emplear portamuestras de cuarzo que no absorbe en esta zona del espectro.

[\[www.chemendia.com;\]](http://www.chemendia.com;)



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

2.6.1. Generalidades de la cromatografía [Robinson, K.A & Robinson, J.F., 2001, Plummer, D. T.1981 & Crandall, G. D. 1983]

La cromatografía es un método físico para separar e identificar compuestos. Se basa en que cualquier sustancia, al ser disuelta en dos disolventes distintos no miscibles, se reparte entre ambos con arreglo a su solubilidad. La relación entre las solubilidades de dicha sustancia en cada uno de los disolventes se denomina Coeficiente de Reparto.

Si uno de los disolventes se mantiene fijo (Fase Estacionaria) se puede hacer desplazar el otro disolvente (Fase Móvil) sobre el primero. Las sustancias a cromatografiar se verán sometidas a una distribución entre las fases estacionaria y móvil de modo que las más solubles en la fase móvil avanzarán más que las que sean retenidas por la fase estacionaria.

En la actualidad 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 ejemplos. 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.

2.6.2. Cromatografía de gases (GC) [Cela R., 2002; Robinson, K.A., 20001]

En la figura 3 se observa el esquema de un cromatógrafo de gases.

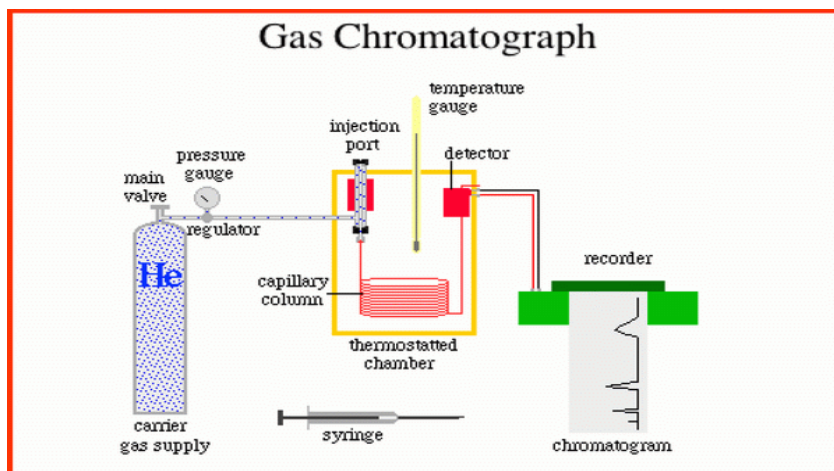


Figura 3. Esquema de un cromatógrafo de gases.

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que la fase móvil es un gas; comúnmente se emplean el 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 molecular y la distribución espacial de la molécula. Para la obtención del cromatograma se hace indispensable la utilización de detectores. Dentro de ellos uno de los más utilizados y el de interés en este trabajo es el de captura electrónica.

El detector de captura electrónica consiste en una cavidad que contienen dos electrodos y una fuente de radiación. Las colisiones entre los electrones (emisión β) emitidos por la fuente de ^{63}Ni o ^3H 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. [Skoog, D. & Leary, J., 1994]

2.7. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos

[Castro, M., 1989; Caleña, A.C., 1990; ICH., 2005; Reg. 41CECMED, 2007]

Validación de los métodos analíticos: La validación de los métodos analíticos utilizados en la actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

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.

2.7.1. Linealidad [ICH., 2005; Reg. 41CECMED, 2007; Fernández, A.; 1996]

Este estudio se efectuará tanto sobre soluciones patrón de analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito.



Los estudios de linealidad responderán a diseños similares a los que se describen a continuación:

a) El ensayo se puede efectuar tanto con material de referencia del analito, como con muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de analito que cubran el intervalo del método. Cuando se trata de la valoración de una materia prima se analizarán de 3 a 5 disoluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 80 y 120 % de la concentración teórica. Cuando se trata de la valoración del principio activo en un producto terminado se analizarán entre 5 y 7 disoluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 50 y 150 % de la concentración teórica del principio activo en la muestra. En los dos casos el análisis se realizará como mínimo por triplicado

b) Se evaluarán los datos estadísticamente a fin de verificar la linealidad y proporcionalidad según se describe a continuación:

- Significación de la regresión: Se determinará el coeficiente de correlación (debe ser ≥ 0.990) y el de determinación (valores superiores a 0.98).
- Verificación de linealidad: Se efectuará por determinación del CV de los factores de respuesta (cociente respuesta / concentración), el cual no será superior al 5%. También se evaluará la varianza de la pendiente de la línea de regresión.
- Verificación de proporcionalidad: Los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para el grado de probabilidad definido.
- Prueba de falta de ajuste: Se implementará para demostrar que los valores se ajustan a una línea recta.

2.7.2. Precisión [ICH., 2005; Reg. 41CECMED, 2007]

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 determinación de la precisión se realizará a 3 niveles, siempre que proceda: intraensayo (repetibilidad), interensayo (precisión intermedia) e interlaboratorios



(reproducibilidad). Las muestras a incluir en este estudio serán lotes de producción (muestras reales).

a) Evaluación de la repetibilidad: (1) se utilizarán 2 o más concentraciones de una muestra homogénea, las cuales serán analizadas 6 veces como mínimo en una misma corrida, (2) se prepararan muestras de 3 concentraciones diferentes, una inferior, media y superior del intervalo especificado y realizar 3 replicas de cada una o (3) realizar un mínimo de 6 determinaciones a la concentración del 100 %.

b) Evaluación de la precisión intermedia: Se implementará un diseño donde se evaluarán 3 concentraciones de una muestra (como mínimo) en duplicado, por al menos 2 analistas en 3 días diferentes. Se recomienda, siempre que sea posible, que cada analista emplee instrumentos y materiales diferentes.

c) Evaluación de la reproducibilidad: Se implementará en forma de estudio interlaboratorio. Se evaluarán de 3 a 5 muestras (en un esquema de 2 a 4 concentraciones por muestra) por duplicado, involucrando diferentes analistas, reactivos e instrumentos en cada laboratorio. Las muestras se analizarán en 6 ensayos independientes como mínimo.

2.7.3. Especificidad ^[ICH., 2005; Reg. 41CECMED, 2007]

La especificidad 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.



La evaluación de la especificidad, en función de las características de los métodos de ensayo, deberá estar dirigida a los siguientes aspectos:

- a) Identidad: Se demostrará que el método es capaz de identificar el principio activo en presencia de otras sustancias.
- b) Pureza: Se demostrará que el método permite una evaluación cualitativa o cuantitativa de las impurezas específicas.
- c) Determinación cuantitativa de un componente (o para ensayos de actividad): Se asegurará que la señal medida por el método analítico corresponde exclusivamente al analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

2.7.4. Exactitud [ICH., 2005; Reg. 41CECMED, 2007].

La determinación de la exactitud deberá realizarse por estudios de adición y recuperación de cantidades conocidas de muestras de referencia o patrones a excipientes a fin de comparar el valor medido experimentalmente (observado) con el valor real (esperado).

La determinación de este parámetro podrá realizarse por algunos de los siguientes métodos:

- a) Análisis repetido de una muestra de concentración conocida: Se realizará por adición de una concentración conocida de un analito o patrón a un placebo. Deberán implementarse entre 6 y 10 ensayos y se calculará el porcentaje de recuperación. Se implementarán pruebas de significación apropiadas.
- b) Análisis repetidos de muestras de concentraciones conocidas diferentes: Se seguirá un diseño similar al anterior. Se utilizarán 3 concentraciones como mínimo (intervalo alto, medio y bajo) y se realizarán los análisis por triplicado. En este tipo de estudio, se evaluará la influencia del factor concentración.
- c) Método de adición de patrón: Se tomarán alícuotas de una muestra a las que se añaden cantidades conocidas de un patrón, dejando una alícuota como control de muestra. Dichas muestras se analizarán en paralelo por triplicado y se evaluarán contra una curva de calibración preparada con soluciones patrones. Se calculará la recuperación como medida de exactitud y su significación por pruebas estadísticas apropiadas.



d) Comparación con otro método validado: Podrá implementarse a concentración única o en un intervalo de 2 a 4 concentraciones diferentes. En cualquier caso se analizarán las muestras 6 veces como mínimo. Se implementarán pruebas de significación apropiadas.

Para que la evaluación de la exactitud se considere satisfactoria, no existirán diferencias significativas entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores verdaderos.

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.

2.7.5. Límite de detección y de cuantificación [ICH., 2005 Reg. 41CECMED, 2007.]

Límite de cuantificación: Cantidad más baja de analito que puede medirse cuantitativamente en una muestra con exactitud y precisión aceptables.

Límite de detección: Cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, como una concentración o cantidad exacta.

La evaluación de ambos parámetros puede efectuarse y responder a los siguientes diseños, entre otros:

a) Relación señal ruido: Se comparará la respuesta del blanco (matriz sin analito) con las muestras que contienen pequeñas cantidades de analito adicionadas al blanco. Deberá obtenerse el nivel medio de ruido del blanco y se multiplicará por 2 ó 3 para el límite de detección o por 6 ó 10 para el de cuantificación. Posteriormente se compararán estos valores con las respuestas de las series blanco + analito y se hallará la concentración de analito que corresponda al valor de la señal.

b) Estudio de la menor cantidad detectable: Muy recomendado para cromatografía de capa delgada en la detección de impurezas y/o productos de degradación en ingredientes farmacéuticos activos (IFA). Se determinará la carga máxima de IFA que se separa correctamente en las condiciones cromatográficas establecidas, y posteriormente se prepararán diluciones constantes de este IFA (a una concentración ya



evaluada) más cantidades decrecientes del analito a estudiar. El límite de detección se calculará a partir de la dilución en que no sea posible distinguir entre la respuesta del analito y la del blanco. El resultado se expresará en valor absoluto o en porcentaje (con respecto a la carga máxima).

c) Por estimación: El límite de detección y el de cuantificación podrán extrapolarse del valor de la ordenada en el origen (en unidades de concentración), de la recta del ensayo de linealidad o por análisis repetido del blanco de la muestra. En todos los casos se aplicarán cálculos matemáticos para estimar ambos límites y estos serán verificados mediante el análisis de muestras que contengan el analito en concentraciones iguales o aproximadas a los límites estimados.

Tanto el límite de detección como el de cuantificación son valores numéricos. No se aceptarán como especificaciones índices cualitativos como “no presencia o ausencia del analito” o la expresión “no contiene”.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipamiento

- Balanza analítica Sartorius CP 225 D, d = 0,01 mg (80 g) 0,1 mg (220 g).
- Estufa HS62A regulada a 70 °C.
- 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.
- Espectrofotómetro UV-VIS Single Beam Scanning UV/Visible Camspec, M501.

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).
- Fase estacionaria C-8 (endcaped). Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,035 mm, Fluka.
- Silicagel. Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,04 mm, Merck.
- Acetonitrilo para HPLC.
- Agua destilada y desionizada.
- Benzoato de bencilo p.a., Merck.
- Etanol clase A
- n-hexano para cromatografía, Merck.
- Ninhidrina p.a., Merck.



3.3. Materiales

- Jeringuillas plásticas de 5,0 mL.
- Viales plásticos tipo eppendorf con tapa, de 1,5 mL.
- Matraces aforados de 10 mL con tapa de vidrio.
- Microjeringuillas Hamilton de 10 μ L.
- Tubos de ensayos vidrio de 3, 5 mL, con tapa de teflón.
- Material de uso habitual en el laboratorio.

3.4. Evaluación de las variables experimentales que influyen en la extracción en fase sólida

Se utilizaron cartuchos de extracción confeccionados en el laboratorio en jeringuillas plásticas de 5 mL de capacidad, con una masa de 500 mg de la fase sólida.

Las disoluciones de trabajo utilizadas en los diferentes ensayos se prepararon a partir de una disolución inicial de G-1 en acetonitrilo: agua (80:20 V/V) de concentración 1000 mg/L.

3.4.1. Selección del adsorbente (fase sólida)

Teniendo en cuenta las características de polaridad (media-baja) de la molécula de G-1, se ensayó la utilización de dos adsorbentes de uso común como son la silicagel y la fase enlazada C-8.

Para comparar la capacidad de retención de G-1 de ambas fases, se procesaron en paralelo diferentes volúmenes de agua (10, 15 y 20 mL) conteniendo una cantidad constante de G-1 (0,1 mg) que fueron extraídas tanto en fase C-8 como en silicagel. Posteriormente cada cartucho se eluyó con 2 x 4 mL de acetonitrilo y el extracto se llevó a un volumen de 10 mL con acetonitrilo.

Se determinó la concentración de G-1 en cada extracto mediante una técnica espectrofotométrica desarrollada y validada en el Laboratorio de Control de Calidad del CBQ). [PNO. CBQ, 2005]

3.4.2. Volumen de rotura

Con vistas a determinar si bajo las condiciones de trabajo empleadas se alcanza el volumen de rotura del cartucho (límite máximo para el volumen de muestra a extraer), se

procesaron muestras de agua de 10, 15 y 20 mL, conteniendo cada una 100 μg de G-1. Posteriormente cada cartucho se eluyó con 2 x 4 mL de acetonitrilo y el extracto se enrasó en 10 mL con acetonitrilo.

Se determinó la concentración de G-1 en cada extracto mediante una técnica espectrofotométrica desarrollada y validada en el Laboratorio de Control de Calidad del CBQ). [PNO. CBQ, 2005]

3.4.3. 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 la reproducibilidad del proceso de retención.

El acondicionamiento se realizó haciendo pasar por el cartucho, gota a gota, dos volúmenes de 2 mL de acetonitrilo, seguido de dos porciones de 2 mL de agua destilada. En la siguiente figura se muestra el acoplamiento de la jeringuilla de polietileno al extremo superior del cartucho utilizado para el acondicionamiento.

Una vez acondicionado el cartucho se utilizó sin dejarlo secar.

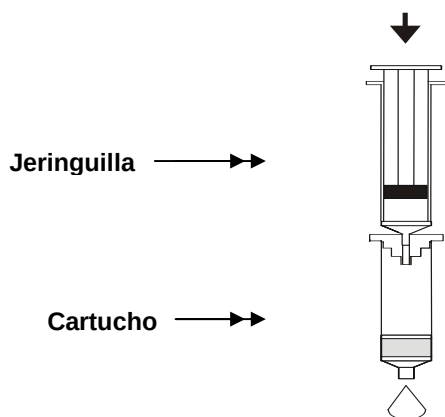


Figura 4. Montaje para el acondicionamiento del cartucho. Acoplamiento de la jeringa a la parte superior del cartucho

3.4.4. Flujo de introducción de la muestra en el cartucho de SPE

La muestra se introdujo en el cartucho a gravedad, acoplado una jeringa con terminal Luer al cartucho de SPE. (Ver figura 4 en 3.4.3)



3.4.5. Propiedades de la muestra

Para la extracción de analitos contenidos en fluidos biológicos como el plasma, la desproteinización es un requerimiento habitual. Para ello se utilizó acetonitrilo, adicionando 1 mL a la muestra de plasma y posterior centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 min.

3.4.6. Lavado del cartucho (eliminación de interferencias)

Como disolvente de lavado se utilizó agua destilada, con probada efectividad [Estevez, D. 2006] para eluir las interferencias polares presentes en la matriz.

Para la determinación del volumen óptimo de lavado, se procesaron dos muestras en paralelo, lavando el cartucho con un volumen de 20 mL de agua destilada y colectando fracciones sucesivas de 1 mL de esta disolución de lavado en viales plásticos con tapa, 1,5 mL.

Posteriormente, a cada fracción colectada se le añadió 0,5 mL de una disolución de ninhidrina al 2 % en etanol y los viales se colocaron en la estufa a 70 °C por espacio de media hora. La aparición de una coloración violeta confirmaría la elución de proteínas plasmáticas en la fracción de lavado. [<http://www.monografias.com/trabajos7/amin/amin2.shtml>], Plummer, D. T.1981 & Crandall, G. D. 1983].

3.4.7. Secado del cartucho previo a la elución

El proceso de secado consistió en pasar una corriente de nitrógeno por el cartucho durante 10 min.

3.4.8. Volumen de elución

Como eluyente se seleccionó el n-hexano que es un disolvente de un poder de elución fuerte (con capacidad para eluir cuantitativamente al G-1 en un pequeño volumen). Además, el n-hexano es un disolvente compatible con el método de detección por captura electrónica que es el utilizado en el método cromatográfico de determinación de G-1.

Para la determinación del volumen de elución óptimo se procesaron dos muestras en paralelo y, una vez secado el cartucho, se procedió a eluir el analito con un volumen total de 8 mL de n-hexano, colectando por separado cada mililitro del extracto.

Las fracciones sucesivas de dicho extracto se sometieron a análisis por el procedimiento



de GC-ECD para determinar el contenido de G-1 en cada fracción.

3.5. Técnica empleada para la determinación de G-1 por GC-ECD [Calvo, A.; 2008]

Condiciones cromatográficas:

- Temperatura del horno: 200 °C.
- Temperatura del inyector: 230 °C.
- Temperatura del detector: 280 °C.
- Volumen de inyección: 1 µL.
- Estándar interno: benzoato de bencilo.
- Gas portador: nitrógeno.
- Columna: fase estacionaria VB-5 (5 % fenil) metilpolisiloxano, 30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno, 1,50 µm de espesor de capa.

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

Los parámetros de validación estudiados fueron: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y los límites de detección y cuantificación.

3.6.1. Linealidad

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1 mg/L y 8 mg/L, con valores intermedios de 0,3; 0,5; 2; 4; 5 y 6 mg/L en n-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: $t_{cal} < t_{tab}$ para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad.
- T-test para la pendiente: $t_{cal} > t_{tab}$ para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad.



- ANOVA para la bondad de ajuste: $F_{cal} < F_{tab}$ (0,05 y n_1, n_2).

3.6.2. Precisión

3.6.2.1. 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.

3.6.2.2. 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 $F_{cal} < F_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y 2,6 grados de libertad, puede concluirse que desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre las varianzas a los diferentes niveles de concentración.

3.6.2.3. Precisión intermedia

Se analizaron tres muestras a la concentración de 2 mg/L en tres días sucesivos, siguiendo todos los pasos descritos en cuanto a extracción y análisis cromatográfico. Se calculó el coeficiente de variación por día y el global. Se compararon las medias y las varianzas entre los grupos (días).

Criterios de evaluación: Si en el ANOVA $F_{cal} < F_{tab}$ para $\alpha=0,05$ 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.

3.6.3. 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 cuanto a extracción y análisis cromatográfico.

3.6.4. Especificidad

Para estudiar la especificidad se compararon cromatogramas de:

- Una disolución de G-1, muestra de referencia



- Muestras de plasma conteniendo G-1
- Blancos preparados con la matriz de las muestras sin adición de G-1
- Muestra de plasma conteniendo G-1, expuesta durante 3 h a la luz natural del laboratorio.

Se observó si aparecía algún pico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al G-1.

3.6.5. 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:

$$\boxed{DL \text{ ó } QL = \frac{\bar{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b}} \quad (2)$$

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.

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

3.7. 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 del procedimiento de determinación de G-1 en plasma humano 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 hicieron adiciones de determinadas cantidades 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 animales de laboratorio a los que se haya administrado formulaciones con G-1 como principio activo.

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 especies 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 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. Los parámetros de validación estudiados en este trabajo fueron la linealidad, precisión, exactitud, especificidad y los límites de detección y cuantificación.

4.2. Evaluación de las variables experimentales que influyen en la extracción en fase sólida

4.2.1. Selección del adsorbente (fase sólida)

Este es un parámetro básico para el desarrollo del método de extracción. Debe escogerse un adsorbente con elevada capacidad de retención, es decir, capaz de retener fuertemente, bajo condiciones óptimas, la máxima cantidad de analito por unidad de masa de adsorbente.

Cuando se extraen analitos a bajas concentraciones, como es el caso de fármacos en fluidos biológicos, la cantidad de analito presente generalmente no excede a la capacidad del adsorbente. Sin embargo, los compuestos interferentes, presentes a altos niveles en la matriz, son los que pueden saturar la capacidad de retención del adsorbente. De ahí la necesidad de someter este tipo de muestras a un proceso de tratamiento (generalmente de desproteinización) previo a la introducción en el cartucho.

La selección del adsorbente en el presente estudio se hizo determinando en paralelo la retención del G-1 en dos tipos de fases: cartuchos de sílicagel (fase normal) y de fase inversa RP C-8.

Como se ha descrito en Materiales y Métodos, se evaluaron tres volúmenes de muestras (10, 15 y 20 mL) lo que cubre (e incluso supera) el intervalo habitual de tamaños de muestra en los estudios de determinación de fármacos en plasma.

El en siguiente gráfico se comparan los resultados de la retención del G-1 en ambas fases.

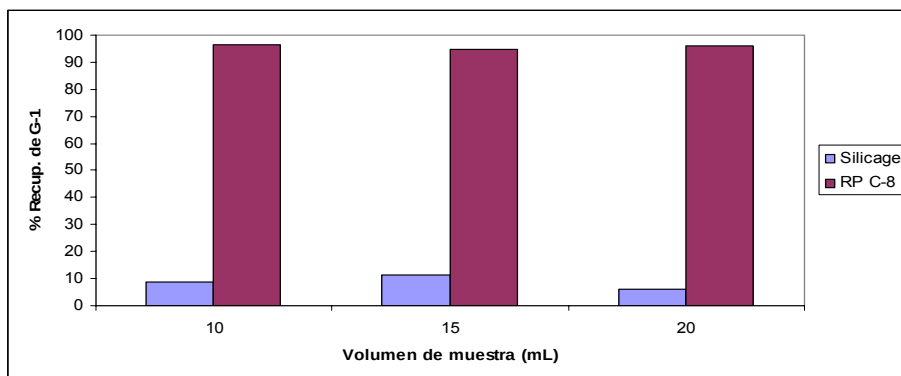


Figura 5. Comparación de la capacidad de retención de G-1 de las fases Silicagel y RP C-8.



La escasa retención del G-1 en la sílicagel está condicionada por la baja polaridad del analito (que limita las posibilidades de establecer interacciones polares fuertes con la sílica) y también, por la naturaleza acuosa de la muestra. Es conocido que la retención de analitos por interacciones polares de sus grupos funcionales (por ejemplo, grupo nitró del G-1) con los sitios activos de la sílica se favorece en matrices no polares.

Sin embargo, como se aprecia en la figura, la fase inversa exhibe una elevada capacidad de retención de G-1. En la interacción entre el analito y el material de fase inversa intervienen tanto las fuerzas de van der Waals o de dispersión, como las interacciones secundarias con el sustrato de sílice (con grupos silanoles no enlazados de la superficie).

En lo adelante, en base a estos resultados, la evaluación del resto de las variables experimentales que intervienen en la SPE se hizo utilizando cartuchos de fase inversa RP C-8 conteniendo 500 mg del material adsorbente.

4.2.2. Volumen de rotura

Este es un parámetro práctico muy importante pues constituye el volumen de muestra a partir del cual, el analito comienza a ser eluido del cartucho por efecto del propio paso de la muestra, es decir, cuando se ha excedido la capacidad de retención del mismo. Este parámetro limita el volumen máximo de muestra que puede ser usado en la SPE y, por tanto, el factor de preconcentración que puede ser obtenido.

Sin embargo, los volúmenes de muestra habituales en las determinaciones de fármacos en plasma son relativamente pequeños, por lo que difícilmente se alcance el volumen de rotura del cartucho.

En el presente estudio se hizo un diseño experimental similar al seguido en 4.2.1 pero trabajando únicamente con cartuchos de fase inversa RP C-8, conteniendo 500 mg de adsorbente. El procedimiento consistió en preconcentrar muestras de volumen creciente (10, 15 y 20 mL), conteniendo todas las mismas masas de analito. De esta manera, la cantidad de analito concentrado debe ser constante hasta que se alcance el volumen de rotura, a partir del cual empieza a disminuir.

Según los resultados obtenidos (ver figura 5 en 4.2.1), bajo las condiciones del estudio no se alcanza el volumen de rotura del cartucho fase inversa RP C-8: la cantidad de G-1



concentrado permanece constante para los diferentes volúmenes de muestra. De este resultado se deriva que es posible concentrar en este tipo de cartucho hasta 20 mL de muestra (un volumen raramente alcanzado en estos estudios) sin que ocurra la “rotura” del mismo.

4.2.3. Acondicionamiento del cartucho

El acondicionamiento del material adsorbente consiste en tratar previamente la fase con un disolvente adecuado, pasando varias veces (2-3 veces) el volumen de fase. Este acondicionamiento persigue el objetivo de incrementar la reproducibilidad de la retención de los analitos, así como del flujo del paso de la muestra a través del cartucho. Además, el acondicionamiento minimiza la posibilidad de contaminación de los extractos con impurezas de los adsorbentes.

Para el acondicionamiento del adsorbente utilizado en este estudio (cartucho RP-C8 con volumen muerto de 1 mL) se hicieron pasar sucesivamente dos volúmenes de 2 mL de acetonitrilo que es uno de los disolventes más adecuados para la solvatación de los materiales de fase inversa. [Cela, R. 2002]

Una vez solvatada la fase adsorbente, el exceso de disolvente es desplazado, previo a la extracción, por el disolvente utilizado para preparar la fase para recibir la muestra, que en este caso fue agua destilada (dos volúmenes de 2 mL). El agua destilada se escogió considerando la naturaleza acuosa de la muestra de plasma.

4.2.4. Flujo de introducción de la muestra en el cartucho de SPE

Este es un parámetro importante debido a la variabilidad potencial en el empaquetamiento de los cartuchos (posibilidad de existencia de “canales” en la columna de material adsorbente). Este parámetro también debe ser optimizado cuando el volumen de muestra excede el volumen de rotura del cartucho.

Sin embargo, ante la limitación instrumental para trabajar a flujos programados y considerando los pequeños volúmenes de muestra que normalmente se utilizan en las determinaciones de fármacos en plasma, la muestra se introdujo en el cartucho a gravedad (flujo de aproximadamente 0,03 mL/minuto), acoplando una jeringa con terminal Luer al cartucho de SPE.



4.2.5. Propiedades de la muestra

En muchas ocasiones, las características particulares de las muestras condicionan el comportamiento de determinadas variables experimentales en la SPE.

En el caso de los fluidos biológicos, la desproteinización suele ser un requisito para conseguir valores aceptables en la recuperación de analitos de bajo peso molecular, extraídos en cartuchos de fase inversa. Esto se debe a que los componentes de la matriz, muchos de ellos presentes a concentraciones relativamente altas (como las proteínas plasmáticas) pueden llegar a saturar la capacidad de retención de la fase sólida, entorpeciendo la retención de los analitos.

Para este estudio, previo a la extracción, las muestras fueron sometidas a desproteinización con acetonitrilo (1 mL) y posterior centrifugación a 3000 rpm durante 10 min.

4.2.6. Lavado del cartucho

Al igual que los extractos de plantas y otras muestras de similar complejidad, los fluidos biológicos frecuentemente necesitan de un paso de lavado del cartucho a fin de eliminar interferencias endógenas. Para ello se utilizan pequeños volúmenes de disolventes de poder de elución medio para eluir a los componentes de la matriz mientras los analitos permanecen retenidos.

En estudio anteriores ^[Estevez, D. 2006] se habían ensayado diferentes disolventes de lavado para cartuchos de Dispersión en Matriz Sólida (MSPD), obteniéndose los mejores resultados con agua destilada.

Para confirmar este precedente y considerando que en SPE, como criterio teórico, se acepta que se ha escogido un disolvente de lavado adecuado cuando los analitos retenidos no eluyen con el paso de un volumen igual a 20 veces el volumen muerto del cartucho, se procedió de la siguiente forma:

1. Se calculó la recuperación del G-1 desde cartuchos RP-C8 conteniendo 500 mg de fase adsorbente que fueron sometidos a lavado con un volumen total de 20 mL de agua destilada. El procesamiento simultáneo de dos muestras dio como resultado



una recuperación media de G-1 de 98,75 %, lo que confirma que el lavado con agua destilada no provoca la elución del analito.

2. Para la determinación del volumen óptimo de lavado, se colectaron fracciones sucesivas de 1 mL de las aguas de lavado en viales plásticos con tapa, de 1,5 mL de capacidad. Estas fracciones fueron sometidas al ensayo de ninhidrina para determinar la efectividad y el volumen necesario para eluir componentes de la matriz como proteínas (aminoácidos, péptidos). Como resultado se obtuvo que la reacción fue positiva para las dos primeras fracciones, evidenciando presencia de dichos compuestos, por lo que en el diseño global del proceso de extracción se recomienda desarrollar el lavado con dos fracciones de 2 mL de agua destilada.

4.2.7. Secado del cartucho previo a la elución

En SPE, tiempos de secado (normalmente con corriente de nitrógeno) de entre uno y cinco minutos son suficientes, en la mayoría de los casos, para eliminar todo el disolvente de la muestra que quede atrapado en los poros de la fase sólida. Un secado excesivo puede conducir a bajas recuperaciones, por evaporación de los analito o por retención en regiones poco solvatadas del adsorbente.

Para el caso objeto de estudio, la extracción de muestras de naturaleza acuosa como el plasma humano, el secado previo a la elución de los analitos es un requisito indispensable por cuanto la determinación analítica se efectuó por un procedimiento de cromatografía de gases con detector de captura electrónica, el cual es incompatible con la presencia en la muestra de especies con afinidad electrónica como el agua.

Por otra parte, y debido a la misma razón, la elución del cartucho se hace con disolventes carentes de heteroátomos (como el n-hexano), que son inmiscibles con el agua, lo que también justifica la necesidad del secado con vistas a evitar la formación de emulsiones o sistemas de dos fases.

Como se ha descrito en Materiales y Métodos, previo a la elución, los cartuchos fueron sometidos a secado por 10 minutos en corriente de nitrógeno.

4.2.8. Volumen de elución

Con vistas a conseguir un factor de preconcentración máximo debe utilizarse como eluyente un disolvente con gran poder de elución que desplace cuantitativamente al analito desde el adsorbente, en un pequeño volumen.

Normalmente debe tratarse de un disolvente volátil y compatible con el sistema de determinación analítica, lo cual, en el presente estudio cobra una importancia vital por cuanto aquí se utiliza un sistema de GC con detector de captura electrónica, con excelente sensibilidad para el G-1 pero que limita las opciones en cuanto al disolvente del extracto. En estudios previos se había ensayado el n-hexano para eluir cartuchos de Dispersión en Matriz Sólida (MSPD) [Velázquez, M. 2007] por lo que constituyó la primera elección debido a la similitud de este método con la SPE.

Ahora, con el objetivo de establecer el valor del volumen de elución, se procedió a determinar el contenido de G-1 en fracciones sucesivas de 1 mL del extracto obtenido al eluir los cartuchos con n-hexano. El análisis de las fracciones se hizo por el procedimiento de GC-ECD.

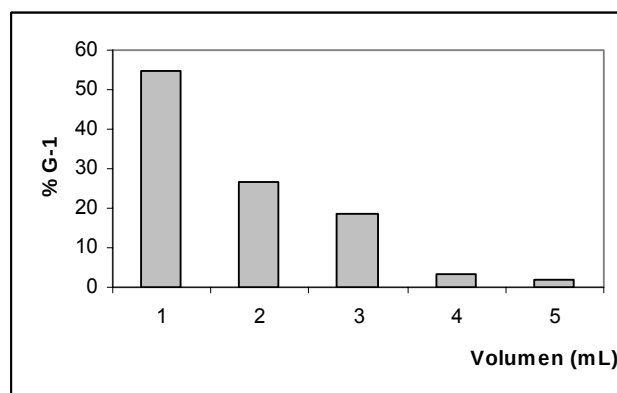


Figura 6. Determinación del volumen de elución de G-1, aplicando SPE con RP C-8 como adsorbente y elución con n-hexano.

Como se observa en la figura 6, con los 4 primeros mL de n-hexano se logra eluir aproximadamente el 99 % del G-1 retenido en el cartucho. A partir de la fracción 5, la magnitud de la señal correspondiente al G-1 en los cromatogramas está en los alrededores del mínimo valor cuantificable, por lo que se concluye que 4 mL de n-



hexano son suficientes para conseguir una elución cuantitativa. De esta manera, en lo adelante la elución de los cartuchos se hizo con dos porciones de 2 mL de n-hexano.

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

4.3.1. Linealidad

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración de G-1 en el intervalo de 0,555 a 8,88 mg/L, así como los parámetros para evaluar la calidad de la regresión, según lo normado en metodología ICH ^[ICH,2005], se muestran en las tablas 1 y 2, así como en la figura 7.

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

	Concentración (mg/L)	Rp1	Rp2
Estándar 1	0,555	0,2166	0,2297
Estándar 2	2,22	0,8210	0,8148
Estándar 3	4,44	1,5920	1,5565
Estándar 4	5,55	1,8904	1,9316
Estándar 5	6,66	2,3092	2,2956
Estándar 6	8,88	2,9907	3,0118

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

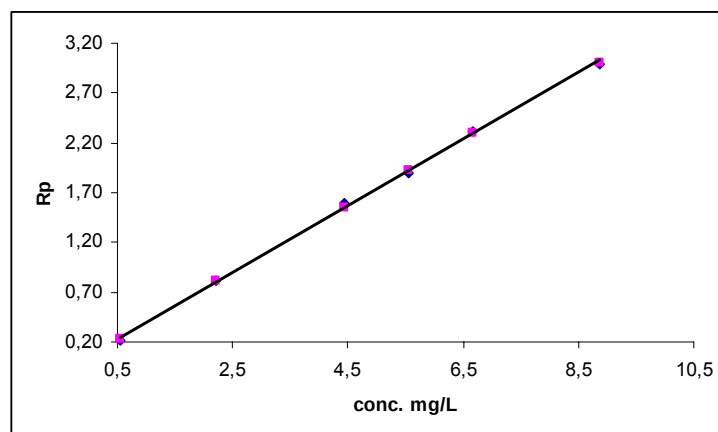


Figura 7. Curva de calibración para G-1 por GC-ECD.

Tabla 2. Parámetros estadísticos de la recta de regresión de G-1 por GC-ECD.

Parámetros	Resultados
Ecuación de la recta $y = a \cdot x + b$	$Y = 0,3341 X + 0,0637$
Coefficiente de correlación, $r \geq 0,999$	$r = 0,9996$
t-test para el intercepto: $t_{cal} < t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{cal}: 4,277$ $t_{tab} (0,05 ; 10): 2,571$
t-test para la pendiente: $t_{cal} > t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{cal}: 118,88$ $t_{tab} (0,05 ; 10): 2,571$
ANOVA para la bondad de ajuste: $F_{cal} < F_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y n1, n-2 grados de libertad	$F_{cal}: 4,14$ $F_{tab} (0,05; 6,4): 4,53$

Finalmente, como se aprecia en la figura 8, 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.

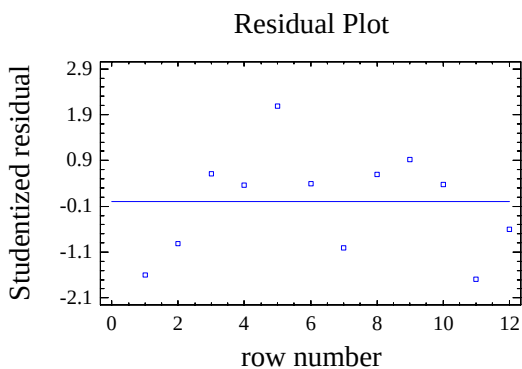


Figura 8. Distribución de los residuales en la regresión.

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.

4.3.2. Precisión

4.3.2.1. 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 μ L).

Tabla 3. Resultados de la repetibilidad instrumental.

Inyección	Respuesta (Rp)	Variabilidad
Inyección 1	0,8396	
Inyección 2	0,8642	Media: 0,85575
Inyección 3	0,8395	Desv, Estándar: 0,018392
Inyección 4	0,8880	Coef, de variación: 2,15 %
Inyección 5	0,8484	
Inyección 6	0,8548	

**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.

4.3.2.2. 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 4 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 4. 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	1,03 mg/L	1,92 mg/L	5,79 mg/L
Resultado Réplica 2	0,96 mg/L	1,83 mg/L	5,85 mg/L
Resultado Réplica 3	0,97 mg/L	1,94 mg/L	5,77 mg/L
Media	0,99 mg/L	1,90 mg/L	5,80 mg/L
Desv, Estándar	0,04	0,198	0,04
Coef, de variación	4,04 %	3,15 %	0,7 %

Según los resultados del ANOVA, los grupos (niveles de concentración) difieren significativamente en cuanto a la media, lo cual es obvio por cuanto cada uno corresponde a una concentración diferente. Sin embargo, la variabilidad alrededor de la media es similar en cada grupo (ver test de Cochran, Bartlett y Harttley), lo que confirma (ver anexo 4) que el método es preciso a lo largo del intervalo de concentraciones estudiado. Esto también concuerda con los valores de desviación estándar relativa que en cada grupo es inferior al 4%, muy por debajo de los límites admisibles para ensayos bioanalíticos ($CV \leq 15\%$). ^[FDA, 2001]

4.3.2.3. 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 5 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 5. Resultados del estudio de la precisión intermedia.

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3
Muestra 1	1,88 mg/L	1,92 mg/L	1,8 mg/L
Muestra 2	1,92 mg/L	1,83 mg/L	1,73 mg/L
Muestra 3	1,78 mg/L	1,94 mg/L	1,79 mg/L
Media	1,86 mg/L	1,90 mg/L	1,77 mg/L
Desv, estándar	0,07	0,06	0,04
CV "por día"	3,76 %	3,16 %	2,26 %
CV "global"	4,03 %		

Según los resultados del análisis de varianza, las concentraciones medias determinadas a los diferentes días no son significativamente diferentes entre sí, ya que la significación de la F de Fischer es mayor que 0,05. (Ver anexo 5)

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]

4.3.3. Exactitud

El análisis por triplicado de una muestra de plasma humano, a la que se adicionó G-1 muestra de referencia a una concentración de 2 mg/L, arrojó un porcentaje de recuperación medio de 94,5 %.

4.3.4. Especificidad

Para la evaluación de la especificidad del procedimiento analítico se estudió la posible influencia del eluyente, el material adsorbente, los componentes de la matriz así como de la potencial degradación del G-1 por influencia del medio acuoso que constituye el plasma.

A continuación se exponen los cromatogramas registrados para el n-hexano utilizado en la elución de los cartuchos de SPE (figura 9) y el correspondiente a la disolución resultante del lavado de un cartucho RP C-8, con el mismo disolvente (figura 10).



Figura 9. Cromatograma correspondiente a la inyección de n-hexano puro.

Como puede apreciarse, ni el disolvente ni el material adsorbente contienen impurezas capaces de originar señales potencialmente interferentes durante el análisis del extracto que se obtiene en el procesamiento de las muestras de plasma conteniendo G-1.

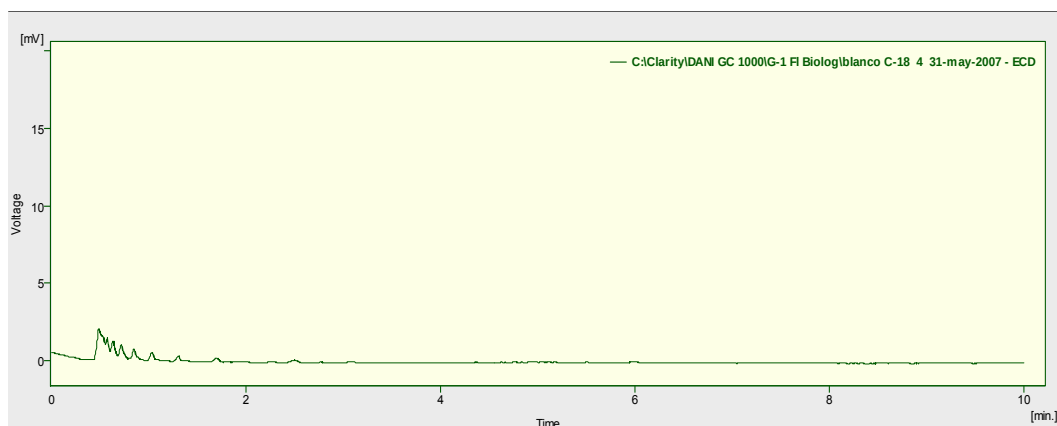


Figura 10. Cromatograma correspondiente a la inyección de la disolución de lavado de un cartucho RP C-8 con n-hexano.

La figura 11 contiene el cromatograma correspondiente a un blanco (plasma sin adición de G-1) sometido al proceso de extracción en fase sólida y analizado según el procedimiento de GC-ECD descrito en este trabajo.

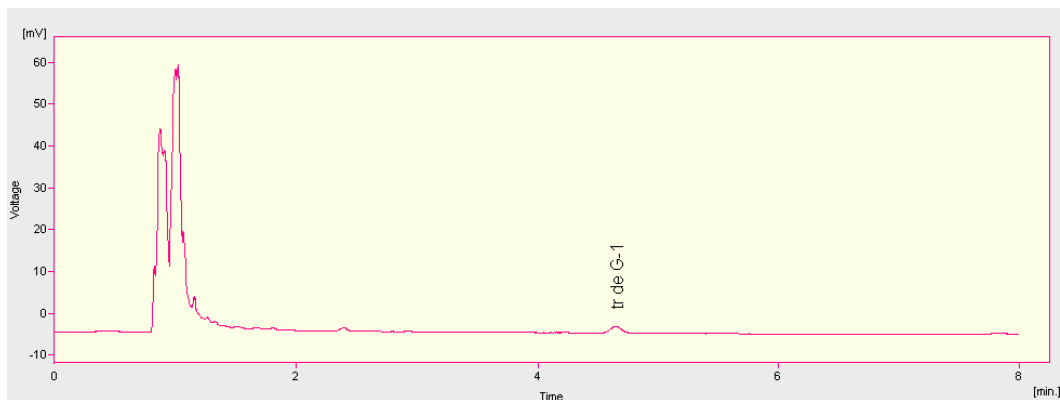


Figura 11. Cromatograma de un blanco preparado con todos los componentes de la muestra, excepto el analito (G-1).

En el intervalo alrededor del tiempo de retención del G-1 (aproximadamente 4,7 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 del 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 los $\mu\text{g/L}$.

En la figura 12 se exhibe el cromatograma de una muestra de plasma conteniendo G-1 que se expuso por un tiempo de 3 horas a la luz natural. Se conoce que este factor puede acelerar la degradación de disoluciones acuosas de G-1. [Molina, R. & Rosado, A., 1994]

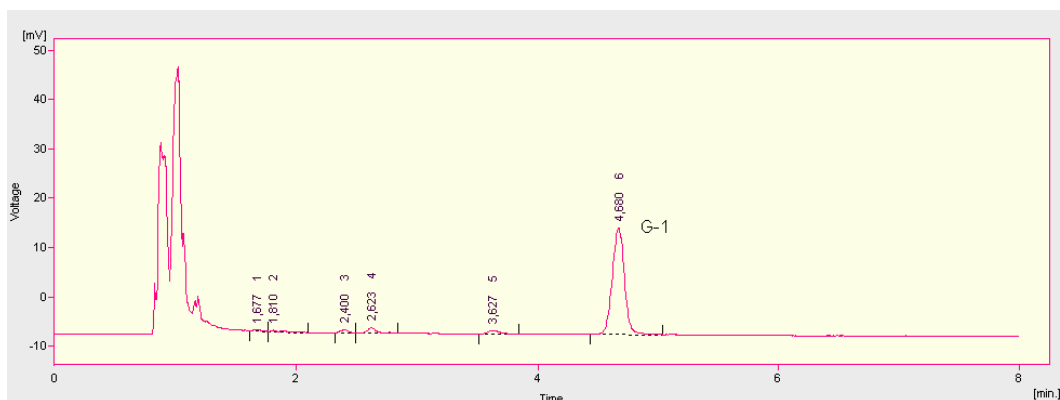


Figura 12. Cromatograma de una muestra de plasma conteniendo G-1, expuesta durante 3 h a luz natural.



Como se aprecia en el cromatograma, el pico del G-1 mantiene su simetría y no aparecen otras señales en las proximidades del mismo.

Del conjunto de resultados anteriores puede concluirse que el método de cromatografía de gases utilizado en la determinación del G-1 en muestras de plasma es específico bajo las condiciones descritas.

4.3.5. Determinación del límite de detección y cuantificación

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

$$\text{Límite de detección: } DL = \frac{\bar{X} + 3S}{b} \quad 0,0067 \text{ mg/L}$$

$$\text{Límite de cuantificación: } QL = \frac{\bar{X} + 10S}{b} \quad 0,017 \text{ mg/L}$$

A la significativa sensibilidad que se consigue con este procedimiento combinado de SPE y GC-ECD contribuye tanto etapa de extracción como el sistema de detección empleado en el análisis cromatográfico, que es el ideal para analitos que contienen grupos electroatrayentes (ver estructura del G-1, figura 1, página 3).



5. CONCLUSIONES

1. Se establecieron las condiciones de trabajo para la extracción en fase sólida de G-1 a partir de muestras plasma humano a través del estudio de las variables experimentales que influyen en el proceso
2. El procedimiento para la extracción de G-1 en muestras de plasma humano mediante extracción en fase sólida y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones de 0,1 mg/L a 8 mg/L, preciso, exacto, específico y sensible (DL = 0,0067 mg/L y QL = 0,017 mg/L).



6. RECOMENDACIONES

1. Aplicar el procedimiento de extracción en fase sólida y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica 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 este procedimiento 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. Abraham, A.; Luurtsema, G.; Bauer, M.; Karch, R.; Lubberink, M.; Patariaia, E. et al. Peripheral metabolism of (R)-[11C] verapamilin epilepsy patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:116–123; 2008.
2. Aneesley, T. y Clayton, L. Quantification of Mycophenolic Acid and Glucuronide Metabolite in Human Serum by HPLC-Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2005; 51(5):872-877.
3. Boldeau, J.M., González, O. & Medina, R. In vitro evaluation of G-1: A novel antimicrobial compound. Technical Report. Saskatoon. Department of Clinical Microbiology, St. Paul's Hospital. 1997.
4. Boos, K.; Fleischer, C. Multidimensional on-line solid phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius J Anal Chem*. (2001) 371:16–20.
5. Bulletin 910. Guide to solid phase extraction. Supelco 1998.
6. Burke, A.; Lawson, J.; Meagher, E.; Rokach, J. y Fitzgerald. Specific Analysis in Plasma and Urine of 2,3-Dinor-5,6-dihydro-isoprostane F2a-III, a Metabolite of Isoprostane F2a-III and an Oxidation Product of γ -Linolenic Acid*. *The journal of biological chemistry*. 2000; 275(4):2499-2504.
7. Calpena Campnany, A.C. Validación de los métodos analíticos. Barcelona, Universidad de Barcelona. 1990.
8. Calvo A. Procedimientos analíticos para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano [Tesis de Maestría.]. Villa Clara: Universidad Central de Las Villas; 2007-2008.
9. Carballo, N. & Col. Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de las células germinativas del ratón C57BL/6J. informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). 1997 I.
10. Carballo, N. & Col. Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de médula ósea en rata C57BL/6J. Informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). 1997 II.



11. Carballo, N. & Col. 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).1997 III.
12. Carballo, N. & Col. 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).1997 IV.
13. . Castillo, A.; Rojas, J.; Monteros, R.; Nardelli, J.; Guasch, G. 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 el 14 de marzo del 2008].
14. Castro Cels, M., Gastón Fora, S., Pujol Forn, M., Sans Roca, J.M. & Vicente Pla, L. Validación de métodos analíticos. Monografía A.E.F.I.1989.
15. CECMED. Validación de métodos analíticos. Regulación 41-2007.
16. Cela, R., Lorenzo, R. & Casais, M. Técnicas de Separación en Química Analítica., España, Síntesis Santiago de Compostela.2002.
17. Charles, F.; Krautter, G.; Dixon, M. y Mariner, D. A comparison of nicotine dose estimates in smokers between filter analysis, salivary cotinine, and urinary excretion of nicotine metabolites. *Psychopharmacology* .2006; 189:345–354.
18. Colin, F., Ajith, D. & Revathy, S. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatography A*, 2002; 885: 17-39.
19. Cortés, R., Pérez, J.A, & Reinir, T. Some Toxicological issues of ophthalmic ointment Queratofural.1997; 20: 292-293.
20. Cortés, R. Algunos aspectos toxicológicos del G-1. Centro de Bioactivos Químicos. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.1997.
21. Crandall, G.D. Biochemistry Laboratory, Selected Exercises. Ed.Oxford University Press 1983.
22. Dams, R.; Huestis, M.; Lambert, W.; y Murphy, C. Matrix effect in bio analysis of illicit drugs with LC-MS/MS influence of ionization type sample preparation and biofluid. *Chemistry and drug metabolism*.2003; 14:1290-1294.



23. 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
24. Di Marco, A.; D'Antoni, M.; Attacalite, S.; Caratenuro, P. y Laufer, R. Determination of drug glucuronidation and udp-glucuronosyltransferase selectivity using a 96-well radiometric assay. *Drug metabolism and disposition*. 2005; 33(6): 812-819.
25. Dorani, H.; Marie, K.; Sarich, T.; Wall, U.; Logren, U.; Ohlsson, L. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran co-administered with different classes of antibiotics in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 63:571–581; 2007.
26. Dufresne, CH.; Favetta, P.; Paradis, CH. Y Boulieu, R. Comparative Study of Liquid-Liquid Extraction and Solid-Phase Extraction Methods for the Separation of Sufentanil from Plasma before Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis. *Clinical Chemistry*. 2001; 47(3):600-602.
27. Estevez, D. Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz sólida y cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de G-1 en plasma humano. [Tesis de Diploma]. Villa Clara: Universidad Central de Las Villas. 2006.
28. Estrada, E. Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mut. Res*. 1998; 420:67 -75.
29. Estrada, E., Rodríguez, J., González, O., Silveira, E., Castañedo, N. 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 II. Renovación 2001.
30. Fernández, A. Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. , La Habana, Editorial Pueblo y Educación. 1996.
31. Gallardo, C. Ensayos cromatográficos para la determinación de glibenclamida en plasma humano. [Trabajo de Diploma]. Santiago de Chile: Departamento de Ciencias y tecnología Farmacéutica. Universidad de Chile. 2006.
32. González, O., Ramírez, T., Silveira, E., Herrada, N. & Machado, R. 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 I. Renovación 2001.
33. González, O., Ramírez, T., Silveira, E.A., Medina, R., Delgado, M.S., Castañedo, N.R. 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 II. Renovación 2001.
34. González, O., Silveira, E., Castañedo, N., Magariño. y Gómez, R. 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 III. Renovación 2001.
35. González, O., Silveira, E. A., Reyes, T., Hidalgo, P. y Chirino-Trejo, J. 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 IV. Renovación 2001.
36. González PE, Bonet RL, Suardíaz PJ, Meleán CJ, Valdés SR. Determinación de ciclosporina A en sangre total mediante la cromatografía líquida de alta resolución con extracción en fase sólida. *Bioquímica*. 1997; 22(2): 689-692.[on line] Disponible en URL: <http://www.imbiomed.com.mx/Bioquim/Bqv22n2/espanol/Wbq72-05.html>. [Citado el 20 de abril del 2008].
37. Haschke, M.; Zhang, Y.; Kahle, C.; Klawintter, J.; Korecka, M.; Shaw, L. et al. HPLC–Atmospheric Pressure Chemical Ionization MS/MS for Quantification of 15-F2t-Isoprostane in Human Urine and Plasma. *Clinical Chemistry*. 2007; 53(3):489-497.
38. <http://www.chemendia.com/cgi-bin/search/search.cgi?keywords=cromatografía+de+gases>. [Citado el 20 de marzo del 2008].
39. <http://www.ferber.hpg.ig.com.br/downloads/Apostila%20%volume%202.doc>. [Citado el 3 de marzo del 2008].
40. <http://www.monografias.com/trabajos7/amin/amin2.shtml>. [Citado 23 de marzo del 2008].



41. <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/mrni/Doc333/Nom-040.doc>.
[Citado el 23 de marzo del 2008].
42. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability. Part VIII. Federal Register. FDA. USA. 1995; 60(40):11260.
43. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology. 2005.
44. Isoherranen N.; y Soback, S. Determination of Gentamicins C1, C1a, and C2 in Plasma and Urine by HPLC. Clinical Chemistry.2000; 46(6):837-849.
45. Jorge, E., Jiménez, I., Bravo, L., 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.
46. 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.
47. Kim, J.; Barnes, A.; Oyler, J.; Schepers, R.; Joseph, R.; JR. et al. Plasma and Oral Fluid Pharmacokinetics and Pharmacodynamics after Oral Codeine Administration. Clinical Chemistry.2002; 48(9):1486-1496.
48. Lagertedt, S.; O'Kane, D.; y Singh, R. Measurement of Plasma Free Metanephrine and Normetanephrine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Diagnosis of Pheochromocytoma. Clinical Chemistry.2004; 50(3):603-611.
49. Landry, F. (1990). Estudio de estabilidad preliminar del G-1, compuesto furánico. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.
50. Li, X.; Wang, G.; Sun, J.; Zheng, Y.; Yan, B.; Xie, H. et al. LC–MS Determination and Pharmacokinetic Study of a Novel Sulfonylurea: Potential Hypoglycemic Agent in Rat Plasma. Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics2006; 210(24):13-18.
51. Manual de procedimientos para la ejecución de bioensayos de toxicidad en el agua. Capítulo 9 – Técnicas.9.2.Concentración mediante extracción en fase sólida.[on line]



- Disponible en URL: <http://www.idrc.ca/lacro/bioensayos/solida.html>. [Citado el 15 de abril del 2008].
52. Maurer, H. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 381:110-118.
 53. Molina, R. & Rosado, A. Estudio de los productos de degradación del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano en medio acuoso. *CBQ, UCLV.* 1994.
 54. Ortega, L.; López, R.; Ferreira, V. y Cacho J. Optimización de las condiciones de extracción en fase sólida mediante un modelo de cromatografía frontal basado en constantes de distribución liquido-sólido. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza 50.009 Zaragoza. [on line] Disponible en URL: http://www.eurojai.com/jai99/resumenes/css/resumenes_421.htm. [Citado el 10 de abril del 2008].
 55. Pant K. 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. Technical Report of G-1. Rockville. Maryland, Sitek Research Laboratory. 1996.
 56. Patrick, J.; Kosoglou, T.; Stauber, K.; Alton, K.; Maxwell, S.; Zhu, Y., et al. Disposition of the selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in healthy male subjects. *Drug Metabolism and disposition.* 2002; 30(4):430-437.
 57. Pereda, D.; Nuñez, L.; Pérez N.; Izquierdo, J.; Determinación de pentoxifilina en plasma humano por cromatografía Líquida de alta resolución con extracción en fase sólida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2006; 36(004):14-19.
 58. Pérez Martínez, C. Espectroscopía C. Pérez Martínez, P.J. Ortiz del foro, E. Alonso Becerra. La Habana, 1985; 294-295.
 59. Pérez, G., Saíenz, O. & González, J. 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. 1996.
 60. Persson, E.; Lofgren, L.; Hansson, G.; Abrahamsson, B.; Lennernas, H.; y Nilsson, R. Simultaneous assessment of lipid classes and bile acids in human intestinal fluid by solid-phase extraction and HPLC methods. *J. Lipid Res.* 2007. 48: 242–251.



61. Plummer, D.T. Introducción a la Bioquímica Prácticas. Ed. Mc Graw Hill. Latinoamerica (1981).
62. 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.
63. Robinson, K. & Robinson, J. Análisis Instrumental., Madrid. Pearson Educación, S.A.2001
64. Silverstein, R.M. Spectrometric identification of organic compounds. R.M. Silverstein, C.G.Bassler, T.C. Morrill. –3. Ed – p. 231, 1977.
65. Skoog, D.; Leary, J. Análisis Instrumental. 4^{ta} Edición, 1994.
66. Solid phase extraction. Published by Lotus® Freelance Graphics®. [on line] Disponible en URL: http://www.SPE_site1.htm. [actualizado 24-Apr-2002]. [citado 23 de marzo de 2008].
67. Sobol, E.; Yagen, B.; Winkler, I.; Britzi, M.; Gibson, D. y Bialer, M. Pharmacokinetics and Metabolism of a new potent antiepileptic drug, 2, 2, 3,3-tetramethycyclopropanecarbonylurea, in rats. Drug Metabolism and disposition.2005; 33:1538-1546.
68. Thurman, E. M.; Mills, M. S. Solid Phase Extraction. Principles and Practic. John Willey & Sons. 1998; p.344.
69. Velázquez, M. Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz sólida y Cromatografía de Gases con detección de por captura electrónica para la determinación de G-1 en plasma.[Tesis de diploma].Villa Clara: Universidad Central de Las Villas.2007.
70. Vitrofur. Registro Central de Plaguicidas. N° de permiso 013/99, Tomo 3, Folio 249. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba. 1999
71. Vyas, K.; Halpin, R.; Geer, L.; Ellis, J.; Liu, L.; Cheng, H., et al. Disposition and pharmacokinetics of the antimigraine drug, Rizatriptan in humans .Drugs Metabolism and disposition.2000; 28(1):89-95.
72. 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.



73. Yao, J.; Zhang, L.; Zhao, X.; Hu, L.; Jiang, Z. Simultaneous Determination of Triptolide, Wilforlide A and Triptonide in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 2006;29(7):1483-1486.
74. Zhang, B.; y Saku, K.; Control of matrix effects in the analysis of urinary F2-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. Journal of Lipid Research. 2007;48:733-744.

**Anexo 1. Certificado de calidad de la muestra de referencia de G-1****CBQ**

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

Certificado de Calidad

Producto **G-1**
Folio: --

Fecha de Fabricación: 03-07-14
Lote: 03-3-34

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

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

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

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

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

Aylen Hernández García

Determinación de G-1 en plasma humano empleando SPE y GC-ECD.

**Anexo 2. Certificado de calidad del lote de G-1 empleado en el estudio.****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 Fabricación: 03-03-27****Lote: 03-3-13****Fecha de reanálisis: 06-11**

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

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

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

Aylen Hernández García**Determinación de G-1 en plasma humano empleando SPE y GC-ECD.**



Anexo 3. Certificado del plasma humano empleado en el estudio.

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

SOLICITUD Y ENVIO DE SANGRE
Y SUS COMPONENTES

SOLICITUD ☐ URGENTE
☒ NO URGENTE

ENVIO 257

UNIDAD Y DEPARTAMENTO
BIOACTIVOS D.

UNIDAD Y DEPARTAMENTO
Banco de Sangre

NOMBRE Y APELLIDOS:
Adelmo W. J. J.

NOMBRE Y APELLIDOS:
Adelmo W. J. J.

FECHA:
DIA MES AÑO

FECHA:
DIA MES AÑO

DESCRIPCION DEL PRODUCTO	GRUPO FACTOR	U.M.	CANTIDAD SOLICITADA	CANTIDAD ENVIADA	TOTAL DE FRASCO O BOLSA	NUMERO DE HISTORIA CLINICA Y CODIGO
Plasma	B		1	1		319-12-4074
Plasma Sobrenadante Citio			1	1		257-P ₂ -7394

RECIBIDO POR:
Sergio Morales
NOMBRE Y APELLIDOS

CI: 67040109146
FIRMA

FECHA:
DIA MES AÑO

Publicinasf Ciego de Avila

Aylen Hernández García

Determinación de G-1 en plasma humano empleando SPE y GC-ECD.

**Anexo 4. Análisis estadístico. Precisión a tres niveles de concentración.****ANOVA Table for Conc by grupo**

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	39.2904	2	19.6452	8929.64	0.0000
Within groups	0.0132	6	0.0022		
Total (Corr.)	39.3036	8			

Variance Check

Cochran's C test: 0.520202 P-Value = 0.690610

Bartlett's test: 1.07673 P-Value = 0.834047

Hartley's test: 2.39535

The StatAdvisor

The three statistics displayed in this table test the null hypothesis that the standard deviations of Conc within each of the 3 levels of grupo is the same. Of particular interest are the two P-values. Since the smaller of the P-values is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference amongst the standard deviations at the 95.0% confidence level.

**Anexo 5. Análisis estadístico. Precisión intermedia.**

ANOVA Table for ConcG10 by dia

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0240667	2	0.0120333	3.59	0.0945
Within groups	0.0201333	6	0.00335556		
Total (Corr.)	0.0442	8			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of ConcG10 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 3.58609, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean ConcG10 from one level of dia to another at the 95.0% confidence level.