



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALITICO
PARA DETERMINAR SULFAMETACINA Y ACETILSULFAMETACINA
EN ORINA HUMANA POR HPLC”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

QFB. ÁLVARO VILLASCÁN RODRÍGUEZ

ASESOR:

M. en C. BENJAMÍN SANDOVAL GUZMÁN

PUEBLA, PUE., A 10 DE MARZO DE 2015

INDICE

Contenido	
1 ANTECEDENTES.....	5
1.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	5
1.1.1 Cromatografía de Fase Normal (CFN).....	6
1.1.2 Cromatografía de Fase Reversa (CFR)	6
1.1.3 Ventajas y Limitaciones	8
1.2 Términos Básicos y Conceptos.	9
1.2.1 Tiempo de Retención (T_R).....	9
1.2.2 Tiempo Muerto (T_M)	9
1.2.3 Factor de capacidad (k)	10
1.2.4 Factor de separación (α).....	10
1.2.5 Platos teóricos	11
1.2.6 Resolución (R_s).....	12
1.2.7 Asimetría (A_s)	13
1.2.8 Factor de Coleo (T_f).....	13
1.3 Validación	15
1.3.1 Definición.....	15
1.3.2 Linealidad.....	16
1.3.3 Selectividad.....	17
1.3.4 Precisión	17
1.3.5 Repetibilidad.....	17
1.3.6 Reproducibilidad.....	18
1.3.7 Límite de Detección.....	18
1.3.8 Límite de Cuantificación	18
1.3.9 Robustez	19
1.3.10 Método del Estándar interno	19
2 ANALITOS.....	20

3 POLIMORFISMO ACETILADOR	22
4 ANALISIS EN HPLC.....	24
4.1 Optimización de condiciones cromatográficas	24
4.2 Procesamiento de la muestra biológica	24
4.3 Extracción Líquido-líquido	25
5 OBJETIVO GENERAL	27
6 OBJETIVOS PARTICULARES	27
7. JUSTIFICACION.....	28
8. HIPÓTESIS	29
9 METODOLOGIA.....	30
9.1 Desarrollo del Método.....	30
9.1.1 Procedimiento	31
9.1.2 Desarrollo del proceso de extracción de analitos de la matriz biológica.....	41
9.1.3 Elección del Estándar Interno.....	50
9.2 Inicio de la validación del método analítico par cuantificar Sulfametacina y Acetilsulfametacina en orina humana.....	53
9.2.1 Linealidad del método	55
9.2.2 Precisión	55
9.2.3 Selectividad del método	55
9.2.4 Repetibilidad.....	55
9.2.5 Reproducibilidad.....	56
9.2.6 Límite de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ).....	56
9.2.7 Robustez	56
9.3 Resultados de la Validación del método analítico.....	57
9.3.1 Linealidad del método	57
9.3.2 Selectividad del método	63
9.3.3 Limite de Detección y Cuantificación	63
9.3.4 Precisión	63
9.3.5 Repetibilidad.....	64

9.3.6 Robustez	64
10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
11 PRUEBA DEL MÉTODO ANALÍTICO EN MUESTRAS DE VOLUNTARIOS SANOS.	70
12 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	74
13 CONCLUSION	77
ANEXO I.....	78
BIBLIOGRAFÍA	80

1 ANTECEDENTES

1.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La cromatografía líquida es un método físico de separación de sustancias, donde un líquido (fase móvil), el cual lleva disuelto el analito, migra a través de un sólido (fase estacionaria).

En este sistema el analito, la fase móvil y la fase estacionaria interactúan para así propiciar la separación^{7, 8,25} como se muestra en la figura 1.1.

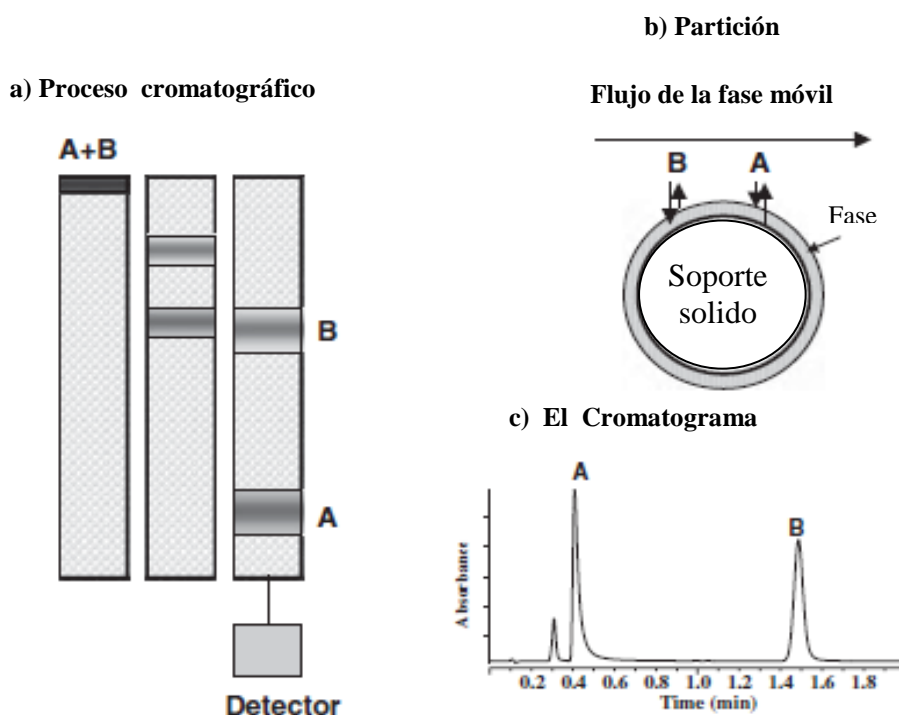


Figura 1.1. (a) Esquema de el proceso cromatográfico que muestra la migración de dos componentes bajando en una columna (b) Representación microscópica del proceso de partición de moléculas de analito de A y B dentro de la fase estacionaria unida al soporte sólido esférico (c) Grafica de un cromatograma, la señal de un espectro de UV, detectando la elusión de los

La cromatografía se descubrió hace más de cien años, por el botánico ruso M. S. Tswet, quien en 1903 separo pigmentos de plantas en columnas de vidrio rellenas de carbonato de calcio. La invención de la cromatografía de gases por el químico británico A.J.P. Martin y Syngé, en 1942, y sus afortunadas aplicaciones, proveen el fundamento teórico y la iniciativa para el desarrollo de la cromatografía líquida (CL).

En los años sesenta, la CL cambia a “alta resolución” con el uso de columnas con pequeñas partículas empaquetadas a grandes presiones que requieren bombas de alta presión para el flujo de la fase móvil.⁸

La primera generación de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) fue desarrollada por investigadores como Horvath, Kirkland y Huber, a finales de los años sesenta.⁷ A partir de entonces el HPLC se fue diversificando tan intensa y rápidamente a tal grado de hacer muy popular este método analítico aplicándose no solo al estudio de sustancias en laboratorios, sino también en la industria. A continuación se mencionan los tipos más comunes de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

1.1.2 Cromatografía de Fase Normal (CFN)

También conocida como cromatografía de adsorción. La CFN es la forma tradicional de separación basada en la adsorción\desorción del analito sobre una fase estacionaria polar.

La figura 1.2 esquematiza una parte de un poro de sílica de una partícula con grupos silanol (Si-OH) ocupando la superficie y el interior del poro.

Los analitos polares migran lentamente a través de la columna debido a las fuertes interacciones con los grupos silanol.^{7,25}

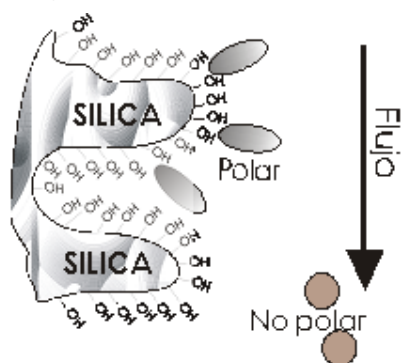


Figura 1.2 Esquema que muestra la naturaleza polar de la sílica en la cromatografía de fase normal.

1.1.3 Cromatografía de Fase Reversa (CFR)

Es la cromatografía donde separación se basa principalmente en la partición del analito entre una fase móvil ligeramente polar y una fase estacionaria hidrófoba (no polar), habiendo otros fenómenos involucrados tales como la adsorción, una mezcla de los fenómenos de adsorción-partición, o la teoría solvofóbica de Horvath, la cual indica que la interacción entre moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de

las moléculas de solvente entre si. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil, forzado a interactuar por mayor tiempo en la fase estacionaria que actúa como un receptor pasivo.²⁶

Una vista simplificada se muestra en la figura 1.3, donde los analitos no polares interactúan más fuertemente con los grupos C18 que están ligados al soporte de sílica sólida.

Esta elución formada por “polar primero y no polar después” es lo contrario que lo observado en CFN, y así es como surge el termino de “cromatografía de fase reversa”. En CFR utiliza comúnmente una fase móvil polar tal como una mezcla de metanol y/o acetonitrilo con buffer.⁷

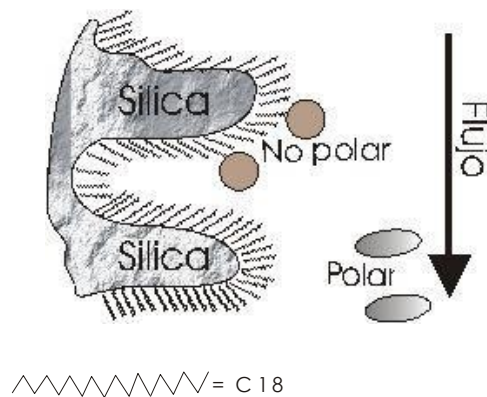


Figura 1.3 Esquema de la fase estacionaria no polar en interacción con analitos polares y no polares.

La CFR es el tipo de HPLC más popular y es usado en más del 80% de todos los análisis en HPLC.^{7,8,25} ya que cuenta con las siguientes características:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna
- La fuerza de atracción entre la superficie no polar y soluto es débil
- La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, ocurre raramente
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
- El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios.
- El orden de elución es predecible, conociendo las características del analito, tal como su hidrofobicidad.²⁶

En la actualidad estas fases se pueden encontrar ligadas a otros grupos, permitiendo la diversidad de columnas, haciendo aun más versátil al HPLC de fase reversa, ampliando las capacidades de análisis de sustancias, por ejemplo:

- Soporte sólido: Sílica, alúmina, o algún híbrido
- Fase ligada: C₄, C₈, C₁₈, amino, ciano, fenilo o difenilo.

Otros tipos de fases ligadas permiten sub-clasificar a la cromatografía en:

- Cromatografía de Intercambio Iónico, donde la fase ligada puede ser de dietil aminoetil, sulfonato, amonio cuaternario o de carboxilato, que permiten interacciones fuertes con cargas diferentes a las que presentan los analitos.
- Cromatografía de Exclusión de Tamaño, la cual tiene como fase ligada a polímeros (agarosa o dextranos) que forman redes o poros de diferente tamaño favoreciendo el paso de las moléculas grandes y reteniendo en los poros a las moléculas de menor tamaño.
- Cromatografía Quiral, donde la fase estacionaria tiene una fase ligada que puede generar diferentes tiempos de retención entre compuestos con formas enantioméricas. Estas fases ligadas pueden ser ciclodextrinas, polímeros helicoidales (celulosas) o proteínas con afinidad quiral (albumina de suero) entre otras.^{7, 8, 25,26}

1.1.4 Ventajas y Limitaciones

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una técnica de separación con capacidad para analizar multicomponentes en tiempo real. Pocas técnicas pueden mostrar esta versatilidad y precisión.

El equipo de HPLC es totalmente automatizado, usando sofisticados sistemas de auto muestreo y sistemas de datos para análisis y generación de reportes.

Una multitud de detectores altamente sensibles y específicos extienden los límites de detección a nivel de nanogramos, picogramos y hasta fentogramos.

Como una técnica preparativa, provee recuperaciones cuantitativas de muchos componentes en cantidades de miligramos. El HPLC es compatible con el 80% de todos los compuestos existentes, y no hay problema si el analito es lábil, en comparación con la cromatografía de gases (CG).

El HPLC sufre de varias desventajas o limitaciones bien conocidas. Primero, no hay detectores universales, así que la detección es más problemática si el analito no absorbe en

la región de UV o no pueda ser fácilmente ionizable por el detector espectrofotométrico de masas, de tal forma que las características del analito dan la pauta para seleccionar el tipo de detector adecuado. Segundo, la eficiencia de la separación en análisis de mezclas complejas es menor (si es que se utiliza una técnica isocrática) que por capilaridad en CG. Finalmente, el HPLC tiene muchos factores que propician la separación y son difíciles de controlar para un analista que trabaja por primera vez con el HPLC.⁷

1.2 Términos Básicos y Conceptos.

1.2.1 Tiempo de Retención (T_R)

El tiempo de retención es el tiempo que tarda un analito en salir de la columna, que sí interacciona con ella y ser detectado, es decir, desde un tiempo inicial (inyección de la muestra), hasta el tiempo en que se detecta el pico máximo de la muestra.⁸ En la Figura 1.4 se ilustra el tiempo de retención en un Cromatograma.

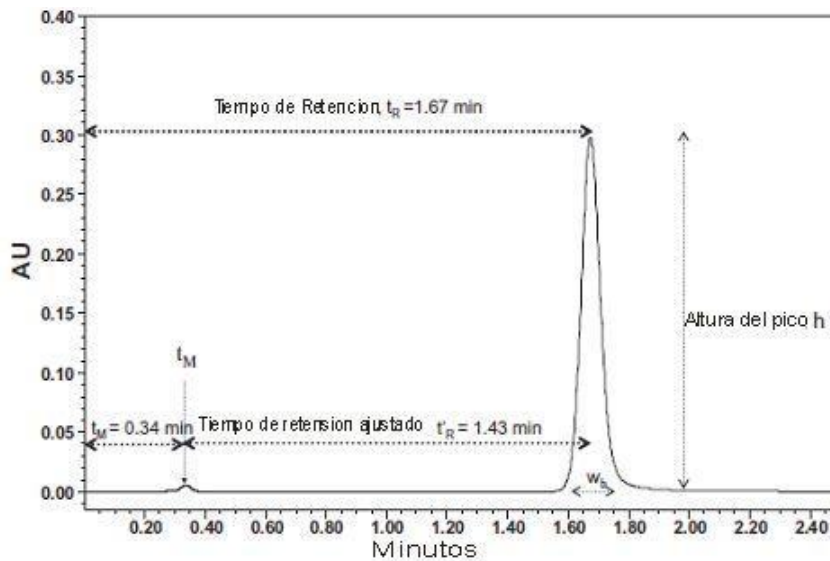


Figura 1.4 Cromatograma donde se indican los parámetros principales en un cromatograma: Tiempo de Retención (t_R), Tiempo Muerto (t_M), Tiempo de Retención Ajustado (t'_R), Altura del pico (h), Ancho del pico (w).

1.2.2 Tiempo Muerto (T_M)

Es el tiempo que tarda una sustancia, en atravesar físicamente a la fase estacionaria, y que no interacciona con ésta pero que presenta una señal en el detector,⁷ como se muestra en la Figura 1.4.

La relación entre el tiempo muerto y el tiempo de retención se expresa en el tiempo de retención ajustado (T_R'):

$$T_R' = T_R - T_M$$

En el HPLC una de las sustancias que se utilizan para determinar el tiempo muerto es la acetona, la cual no interacciona con las columnas utilizadas en la cromatografía de fase reversa (no polar), pero causa una señal.

1.2.3 Factor de capacidad (k)

También llamado factor de retención o de resolución, que es el grado de retención de los componentes de la muestra en la columna. k se define como el tiempo relativo que el soluto reside en la fase estacionaria con respecto al tiempo que reside en la fase móvil. El factor de capacidad se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$k = \frac{T_r - T_M}{T_M}$$

Los valores de k deben estar idealmente entre 1 y 10, ya que si $k=0$ indica que el analito no interacciona con la fase estacionaria y eluye junto con el solvente a través de la columna, y una $k>10$ indica que el componente es altamente retenido en la fase estacionaria.⁸

Para una sustancia dada en una columna determinada, con una fase móvil adecuada, k por lo general es constante cuando la muestra es pequeña. El valor de T_R es definido para un compuesto dado en unas condiciones dadas, así entonces el valor de T_R puede ser usado para identificar a un compuesto comparando el valor en condiciones idénticas.⁷

1.2.4 Factor de separación (α)

También conocido como factor de selectividad, es una medida de la retención relativa o separación de dos muestras o analitos, y es exactamente lo que se desea hacer en HPLC.

El factor de separación se determina con la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Convencionalmente el factor de capacidad del último de los dos picos adyacentes es colocado en el numerador de la ecuación anterior, por lo que el valor de α es mayor a 1. El

factor de separación es una medida de selectividad de un sistema cromatográfico.⁷ La figura 1.5 ejemplifica la forma de obtener α .

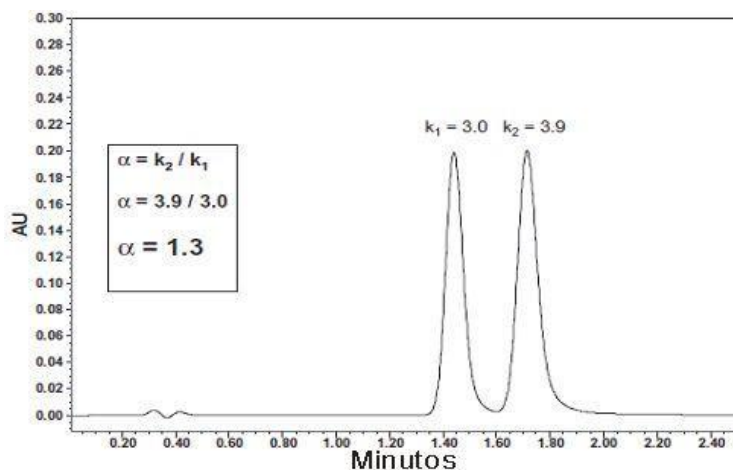


Figura 1.5 Cromatograma donde se ilustra la forma de obtener α . La comparación se hace solo entre dos picos o señales.

1.2.5 Platos teóricos

El concepto de plato fue adaptado del proceso industrial de destilación, usando una columna de destilación formada por platos individuales donde la condensación de líquidos esta equilibrándose con el vapor en ascenso. El mismo concepto de número de platos o altura de platos se aplica al HPLC.^{7,25}

El número de platos teóricos (N) es una medida de la eficiencia de la columna.^{7,8} es decir, la eficiencia es la capacidad de la columna para producir picos definidos y con una separación aceptable.

Numero de platos teóricos (N):
$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

N es definida como el cuadrado de la relación del tiempo de retención dividido por la desviación estándar del pico (σ). La longitud o ancho del pico es aproximadamente 5σ para un pico Gaussiano.⁷

Ya que es más difícil de medir la desviación estándar del pico (σ) que la longitud del mismo, hay una interrelación usando la longitud a la altura media del pico ($w_{1/2}$) que generalmente se usa en la USP.^{7, 8,25}

Entonces:
$$N = 5.546 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Como se puede observar, la última ecuación es más fácil de utilizar para calcular el número de platos teóricos.

Hay otro parámetro relacionado con los platos teóricos, y es la altura equivalente de los platos teóricos (H), en el cual se involucran la longitud de la columna (L) y el número de platos teóricos (N):

$$H = \frac{L}{N}$$

La altura equivalente de platos teóricos se utiliza generalmente para comparar la eficiencia de dos columnas con similar número de platos teóricos, por lo que es de suma importancia cuando se cambia de columna para estudiar el mismo analito.

1.2.6 Resolución (R_s)

La resolución es la medida del grado de separación de dos analitos adyacentes y se define como la diferencia de los tiempos de retención de dos picos dividido por la longitud media de los picos.

La ecuación que define a este parámetro es:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2} \right)} = \frac{\Delta t_R}{\overline{w_b}}$$

Hay que notar que si $R_s = 0$ indica completa coelusión de los picos (o no separación), así entonces, R_s debe ser mayor a 1.5 para una buena separación.^{7,28}

Existe una ecuación donde se relaciona la resolución con el factor de separación, el factor de capacidad y el factor de eficiencia⁸ o platos teóricos:

$$R_s = 1 / 4 \underbrace{\left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right]}_{\text{Factor de Separación}} \cdot \underbrace{\left[\frac{k}{(1 + k)} \right]}_{\text{Factor de Capacidad}} \cdot \underbrace{N^{1/2}}_{\text{Factor de Eficiencia}}$$

Para cambiar a los factores implicados en la resolución y por lo tanto mejorar la separación cromatográfica, se cuenta con una serie de modificaciones aplicables a las condiciones cromatográficas que se implementaran en el proceso de validación, tales modificaciones son:

- Cambio del solvente de la fase móvil, o sus proporciones

- Cambio del pH de la fase móvil.
- Cambio de la fase estacionaria.
- Cambio de Temperatura.

1.2.7 Asimetría (As)

Bajo condiciones ideales, los picos cromatográficos deben tener una forma de pico Gaussiano, con simetría, aunque en realidad no lo sean.

El Factor de Asimetría (As) se usa para medir el grado de simetría del pico y es definida en el largo del pico a 10% de su altura^{7,25}. El margen permitido para As es de 0.8 a 1.5 La Figura 1.6 muestra dónde y qué fórmula utilizar para obtener el factor de Asimetría.

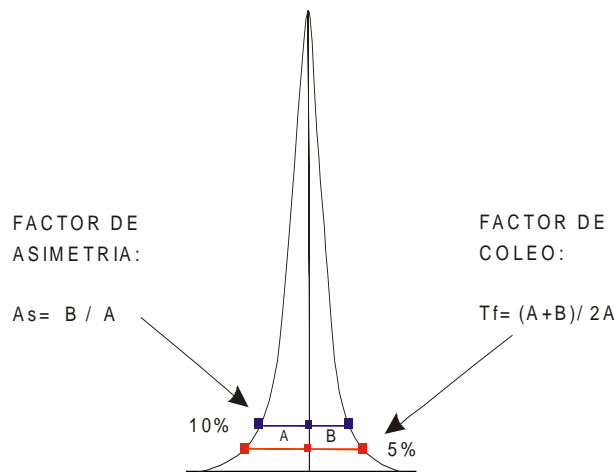


Figura 1.6 Pico o Cromatograma en el cual se indica como y donde obtener el Factor de Asimetría y el Factor de Coleo

Donde A = Tiempo (en minutos) calculado desde el inicio del pico (a la respectiva altura) hasta la mitad del mismo
 B = Tiempo calculado desde la mitad del pico (a la respectiva altura) hasta el final del pico

1.2.8 Factor de Coleo (Tf)

El Factor de Coleo (Tf) es un término similar definido por la United States Pharmacopoeia (USP). Tf es calculado usando el ancho del pico al 5% de la altura del mismo. La Figura 1.4 muestra cómo obtener el Factor de Coleo. Los valores de Tf deben encontrarse preferentemente entre 0.5 y 2.

El Factor de Coleo y la Asimetría son determinaciones equivalentes y utilizados indistintamente, aunque hay ciertas diferencias en sus valores calculados, generalmente el factor de asimetría suele ser ligeramente mayor que el factor de coleo. En la siguiente tabla se muestran datos de cálculos de ambos factores en el mismo pico mostrándose sus ligeras diferencias:

Minutos		Factor de Asimetría (a 10% de altura)	Factor de coleo (a 5% de altura)
A	B		
1.05	1.10	1.04	1.02
1.18	1.56	1.32	1.16
1.06	1.62	1.52	1.26
1.10	1.81	1.64	1.32
1.00	1.77	1.77	1.38
1.00	2.12	2.12	1.56

1.3 VALIDACIÓN

1.3.1 Definición

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el o los usuarios, para poder resolver un problema analítico particular.²³

Estos requisitos de carácter estadístico, son los que debe poseer el método, tales parámetros son:

- **Linealidad**
- **Selectividad**
- **Precisión**
- **Repetibilidad**
- **Reproducibilidad**
- **Limite de Detección**
- **Limite de Cuantificación**
- **Robustez**

Todos los laboratorios deben validar todos sus métodos que utilicen, tanto los desarrollados por el mismo como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros laboratorios,³⁶ propiciando seguridad y confiabilidad en sus procedimientos y datos.

Existen tres tipos de validación, los cuales se definen a continuación:

Validación Prospectiva: consiste en el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado, definiendo de antemano los valores en los cuales deben estar sus parámetros estadísticos.

Validación Simultánea: Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado, basándose en información generada durante la ejecución real del proceso, o bien la comprobación documentada, de que los procedimientos de análisis hacen posible la evaluación de la muestra bajo estudio, con suficiente y definida confiabilidad.

Validación Retrospectiva: es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método realiza aquello para lo que fue diseñado, basándose en la revisión y análisis de información histórica.²⁴

El tipo de validación que se hará en este estudio es de tipo Prospectiva.

1.3.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta ante un detector dado.

Conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito donde su comportamiento es lineal, para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede determinar la concentración por interpolación en una curva estándar.²²

Para determinar linealidad, se hace una curva de calibración con al menos 6 concentraciones conocidas, se determina la curva de regresión por el método de mínimos cuadrados a partir de la ecuación de la línea recta:

$$y = a + bx$$

Donde a = Ordenada al origen

b = Pendiente

Independientemente de la apariencia de la recta, deben evaluarse los estimadores de regresión lineal los cuales son:

- Coeficiente de regresión lineal (r): se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, $y = a + bx$
- Pendiente (b): es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método.
- Ordenada al origen (a): se puede obtener la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación puede adjudicarse a un error sistemático, además de que sirve para determinar otros parámetros como el límite de detección (LOD).

1.3.3 Selectividad

Se define como la capacidad de un método analítico para medir al analito en cuestión, en presencia de otras sustancias mezcladas entre si.²⁸

En diversos escritos se presenta la equivalencia de los términos de selectividad y especificidad, algunos autores lo diferencian, definiendo a la selectividad como *la capacidad de detectar simultáneamente a sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra*, y a la especificidad como *la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto*.^{25,28}

1.3.4 Precisión

La precisión se refiere a la semejanza de múltiples resultados de una muestra homogénea.⁷

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar σ , estimada analíticamente por s o comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV)²¹. El estimador s de la desviación estándar se calcula como:

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

Donde n = Numero de medidas

X_i = Valor medio en el ensayo i ,

\bar{X} = Estimador de la media poblacional μ

1.3.5 Repetibilidad

Es el parámetro que permite observar la precisión de un método, cuando este se desarrolla bajo las mismas condiciones, con el mismo equipo, por el mismo analista utilizando la misma muestra, en el mismo laboratorio y en la misma sesión de trabajo en un periodo corto.^{25,28} El parámetro estadístico que nos define a la repetibilidad es el coeficiente de variación (CV) o DER, que corresponde a medir la dispersión de los datos alrededor de la media.²¹ el CV se calcula de la siguiente manera:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) * 100$$

1.3.6 Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de un método realizado en una muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en diferentes sesiones de trabajo.²⁵

Otra definición indica que la reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (y/o analistas) en un estudio en colaboración. El cálculo de la reproducibilidad se hace por medio del coeficiente de variación (CV).

1.3.7 Limite de Detección.

Es la cantidad más pequeña del analito que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

La mínima cantidad detectable de un analito es la concentración más pequeña que puede ser detectada realmente²⁹.

La ecuación que se utilizará para determinar el LOD es la siguiente²⁶:

$$LOD = a + 3 S_{y/x}$$

Donde a = Ordenada al origen

$S_{y/x}$ = Error estándar de estimación, que es un estadístico el cual calcula el error estándar en dirección de y , la fórmula para calcularlo es similar a la fórmula para obtener la desviación estándar:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

1.3.8 Limite de Cuantificación

Es la cantidad más pequeña del analito que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

El LOQ se determinara de manera similar al LOD siendo la ecuación a utilizar²⁶:

$$LOQ = a + 10 S_{y/x}$$

El avance en las técnicas e instrumentación analíticas han permitido determinar límites de detección y cuantificación cada vez más pequeños, hasta llegar a magnitudes pg/mL o hasta fg/mL, pero estos dependen totalmente del equipo y el análisis con el que se intenten determinar.

1.3.9 Robustez

También llamado tolerancia, y se define como el grado de *reproducibilidad* de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método sobre una misma muestra variando algunas condiciones, que pueden ser: laboratorio, reactivos, analistas, equipos, temperaturas, pH, flujo, proporciones de la fase móvil, etc.²⁹

Este parámetro se calculará de igual forma con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

1.3.10 Método del Estándar interno

Para asegurar y proveer una base confiable para la cuantificación de SMC y AcSMC se deberá utilizar el método del Patrón o Estándar Interno, el cual consta de adicionar una sustancia a las muestras y al blanco a una concentración conocida y que sufre todos los procedimientos por los cuales pasa la muestra a procesar^{9 13}.

El uso del estándar interno puede aumentar la precisión cuando las fuentes dominantes de error están relacionadas a la preparación de la muestra o la inyección, debido a que tales errores afectan de la misma forma a la concentración del estándar interno y a los analitos, estas desviaciones o errores se pretenderán eliminar cuando se calcula las razones de las áreas de los analitos entre el área del estándar interno.¹³

Las características más usuales de un estándar interno para un método cromatográfico son:

- Que no eluya al mismo tiempo que algún otro analito.
- Estabilidad.
- Se encuentra en una forma pura y abundante.
- Se recomienda que tenga características químicas similares a los analitos de interés¹³.

2 ANALITOS

Sulfametacina

Sinónimos: Sulfadimidina, Sulfadimecina

Descripción: Polvo blanco cristalino ligeramente amarillo el cual oscurece y se descompone a la exposición a la luz.

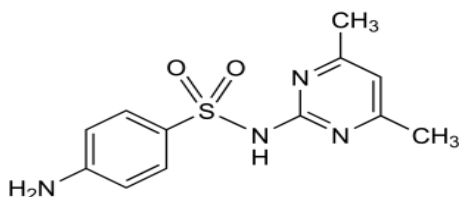
Formula empírica: $C_{12}H_{14}N_4O_2S$

Peso molecular: 278.3

Punto de fusión: 176°; también reportados de 178° a 179°C.

Solubilidad: Muy poco soluble en agua, soluble en etanol, en acetona, cloroformo, poco soluble en éter.¹⁹

Coefficiente de Partición (octanol/agua): 0.9.



N-AcetilSulfametacina

El principal metabolito de la Sulfametacina presenta las siguientes características:

Sinónimos: N-Acetil-Sulfadimidina

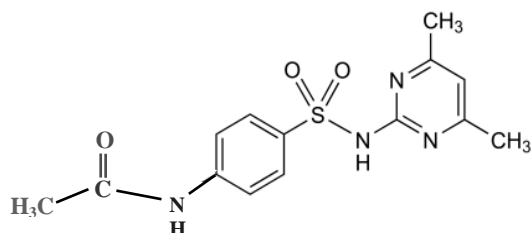
Descripción: Polvo blanco, cristalino

Formula empírica: $C_{14}H_{16}N_4O_3S$

Peso molecular: 320.32

Punto de fusión: 244°C

Solubilidad: muy soluble en metanol, soluble en éter y cloroformo.³⁵



Sulfametoxazol (Estandar Interno)

Sinónimos: Solfisomezol, Sulfametoxizol.

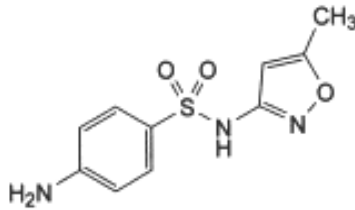
Descripción: Polvo blanco ligeramente amarillo el cual oscurece y se descompone a la exposición a la luz.

Formula empírica: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$

Peso molecular: 253.3

Punto de fusión: 169 °C a 172 °C

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en acetona, soluble en etanol. Se disuelve en soluciones diluidas de hidróxido de sodio y en ácidos diluidos.²⁰



3 POLIMORFISMO ACETILADOR

El polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, pero para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población.

Éstas variaciones genéticas pueden ser causadas usualmente por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs, siglas en inglés) de la secuencia de codificación de genes y la modulación de las funciones de proteínas o enzimas resultantes, dando como resultado un incremento, decremento o completa pérdida de la actividad de la proteína o enzima³¹ y esto puede dar como consecuencia una variación de su función en los individuos de una población.

El polimorfismo genético de las enzimas humanas, implicadas en la biotransformación de xenobioticos, causa una marcada variabilidad en la respuesta a fármacos y a químicos ambientales.³⁰

Diversas investigaciones han logrado con éxito determinar el polimorfismo genético mediante técnicas y equipos variados, ya sea fenotipificando o genotipificando y utilizando una gran variedad de fármacos y poblaciones.

El polimorfismo acetilador se refiere a la diferencia en la población de la capacidad de acetilación de fármacos llevada a cabo por la enzima N Acetil Transferasa 2 (NAT2), ésta enzima se encarga de acetilar fármacos y xenobioticos que tengan aminas primarias, aromáticas o estructuras del tipo hidracinas.

La variación en la acetilación de fármacos fue descubierta hace casi 50 años, en estudios sobre el metabolismo de isoniazida en pacientes con tuberculosis.³³ Después de esto se demostró que en algunas sulfonamidas, así como en otros fármacos se presentaba el polimorfismo acetilador.

De esos estudios se concluyó que hay dos principales fenotipos acetiladores, acetiladores rápidos y acetiladores lentos.³¹

Debido a la importancia del papel de la enzima NAT2 en la activación metabólica y/o biotransformación de diversos fármacos, varias investigaciones en el pasado se han focalizado en la distribución de diferentes variantes de esas enzimas en diversas poblaciones.^{32,34}

Por este gran interés, se desarrollará y validará un método analítico para determinar sulfametacina y acetilsulfametacina en orina humana, para que en un trabajo posterior se examine el polimorfismo acetilador fenotipificando a la población mexicana.

4 ANÁLISIS EN HPLC

4.1 Optimización de condiciones cromatográficas

Antes de hacer cualquier procedimiento a la muestra, debemos saber cuáles son las señales propias de la orina y cuáles son las señales de los analitos, así como saber los tiempos de retención y las condiciones óptimas de separación de los analitos, con los resultados obtenidos sabremos si es necesario hacer algún procedimiento previo a la muestra biológica.

En diversos estudios utilizan columnas de fase reversa, generalmente C8 o C18, una fase móvil formada por un buffer (fosfatos o acetatos) y un solvente o mezcla de solventes (Acetonitrilo o Metanol), a diversas longitudes de onda, dependiendo de la sulfonamida en cuestión.

Así entonces como primer paso debemos hacer la búsqueda de las condiciones cromatográficas para la correcta separación de Sulfametacina y Acetilsulfametacina, además de saber si las sustancias propias de la orina interfieren con los analitos y en que magnitud.

4.2 Procesamiento de la muestra biológica

Un gran problema en el desarrollo de métodos para el análisis de fármacos es la detección de éste en la matriz biológica, ya que hay una potencial interferencia de los compuestos propios de ésta matriz.

Una aproximación general para la determinación de sulfonamidas en diversas matrices biológicas, implica la preparación de la muestra como: extracción y lavados, para un posterior análisis en HPLC¹⁰.

Los objetivos de la preparación de la muestra son:

- Minimizar las interferencias en la muestra.
- Reducir el daño en la columna.
- Hacer compatible la muestra con el método analítico a utilizar²⁵.

Ya que el método de elección es la extracción líquido-líquido, se deberán seleccionar los solventes para dicha extracción de los analitos a partir de la matriz biológica, así como verificar si es necesario hacer procesos de lavado a la matriz y/o a la muestra. En la figura 4.1 se muestra un proceso común de Extracción Líquido-Líquido.

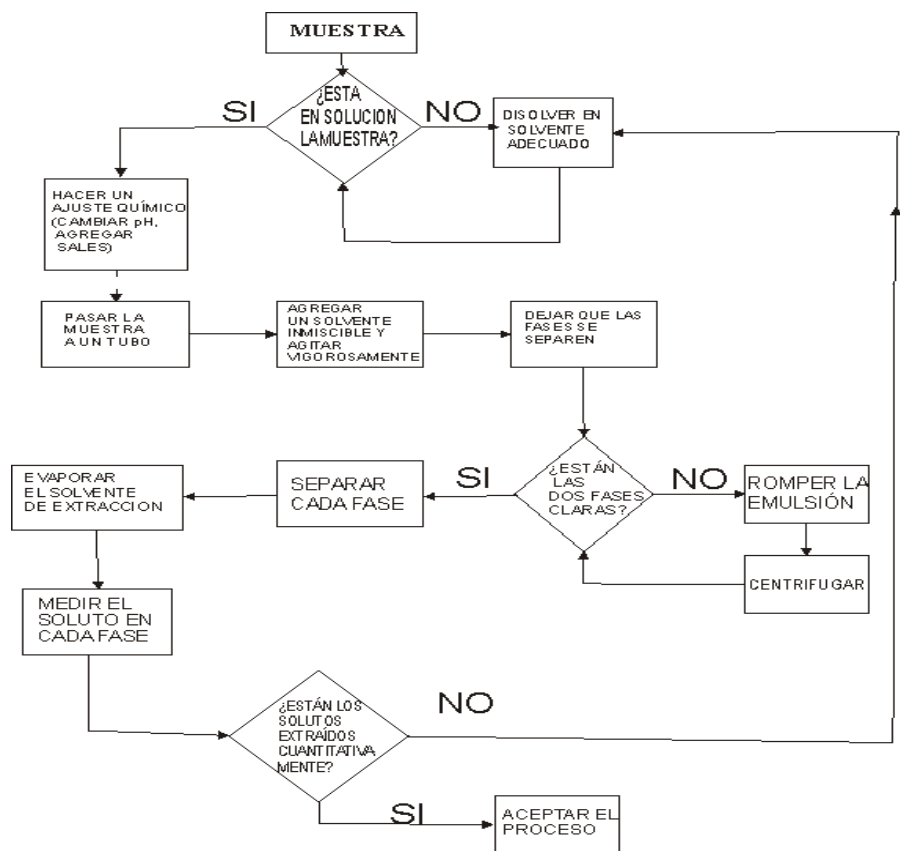


Figura 4.1 Esquema que muestra el proceso general de Extracción Líquido-Líquido

4.3 Extracción Líquido-líquido

Este tipo de extracción es usada para separar analitos de sus interferencias, por partición de la muestra entre dos líquidos o fases inmiscibles.²⁵

Generalmente la extracción de sulfonamidas en carne, leche y huevo¹⁰ al igual que en plasma³ se han hecho con solventes orgánicos. El uso de grandes cantidades de solventes orgánicos hace que estos métodos sean laboriosos y consuman mucho tiempo.

Las sulfonamidas son poco solubles en solventes no polares, pero tienen buena solubilidad en solventes polares, por lo tanto, la extracción generalmente se hace con cloroformo, cloruro de metileno, acetona, acetonitrilo o etil acetato.

Los solventes orgánicos desnaturalizan proteínas, dando como resultado una extracción con menos interferencias, ayudando así a la extracción del fármaco unido a proteínas.^{3,10}

Cuando la extracción es desde una fase orgánica dentro de una fase acuosa, el ajuste de pH en la fase acuosa, propicia que las sulfonamidas sean menos solubles en la fase acuosa, favoreciendo la extracción con el solvente orgánico, este paso es crítico para obtener recobros aceptables (>50%).

Las pruebas previas a la extracción que se efectuarán serán las siguientes:

- Que el o los analitos a estudiar sean solubles en el solvente orgánico seleccionado.
- Que sea inmisible con la fase acuosa (orina).
- Bajo punto de ebullición.²⁵

Lavado de la muestra.

El proceso de lavado de la muestra se desarrolla por extracción inversa de sulfonamidas en un medio acuoso, haciendo un cambio de pH de la fase acuosa se propiciara que la sulfonamida sea más soluble en la fase acuosa que en la fase orgánica. El propósito de este lavado adicional será la extracción selectiva de las interferencias con la fase orgánica, dejando a la sulfonamida en la fase acuosa¹⁰.

Después de los procesos mencionados, extracción y lavado, se evaluará:

- Que las sustancias propias de la orina no interfieran en los tiempos de retención de los analitos.
- Que la concentración de los analitos encontradas en los solventes de extracción a probar sea la óptima (recobro mayor al 50%), si es que la concentración no es mínima aceptable, se evaluará modificando el pH de la fase acuosa o haciendo mezclas de solventes para extracción.

5 OBJETIVO GENERAL

- Diseñar y validar un método analítico para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina en orina humana.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar estadísticamente si el método desarrollado es adecuado para el propósito requerido, tomando en cuenta los parámetros de validación.
- Hacer un estudio preliminar con ocho voluntarios sanos y al mismo tiempo evaluar el método desarrollado con estas muestras.
- Evaluar los resultados obtenidos de las muestras de orina de voluntarios sanos y así fenotipificar a los voluntarios como acetiladores deficientes, intermedios o rápidos.

7. JUSTIFICACION

La validación de métodos analíticos se hace ineludible debido a la necesidad de datos fidedignos, ya sea en la industria o en la investigación; así lo solicitan los organismos nacionales e internacionales dedicados a la certificación y estandarización de procesos.

Una forma para asegurar la calidad de los procedimientos es la validación de los mismos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada.

El desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Sulfametacina y su metabolito la Acetilsulfametacina por HPLC es necesaria para fenotipificar posteriormente a una población determinada y así clasificarla como metabolizadores deficientes, intermedios o rápidos, hecho que tiene implicaciones clínicas tan relevantes como evitar efectos negativos en pacientes.

Los estudios de fenotipificación nos ayudan mejorar la dosificación de fármacos, ya sea individualizando o adecuando las dosis a la población mexicana evitando así la aparición de efectos adversos, debido a esto se hace necesario el estudio del metabolismo acetilador en la población mexicana.

8. HIPÓTESIS

H₀: *El desarrollo de un método analítico para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina por HPLC cumple con los parámetros de validación correspondientes.*

H_A: *El desarrollo de un método analítico para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina no cumple con los parámetros de validación correspondientes.*

9 METODOLOGIA

9.1 Desarrollo del Método.

El análisis cuantitativo de diversas sulfonamidas se ha estudiado en una gran variedad de muestras que incluye a ciertos alimentos como cárnicos¹, lácteos², y huevo¹⁰, también en muestras de aguas residuales⁴, en muestras biológicas como plasma humano^{3, 5}, orina animal⁶ y en formas farmacéuticas¹¹, teniendo como método analítico a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de espectrofotometría UV, método analítico por elección para la separación y cuantificación.

En el caso particular de la Sulfametacina, las muestras en las cuales se ha estudiado son: carne, huevo, leche¹⁰, aguas residuales⁴ y formas farmacéuticas¹¹ y como muestra biológica se tiene al plasma¹² y orina animal⁶, pero hasta la conclusión de este trabajo no se ha encontrado algún método que intente buscar Sulfametacina en orina humana con los objetivos que se plantean. Dicho método debe cumplir con ciertas condiciones o parámetros analíticos los cuales proporcionen confiabilidad, para cumplir con el propósito para lo que fue diseñado.

La forma en que emprendimos la elaboración de este proyecto para cuantificar Sulfametacina y Acetilsulfametacina fue la siguiente:

- Hacer la búsqueda bibliográfica de los métodos reportados para el análisis de sulfonamidas en matrices biológicas.
- Establecer las condiciones cromatográficas, tomando como orientación a los métodos reportados para separar y cuantificar Sulfametacina y Acetilsulfametacina.
- Evaluar los solventes utilizados para el lavado de la matriz biológica y/o extracción de los analitos, para la adecuada cuantificación de Sulfametacina y Acetilsulfametacina (Selectividad).
- Determinar el porcentaje de recobro del método seleccionado.
- Buscar el analito que cumpla la función de estándar interno.
- Validar el método analítico con los parámetros correspondientes.
- Analizar y comparar estadísticamente los datos y obtener las conclusiones correspondientes.
- Aplicar el método validado con voluntarios sanos.

9.1.1 Procedimiento

Revisión Bibliográfica.

En diversos artículos se encontró que utilizan columnas de fase reversa, como C8 y principalmente C18¹⁰, usando fases móviles que están constituidas por Buffer de fosfatos o de acetato en mezcla con algún solvente orgánico en la fase móvil, tal como Acetonitrilo o Metanol¹⁰.

Condiciones Cromatográficas.

Ya que el buffer de Fosfatos y Acetonitrilo en mezcla a diversas proporciones es la fase móvil que se utiliza con mayor frecuencia^{6 10 11} en la separación de sulfonamidas, la fase móvil a probar se constituirá de 60% de Buffer de Fosfatos a una concentración de 0.01 M a un pH de 3.30 y un 40% de Acetonitrilo.

Por lo tanto las condiciones probadas inicialmente fueron las siguientes:

Fase estacionaria: Columna Dionex Acclaim 120 5 μ m C18 4.6 x 150 mm.

Fase móvil: Buffer de fosfatos 0.01M pH= 3.30: Acetonitrilo 60: 40 v/v.

Flujo de 1.5 mL min⁻¹

Longitud de onda: 268 nm. Temperatura Ambiente.

En condiciones isocráticas.

Preparación de Soluciones:

Se prepararon soluciones primarias de SMC y de AcSMC de 1000 μ g.mL⁻¹, cada una, el procedimiento fue el siguiente:

Se pesaron 0.010 g de SMC, depositarlos en un matraz volumetrico de 10 mL y se aforo con Metanol grado analítico.

Pesar 0.010 g de AcSMC, depositarlos en un matraz volumétrico de 10 mL, llevar hasta la marca de volumétrico con Metanol grado analítico.

Se hicieron soluciones de Sulfametacina y Acetilsulfametacina en Metanol a una concentración de 10 μ g.mL⁻¹, tomando 0.1 mL de la solución de SMC de 1000 μ g.mL⁻¹, vertiendo en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforo con Metanol grado reactivo.

Se tomaron 0.1 mL de la solución de AcSMC de 1000 μ g.mL⁻¹ y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con Metanol grado reactivo.

Para probar las condiciones cromatográficas se inyectaran ambos analitos por separado, por lo cual se tomó una alícuota a un tubo 1.0 mL de solución SMC 10 μ g.mL⁻¹ y a otro tubo

1.0 mL de solución AcSMC $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, poner a evaporar a $50\text{-}60^\circ\text{C}$, cuidando de no llegar al punto de ebullición del Metanol (65°C). Después de evaporar 1.0 mL de cada solución se reconstituirá con 1.0 mL de fase móvil y se procedió a inyectar cada solución reconstituida por separado seguido de una inyección de ambos analitos mezclados a la misma proporción, con la finalidad de observar sus tiempos de retención (t_r y t_r'), factores de capacidad y separación (κ y α) adecuados. Para hacer estos cálculos debemos calcular el tiempo muerto del sistema (t_0), el cual se obtuvo inyectando acetona, teniendo como fase móvil: Buffer de fosfatos 0.01M $\text{pH}= 3.30$: ACN $60: 40$ v/v, a flujo de 1.5 mL min^{-1} , longitud de onda: 268 nm y temperatura ambiente, obteniendo un valor de $t_0 = 0.76\text{min}$.

A continuación se muestra el Cromatograma de las inyecciones de dichos analitos por separado y en mezcla:

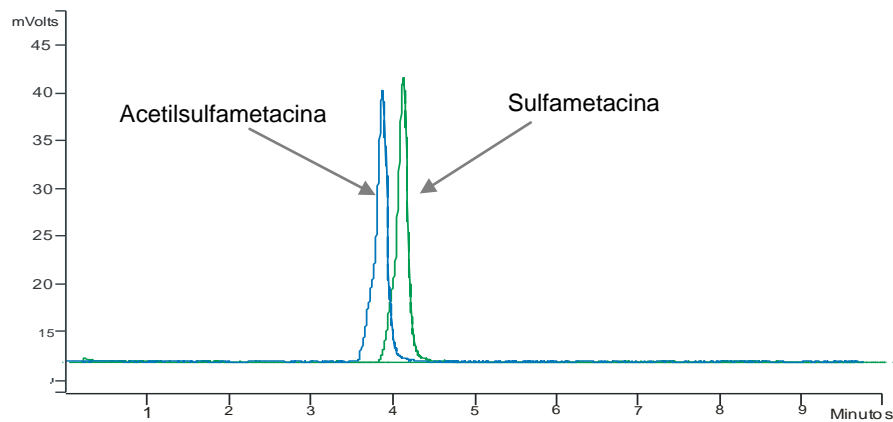


Fig.9.1 Cromatograma que muestra a SMC y AcSMC $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inyectados por separado bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas. Obsérvese el ligero traslape de señales.

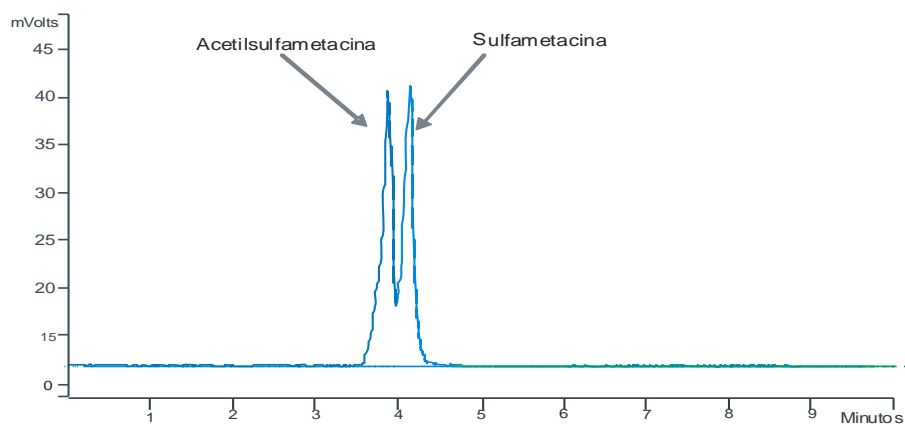


Fig. 9.2 Cromatograma que muestra a la SMC y AcSMC mezcladas en la misma inyección, sus parámetros cromatográficos se proporcionan en el texto.

Como podemos observar la separación no es adecuada, ya que la Sulfametacina ($t_r=4.29$ min $t_r' =3.68$ min $k=6.03$) y AcetilSulfametacina ($t_r= 3.83$ min, $t_r' = 3.22$ min, $k=5.27$) presenta un factor de separación de $\alpha= 1.14$, que se encuentra fuera del intervalo aceptable ($\alpha >1.20$); el factor de coeio (Tf) de ambos picos es adecuada (Tf SMC = 0.95, Tf AcSMC =0.92) estos valores están dentro del rango aceptable ($0.50 > Tf < 2.0$).

Es de esperarse el traslape de señales, debido a que ambas sustancias son muy parecidas, solo cambien por un grupo acetilo en la posición N⁴ para Acetilsulfametacina, lo que proporciona una solubilidad ligeramente mayor en la fase móvil, en comparación a la Sulfametacina. Una forma de separar las señales es variando la cantidad de solvente orgánico en la fase móvil o cambiar el pH de la fase móvil.

En la búsqueda de nuevas condiciones de separación se recomienda modificar un factor a la vez, a fin de observar el efecto que tiene este factor en la separación cromatográfica.

El primer factor que se cambió fue la proporción del Acetonitrilo en la fase móvil, disminuyendo su proporción 10%.

Las condiciones probadas fueron:

Fase estacionaria: Columna Dionex Acclaim 120 5 μ m C18 4.6 x 150 mm.

Fase móvil: Buffer de fosfatos 0.01 M pH=3.3: Acetonitrilo, 70: 30 v/v.

Flujo de 1.5 mL min⁻¹. Longitud de onda: 268 nm. Temperatura Ambiente.

En condiciones isocráticas

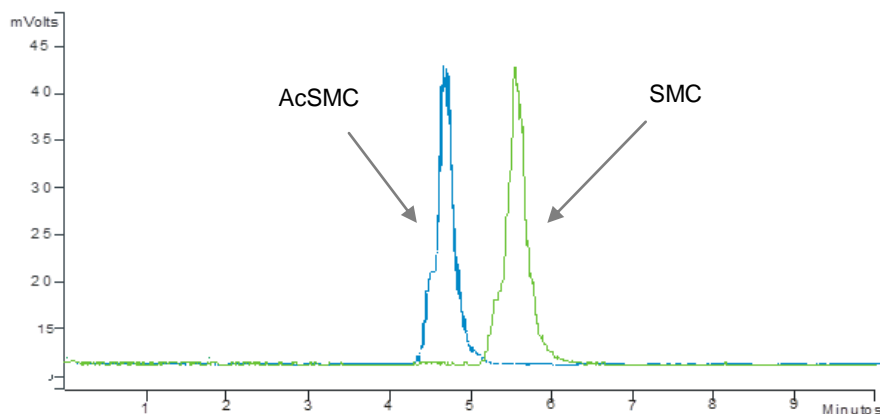


Fig. 9.3 Cromatograma que muestra a los analitos de interés inyectados por separado a una concentración de 10 μ g/mL cada uno, los cromatogramas se presentan en una sola figura bajo condiciones de separación indicadas en el texto.

Del cromatograma anterior podemos observar que la disminución de la fase orgánica mejoro la separación de los picos ($\alpha=1.27$) aunque aumento el factor de coeio de Sulfametacina Tf =0.86 (con valores de $T_r= 5.84$ min, $T_r'=5.23$ min $k= 8.57$) y de Acetilsulfametacina Tf=0.81 (con valores de $T_r= 4.70$ min, $T_r'=4.09$ min, $k= 6.70$), quizás a

que la columna en la que se están probando las condiciones de separación no es nueva, por lo que se puede pensar que la fase estacionaria ha perdido resolución o quizás las condiciones en las que se mantuvo almacenada no fueron las adecuadas, con el mismo efecto, pérdida de resolución.

En el siguiente cromatograma se muestra la señal de un pool de 5 muestras blanco de orina 1:10 diluida con agua HPLC, Sulfametacina y Acetilsulfametacina en las mismas condiciones que las inyecciones anteriores, con el objetivo de distinguir el comportamiento cromatográfico de la matriz biológica bajo las condiciones de separación de Sulfametacina y Acetilsulfametacina

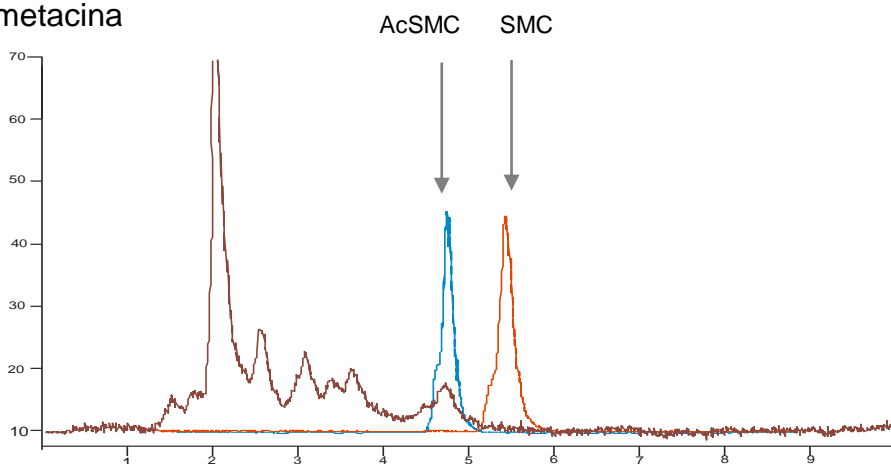


Fig. 9.4 Cromatograma que muestra a SMC, AcSMC ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) y pool de orina (dil 1:10) todas inyectadas por separado, los cromatogramas se presentan en una sola figura con la finalidad de observar las señales o interferencias de la orina que se encuentran a los mismo tiempos de retención que la SMC y AcSMC.

De manera general, cuando aumenta la proporción de la fase orgánica, disminuyen los tiempos de retención de los analitos y mejoran las formas de los picos, por lo tanto un cambio ligero en el porcentaje de ACN quizá nos permita una mejor resolución de los picos cromatográficos. En esta prueba se decidió el cambio de la columna, debido a que la anterior no permitía una buena resolución de los picos, que se expresaba en una cierta deformación en la base de los picos. La columna que se estaba utilizando es Dionex Acclaim 120 C18 $5\mu\text{m}$ 4.6×150 mm y se cambió por una columna Grace Prosphere HP C18 AQ $5\mu\text{m}$ 4.6×250 mm.

Las condiciones probadas se mencionan a continuación:

Fase estacionaria: Columna Grace Prosphere HP C18 AQ $5\mu\text{m}$ 4.6×250 mm.

Fase móvil: Buffer de fosfatos: Acetonitrilo 75:25 (v/v).

Flujo de 1.5 mL min^{-1} .

Longitud de onda: 268 nm. Temperatura Ambiente.

Condiciones isocráticas.

A continuación se muestran los cromatogramas de las inyecciones de los analitos y la matriz o muestra biológica diluida, inyectadas de forma separada, y representadas en una figura como un solo cromatograma.

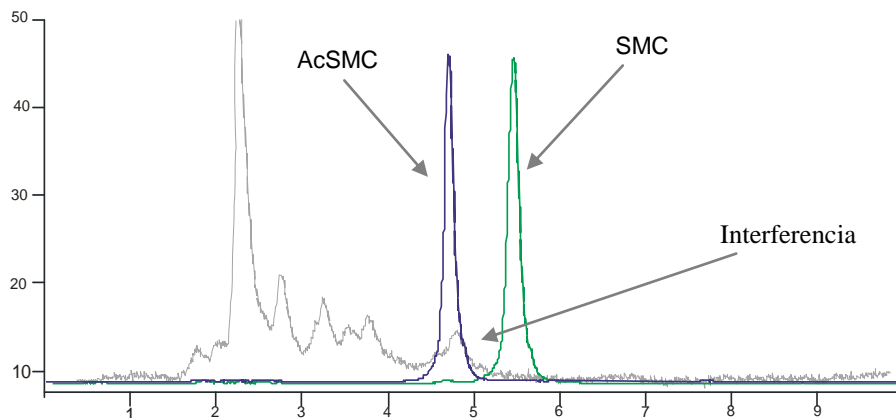


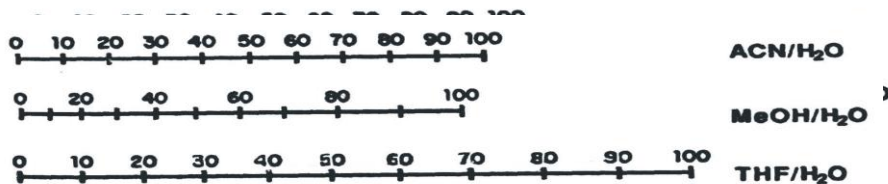
Fig 9.5 Cromatograma que muestra a SMC (verde), AcSMC (azul) a una concentración de $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada uno y pool de orinas (en gris, dilución 1:10) inyectadas por separado y bajo las condiciones cromatográficas mencionadas previamente.

Del cromatograma anterior podemos concluir que estas condiciones son las adecuadas para la separación de la Sulfametacina ($T_r=5.77\text{min}$, $T_r'=5.15\text{min}$, $k=8.30$) y AcetilSulfametacina ($T_r=4.85\text{min}$, $T_r'=4.23\text{min}$, $k=6.82$) con factor de separación de $\alpha= 1.21$, y un factor de coe de Sulfametacina $T_f =1.26$ y Acetilsulfametacina $T_f = 1.18$, así como la simetría que presentan las señales es adecuada, en comparación con las señales mostradas con la columna anterior.

Aunque algunas señales propias del pool de orina en dilución 1:10 se presentan en el mismo tiempo que la Sulfametacina y AcetilSulfametacina, lo cual obliga a desarrollar un método para la extracción de Sulfametacina y Acetilsulfametacina de la matriz biológica.

OBSERVACION: Cuando se logró separar a los analitos, el precio del Acetonitrilo se cuadruplicó, obligando a cambiar a éste por Metanol, que es más barato, por lo cual se volvieron a buscar las condiciones de separación de Sulfametacina y Acetilsulfametacina en las cuales el modificador sea Metanol.

Durante el proceso de modificación de la fase orgánica, podemos basarnos en un gráfico llamado Nomograma, el cual se fundamenta en el estudio de diversos investigadores tales como Snyder y Kirkland, entre otros⁹ para saber cómo afectaba la modificación del porcentaje de solvente orgánico en la fuerza de elusión, así como sus equivalentes con otras fases orgánicas, con lo cual obtuvieron el siguiente gráfico:



En nuestro caso, ya que se utilizó un 25% de Acetonitrilo (ACN) como fase orgánica, se probó cambiar a Metanol entre un 35 y 40% de éste último. Se comenzó probando la mayor proporción que tenemos como probable, entonces las condiciones quedaron de la siguiente manera:

Fase estacionaria: Columna Grace Prosphere HP C18 AQ 5 μ m 4.6 x 250 mm.

Fase móvil: Buffer de fosfatos pH=3.30 \pm 0.01 : Metanol 60: 40 (v/v).

Flujo de 1.5 mL min⁻¹ Longitud de onda: 268 nm. Temperatura Ambiente.

En condiciones isocráticas.

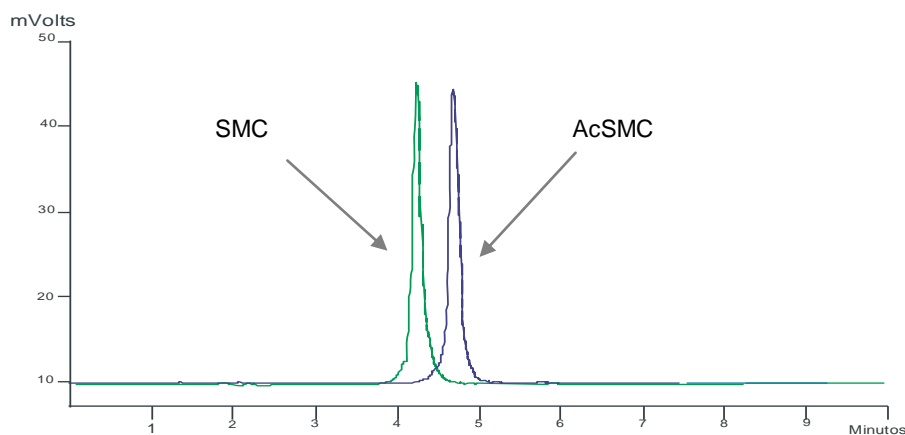


Fig 9.6 Cromatograma que muestra a SMC, AcSMC (10 μ g.mL⁻¹) inyectadas por separado, bajo las condiciones cromatográficas mencionadas previamente, como modificador de la fase móvil al Metanol.

Como podemos observar en el cromatograma obtenido con Metanol HPLC, el orden de retención se invirtió totalmente. Con respecto a la fase móvil con Acetonitrilo, los tiempo de retención eran de AcetilSulfametacina tr = 4.70 min (k= 6.70), y de Sulfametacina tr =5.84min (k= 8.57) con un factor de separación α = 1.27

Cuando se utilizó Metanol, el tiempo de retención de Sulfametacina cambió a $t_r = 4.2$ min y AcetilSulfametacina $t_r = 4.8$ min, presentando T_f Sulfametacina = 1.22 y T_f Acetilsulfametacina = 1.06, además de que el factor de separación disminuyó $\alpha = 1.16$, situación que nos obligó a modificar la proporción del modificador de la fase móvil.

También debemos saber cómo se comportaron los componentes propios de la orina y cuales señales interfirieron en los tiempos de retención de los analítos, así que se procedió a inyectar orina diluida 1: 10 con agua HPLC; el cromatograma correspondiente es la figura 7.

Podemos observar que el cambio de Acetonitrilo a Metanol provocó una separación de las sustancias propias de la orina, mostrándose cuatro señales más definidas en comparación con las señales de orina con la fase móvil anterior, que se encontraban aglomeradas y con tiempos de retención menores.

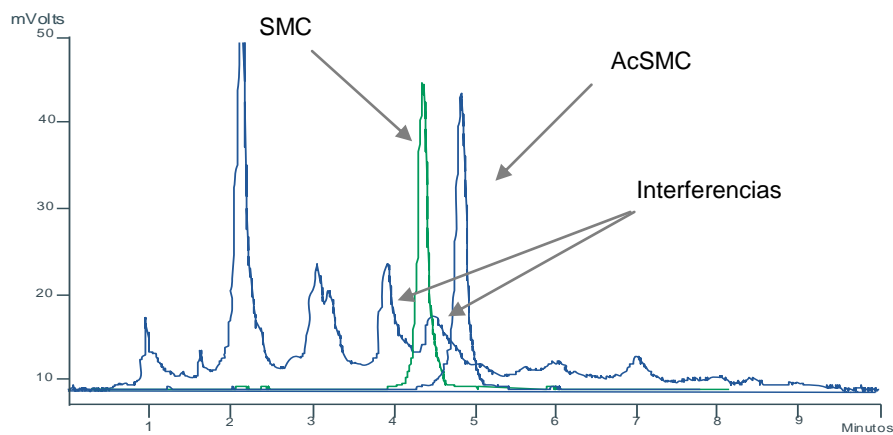


Fig 9.7 Cromatograma que muestra a SMC, AcSMC ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pool de orinas (dil 1:10) inyectadas por separado y presentadas como una figura, bajo las condiciones cromatográficas mencionadas previamente.

Por este motivo se evaluaron nuevas proporciones, para propiciar la reducción de los tiempos de retención de las señales propias de la orina.

Además, el uso de Metanol como modificador de la fase móvil, provocó un aumento en la presión en el sistema de casi mil (1000) psi, en comparación con el solvente anterior y al mismo flujo, por lo que se aplicó temperatura a la columna, comenzando con una temperatura de 30°C , con esto se pretendió a disminuir la viscosidad de la fase móvil y por lo tanto disminuir la presión.

Las condiciones probadas fueron las siguientes:

Fase estacionaria: Columna Grace C18 Prosphere HP C18 AQ $5\mu\text{m}$ 4.6 x 250 mm.

Fase móvil: Buffer de fosfatos $\text{pH} = 3.30 \pm 0.01$: Metanol 65: 35 (v/v).

Flujo de 1.5 mL min^{-1} .

Longitud de onda: 268 nm.

Temperatura 30°C .

En condiciones isocráticas.

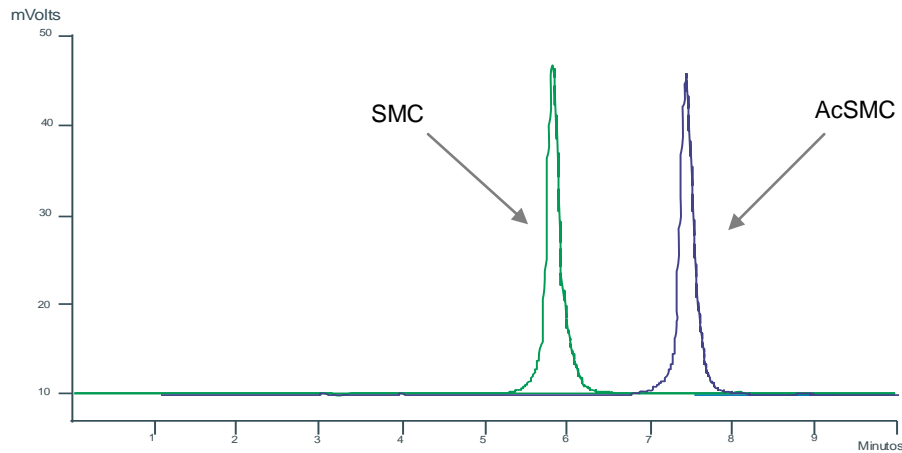


Fig. 9.8 Cromatograma que muestra a SMC, AcSMC ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas, en este caso se aplicó a la columna una temperatura de 30°C .

Disminuyendo un 5% el Metanol de la fase móvil y aplicando temperatura podemos observar que los analítos presentaron los siguientes tiempos de retención: Sulfametacina $t_r = 5.92\text{min}$ ($t_r' = 5.30$ $k = 8.54$) y $T_f = 0.89$, para Acetilsulfametacina $t_r = 7.51\text{min}$ ($t_r' = 6.89$ $k = 11.11$) y $T_f = 0.99$, con un factor de separación (α) de 1.30, valores adecuados para su adecuada separación y posterior cuantificación. La siguiente figura muestra una inyección de pool de orina dilución 1:10 con las condiciones arriba mencionadas.

Se observa que la separación de la Sulfametacina y AcetilSulfametacina es adecuada teniendo un factor de separación de 1.30, pero existe un acercamiento pronunciado de los ruidos de la orina, tomando como referencia a la señal más grande de la orina con acetonitrilo como fase orgánica, ésta modifico su tiempo de retención de 2.1 a 3.1 minutos, con Metanol; algunas señales propias de la orina interfieren en menor grado con los analítos, aun cuando se encuentren más cerca de la Sulfametacina.

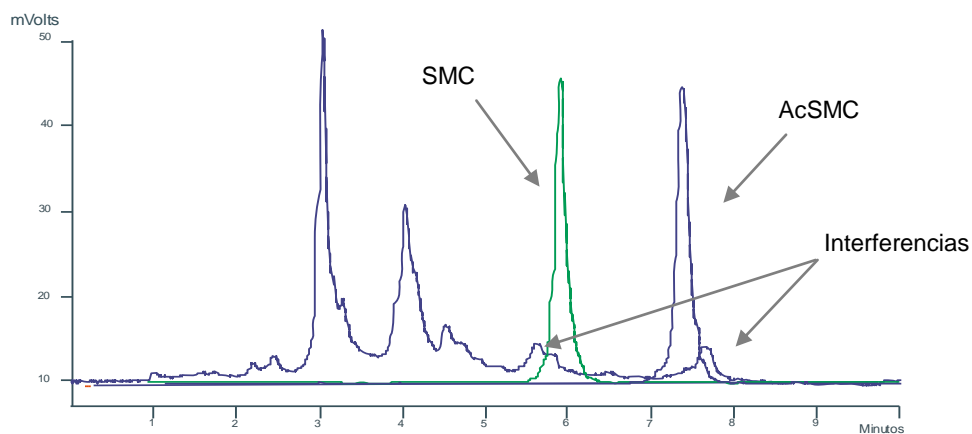


Fig. 9.9 Cromatograma que muestra a SMC, AcSMC ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pool de orinas (dil 1:10) inyectadas por separado y bajo las condiciones cromatográficas mencionadas en el texto.

Se siguieron probando modificaciones en la proporción de Metanol en la fase móvil con la finalidad de mejorar la resolución de los picos cromatograficos.

Las condiciones probadas fueron las siguientes:

Columna Grace C18 4.5 x 150 mm.

Fase móvil: Buffer de Fosfatos pH= 3.30 ± 0.01 , 0.01M: Metanol 63: 37 (v/v).

Flujo: 1.5 mL min^{-1} .

Longitud de onda: 268 nm. Temperatura: 30 C.

En condiciones isocráticas.

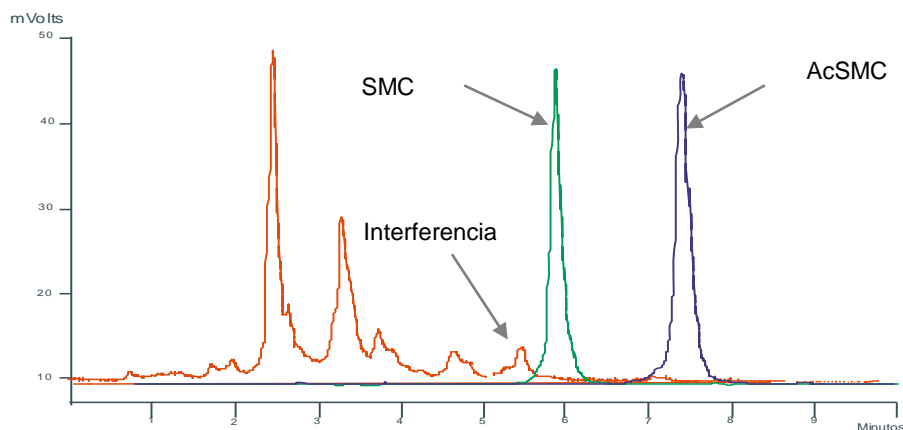


Fig. 9.10 Cromatograma donde se muestra a la Sulfametacina, Acetilsulfametacina ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pool de orina (dilución 1:10) todos inyectados por separado.

Como se puede observar en la figura 10, las interacciones cromatográficas de las sustancias propias de la orina modificaron su t_r , conforme se cambió la cantidad de Metanol en la fase móvil, aun cuando la variación fue del 6% de fase orgánica. También se presentó una ligera modificación de los tiempos de retención de Sulfametacina $t_r=5.83$ min ($t_r'=5.21$ min $k=8.40$) y Acetilsulfametacina $t_r=7.41$ min ($t_r'=6.79$ min $k=10.95$), por lo que se decidió mantener éstas condiciones para la cuantificación de nuestros analitos de interés.

Para Sulfametacina y Acetilsulfametacina presentaron un factor de separación de $\alpha = 1.30$, estando estos parámetros dentro de los valores permitidos.

Así entonces, las condiciones en las que hubo una separación aceptable fueron:

Columna Grace Prosphere HP C18 AQ 5 μ m 4.6 x 250 mm.

Fase móvil: Buffer de Fosfatos pH= 3.30 \pm 0.01 a 0.01M: Metanol 63: 37 (v/v).

Flujo: 1.5 mL min⁻¹

Longitud de onda: 268 nm. Temperatura: 30°C. Condiciones Isocráticas.

9.1.2 Desarrollo del proceso de extracción de analitos de la matriz biológica

Vipin K. Agarwal en su artículo¹⁰ provee una extensa revisión de los métodos de cromatografía líquida para la extracción y determinación de Sulfametacina en diversas matrices y condiciones de trabajo, utilizando mayoritariamente la extracción líquido-líquido como método de procesamiento de las muestras. De este trabajo se obtienen los solventes que se probaron para la extracción de sulfonamidas, tales como: Cloroformo, Hexano, Cloruro de Metileno, y Acetonitrilo. Debido a que nuestra muestra es acuosa, no se pudo utilizar el Acetonitrilo como solvente de extracción, ya que es miscible en la muestra.

Preparación de pool de orina.

Para homogeneizar los posibles ruidos de la orina, se pidió a 5 voluntarios sanos (3 hombres y 2 mujeres), que no estuvieran en tratamiento médico ni haber consumido cafeína ni chocolate en las últimas 24 horas, que proporcionaran una muestra de orina (100 a 200 mL). La preparación del pool de orina consto de mezclar en partes iguales las 5 muestras de orina, centrifugarlas a 3000 rpm, decantar y guardar en refrigeración.

Pruebas de separación cromatográfica.

Se preparó una solución de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Sulfametacina en orina:

Se pesó 0.001 g de Sulfametacina, se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforo con Pool de orina, mezclar en vórtex y depositar en un tubo, rotular y guardar en refrigeración. En los siguientes experimentos no se trabaja con Acetilsulfametacina debido a la escases en el laboratorio de este metabolito y la ausencia en el mercado para su adquisición. Para probar los diversos métodos de extracción se elaboró una dilución 1:10 de la solución de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Sulfametacina en orina:

Se tomó una alícuota de 1.00 mL del pool de orina cargado con SMC y se vertió en un tubo de ensaye, se tomó una alícuota 9.00 mL de agua grado HPLC para al final obtener una concentración de $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SMC.

A partir de esta solución, se aplicaron diversos métodos de extracción líquido- líquido, que se indican a continuación.

Procesos de Extracción de Sulfametacina y Acetilsulfametacina a partir de Orina humana como matriz biológica.

Prueba de Éter Etílico y Cloroformo.

PROCEDIMIENTO:

1. Se tomó una alícuota de 1 mL en un tubo con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Sulfametacina.
2. Se adicionó 1 mL de Éter Etílico, agitar durante 1 minuto y se centrifugó durante diez minutos a 3000 revoluciones por minutos (rpm).
3. Separar y verter en otro tubo la fase orgánica (Éter Etílico)
4. Se repitieron los pasos 2 y 3 por triplicado.
5. Evaporar las fases orgánicas (3 mL en total)
6. A la fase acuosa (orina) se le agregó 1 mL de Cloroformo, agitar durante 1 minuto y centrifugar durante diez minutos a 3000 rpm.
7. Separar y verter en otro tubo la fase orgánica (Cloroformo)
8. Se hicieron los pasos 6 y 7 por triplicado.
9. Evaporar las fases orgánicas (3 mL en total).
10. Las fases orgánicas (3 mL Éter Etílico y 3 mL de Cloroformo) se reconstituyeron con 1 mL de fase móvil (Buffer de Fosfatos $\text{pH} = 3.3 \pm 0.01$ a 0.01M: Metanol 63: 37 v/v), para su posterior inyección por separado y determinar que solvente es idóneo para extraer la Sulfametacina, o para lavar la muestra biológica, evaluando el cromatograma de cada inyección.

Los siguientes cromatogramas son el resultado de los pasos 6 a 9 con extracción con Cloroformo y Éter Etílico (por separado), de una muestra de orina cargada con Sulfametacina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, muestran una señal propia de la Sulfametacina ($t_r = 5.21$)

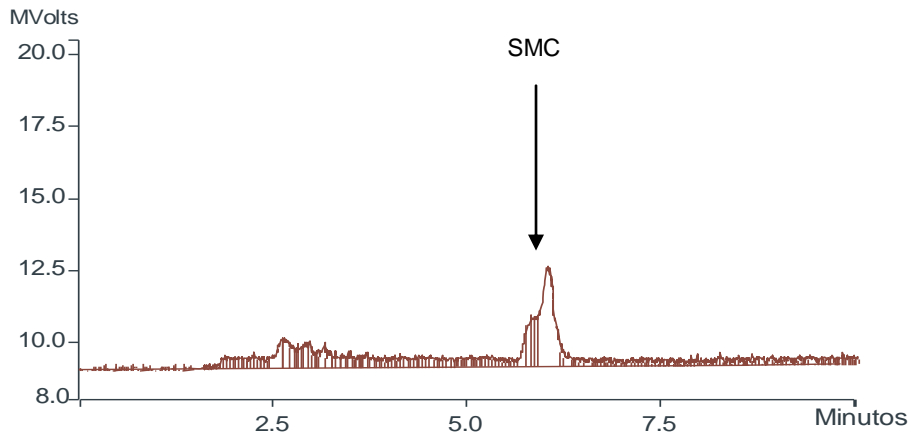


Fig 9.11 Cromatograma que muestra el resultado del proceso efectuado con cloroformo a la orina cargada con $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SMC e inyectado bajo las condiciones de separación adecuadas, el pico presenta un auc de 35.56 mVolts/seg

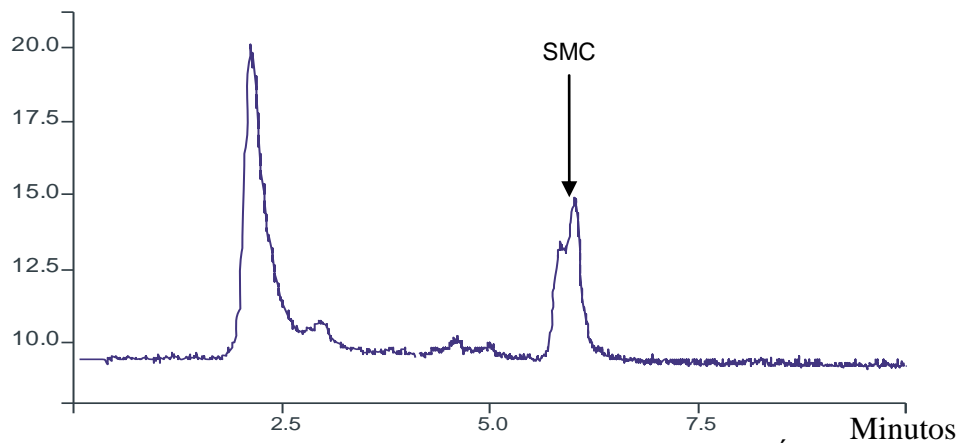


Fig. 9.12 Cromatograma que muestra el proceso de extracción con Éter como se indica en el texto, presentando una señal de 85.02 mVolts/seg

Los siguientes cromatogramas muestran una muestra blanco de orina sin Sulfametacina, a la cual se le aplico el mismo método de extracción indicado en la página 42; también se muestra un cromatograma de la solución de Sulfametacina de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ inyectado directamente sin sufrir el proceso de extracción.

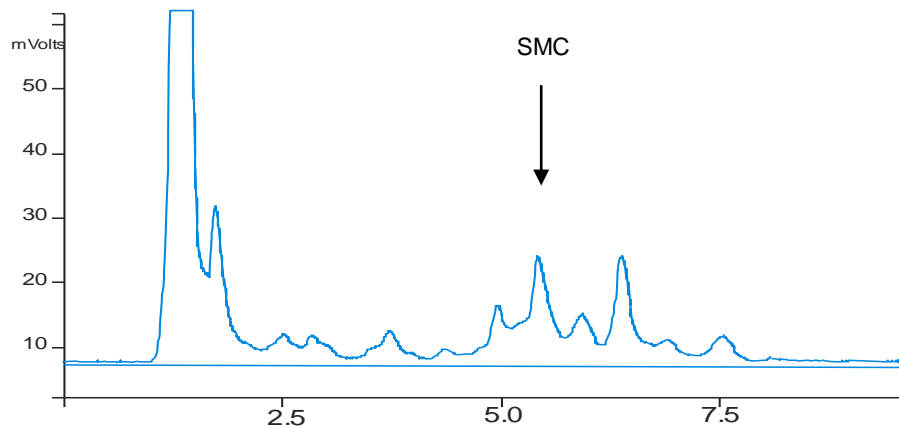


Fig. 9.13 Cromatograma que muestra a la orina blanco y que se le aplico el mismo procedimiento que a la orina cargada.

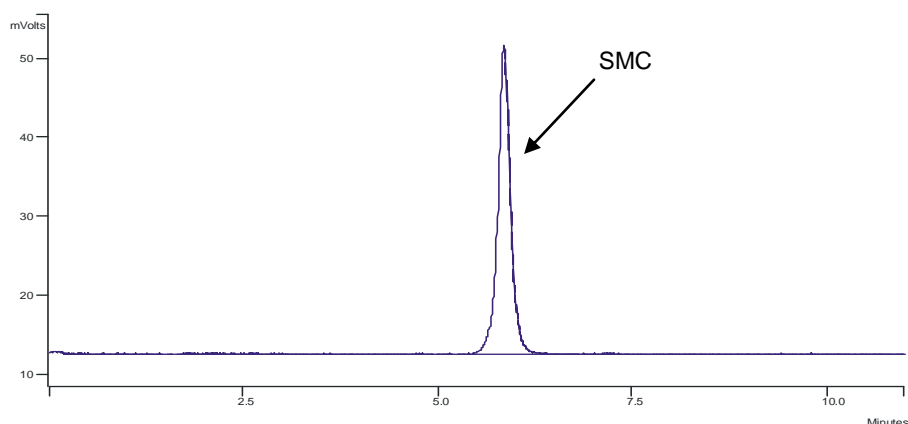


Fig. 9.14 Cromatograma que muestra al Estándar de Sulfametacina a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un área bajo la curva de 495 mVolts/seg

Como se observa en el blanco de orina procesado, existen señales propias de la matriz biológica que se encuentran en los tiempos de retención de Sulfametacina, siendo el método insuficiente para una correcta cuantificación de Sulfametacina.

A partir de estos cromatogramas podemos suponer que la Sulfametacina aún se encuentra en la matriz biológica, ya que ningún solvente en este procedimiento fue adecuado para el proceso de lavado y/o extracción, por lo cual se diseñaron otros experimentos, con los siguientes solventes o mezclas de estos:

Acetato de Etilo, Hexano, Cloroformo, Éter Etilico Tetracloruro de Carbono, Isopropanol.

Antes de continuar con los experimentos programados se tuvo que sintetizar Acetil-Sulfametacina en el Laboratorio de Biofarmacia, debido a que no se logró su adquisición ya que no hubo distribuidores que lo comercialicen. El método de síntesis es el mismo mencionado por Whelpton, Watkins y Curry¹². Para la preparación de soluciones se sigue el mismo método de preparación de soluciones de Sulfametacina indicado en la página 41.

Con algunos de estos solventes las señales de la SMC y AcSMC variaban en sus valores de área bajo la curva, lo cual nos hacía modificar dichos experimentos, agregando un paso de lavado o de extracción y/o aumentando el volumen de los solventes en uso, sin así obtener los resultados adecuados.

En otros experimentos el problema fue que no se lograba eliminar el ruido causado por las sustancias propias de la orina, esto se observó haciendo comparaciones entre los cromatogramas de blancos de orina y las muestras cargadas con los analítos de interés.

Otra estrategia que se aplicó en el tratamiento de la muestra para obtener resultados apropiados, fue el cambio de pH de la orina. Tomando en cuenta que la Sulfametacina tiene dos pKa (2.4 y otro de 7.4) se probaron los pH en los cuales probablemente se viera

favorecido el proceso de lavado con un pH y el proceso de extracción con otro pH de Sulfametacina y su metabolito. Se probaron pH de 3.30, 5.00 y 8.00, en diferentes etapas de los procedimientos. De todos los avances obtenidos en los procesos de extracción y lavado se muestran los últimos dos procedimientos que proporcionan un método de extracción aceptable. Se evaluó el porcentaje de recobro a los métodos de extracción, con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Re cobroSMC} = \frac{(AUC \text{ .Extr .SMC})}{AUCStdSMC} \times 100 \quad \% \text{ Re cobroAcSMC} = \frac{(AUC \text{ .Extr .AcSMC})}{AUCStdAcSM} \times 100$$

Procedimiento con tres cambios de pH.

1. Tomar una alícuota de 1 mL de orina diluida 1:15 ajustado el pH igual a **8.00** en un tubo con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Sulfametacina, el ajuste de pH se hace con NH_4OH .
2. Agregar 2 mL de Hexano: Éter Etílico 85:15(v/v), agitar durante 30 segundos y centrifugar durante diez minutos a 3000 revoluciones por minutos (rpm). Separar y desechar la fase orgánica.
3. Hacer el paso 2 por duplicado.
4. Ajustar el pH de la fase acuosa a **5.00** con HCl 0.5 N.
5. A la fase acuosa se le agregaron 2 mL Hexano: Éter Etílico de 95:5 (v/v), agitar durante 1 minuto y centrifugar durante diez minutos a 3000 rpm. Separar y desecharla fase orgánica.
6. Ajustar el pH de la fase acuosa a **3.30** con HCl 0.5 N.
7. A la fase acuosa se le agregaron 3 mL de Cloroformo: Isopropanol 90:10, agitar durante 1 minuto y centrifugar durante diez minutos a 3000 rpm. Separar y verter la fase orgánica (Cloroformo: Isopropanol) en otro tubo para evaporar.
8. Hacer el paso 7 por duplicado.
9. Evaporar los 6 mL de Cloroformo:Isopropanol a 65°C hasta sequedad del tubo.
10. La muestra evaporada se reconstituyó con 1.0 mL de fase móvil para su posterior inyección.

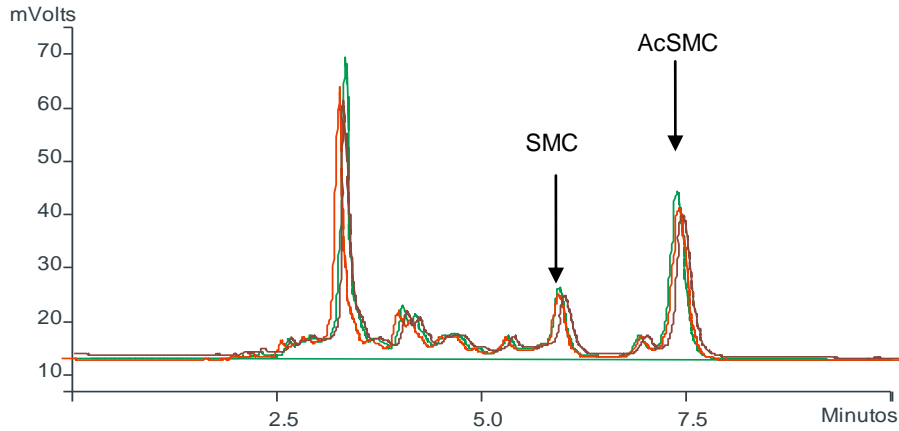


Fig.9.15 Cromatograma que muestra a la orina tratada con el procedimiento antes mencionado, por triplicado

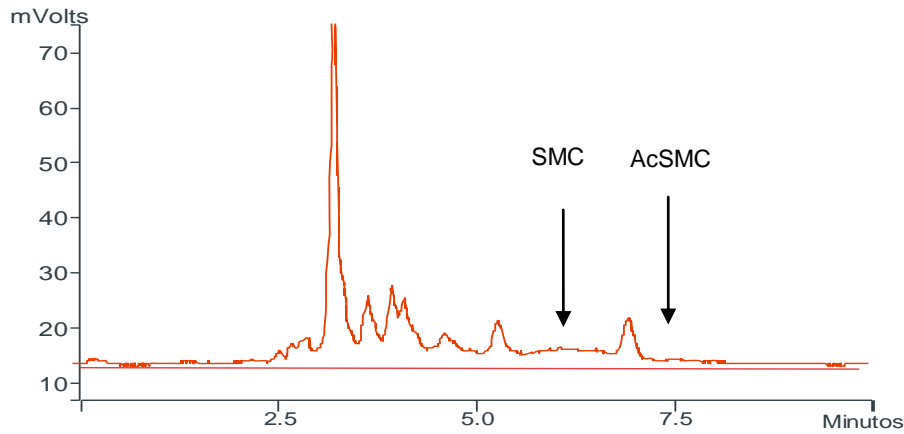


Fig. 9.16 Cromatograma que muestra a la orina blanco procesada de la misma forma que las muestras cargadas con SMC y AcSMC $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

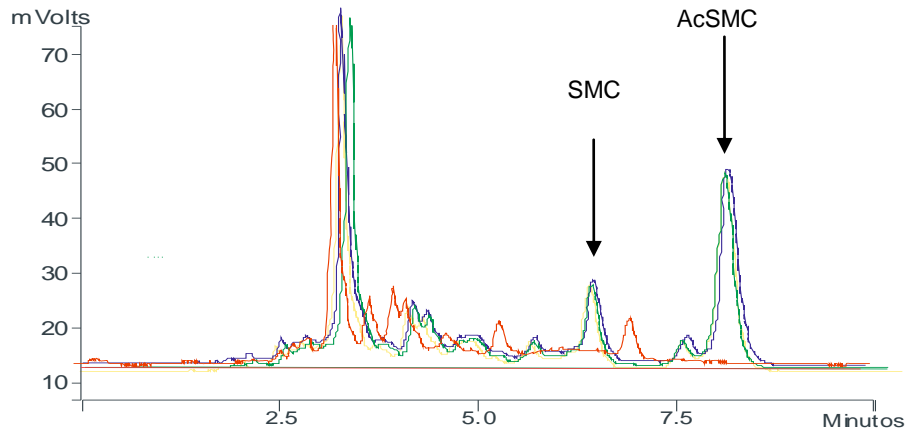


Fig. 9.17 Cromatograma que muestra a la orina blanco (en rojo) y a las extracciones efectuadas con cloroformo: Isopropanol (en azul y verde).

AUC SMC (mVolts/seg)	AUC SMC (mVolts/seg) Extracción	% Recobro	AUC AcSMC (mVolts/seg)	AUC AcSMC (mVolts/seg) Extracción	% Recobro
495	226	45.65	507	457	90.13

Tabla 1. Resultados de recobro de Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC)

En la tabla 1 podemos observar que el proceso de lavado por duplicado, en combinación con los cambios de pH, permitieron la eliminación de ciertas señales próximas a la SMC, ahora el reto está el recobro (> 50%) de las sustancias de interés, en el caso de la Sulfametacina se logró recobrar aproximadamente 45%, y para la Acetilsulfametacina se recobró un 90%.

En el procedimiento siguiente se suprimió el cambio de pH = 5.00, porque quizá este pH propicia que se lleve un poco de SMC en el proceso de lavado subsecuente y se aumentó a 4 mL el volumen de extracción con Cloroformo: Isopropanol.

Procedimiento:

1. Tomar una alícuota de 1 mL de orina diluida 1:15 con un pH= **8.00** en un tubo con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Sulfametacina y $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Acetilsulfametacina.
2. Agregar 2 mL de Hexano:Éter Etilico 85:15(v/v), agitar durante 30 segundos y centrifugar durante cinco minutos a 3000 revoluciones por minutos (rpm). Separar y desechar fase orgánica (Hexano:Eter Etilico)
3. Hacer el paso 2 por duplicado
4. A la fase acuosa se le agregó 2 mL Hexano: Éter Etilico de 95:5 (v/v), agitar durante 1 minuto y centrifugar durante diez minutos a 3000 rpm. Separar y desecharla fase orgánica (Hexano: Éter Etilico).
5. Ajustar el pH de la fase acuosa a **3.30** con HCl 0.5 N

6. A la fase acuosa se le agregó 4 mL de Cloroformo: Isopropanol 90:10, agitar durante 1 minuto y centrifugar durante diez minutos a 3000 rpm. Separar y verter la fase orgánica en otro tubo para evaporar.

7. Hacer el paso 6 por duplicado.

8. Evaporar la fase orgánica (8 mL de Cloroformo: Isopropanol) a 65°C hasta sequedad del tubo.

9. La fase orgánica evaporada se reconstituyó con 1.0 mL fase móvil para su inyección.

El volumen de inyección fue de 20 μL

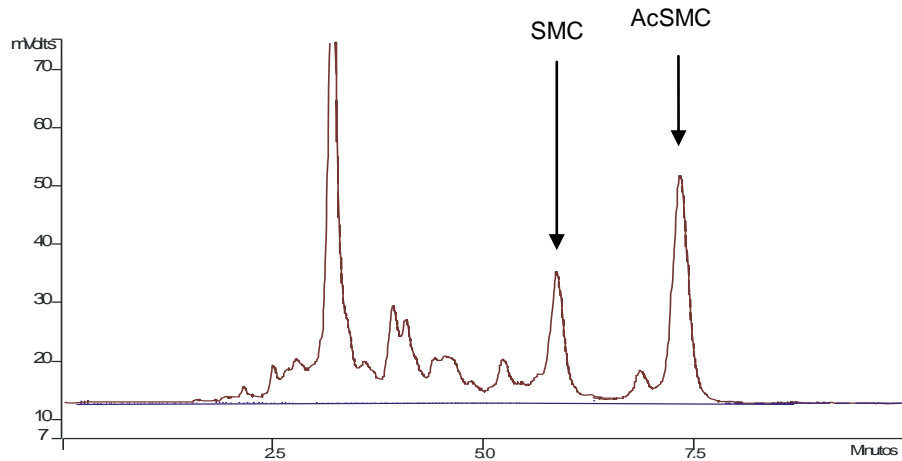


Fig. 9.18 Extracción de SMC y AcSMC de la matriz biológica (orina) con la técnica antes mencionada.

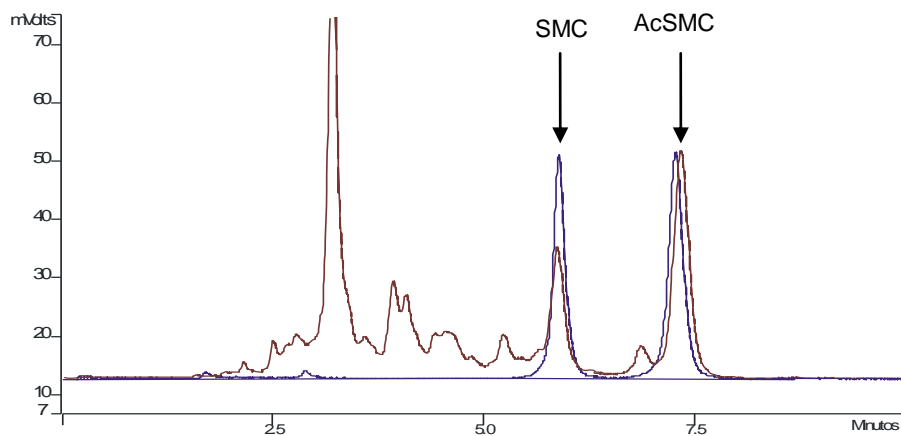


Fig.9.19 Cromatograma que muestra el resultado de extracción de SMC y AcMSC a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno (en café), junto con el cromatograma con estándares de SMC y ACSMC a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno (azul) y sin haber sufrido el proceso de extracción.

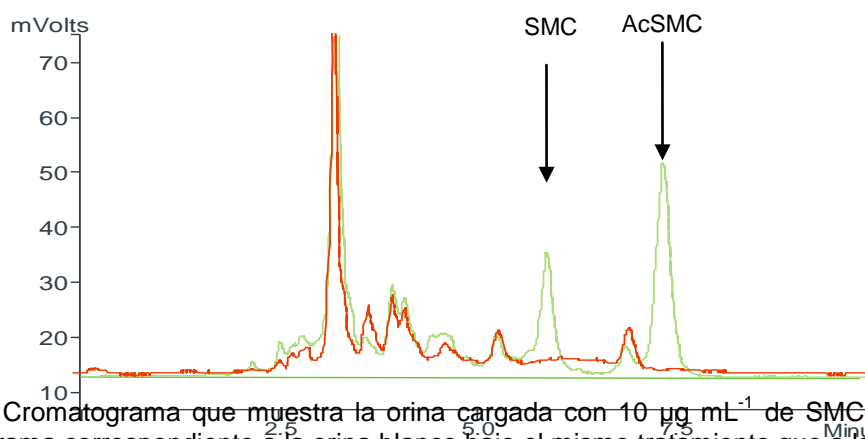


Fig. 9.20 Cromatograma que muestra la orina cargada con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SMC y AcSMC (verde), con el cromatograma correspondiente a la orina blanco bajo el mismo tratamiento que a la orina cargada (rojo).

En este procedimiento los porcentajes de recobro fueron los siguientes:

AUC SMC (mVolts/seg) En solución	AUC SMC (mVolts/seg) Extracción	%Recobro	AUC AcSMC (mVolts/seg) En solución	AUC AcSMC (mVolts/seg) Extracción	% Recobro
495	273	55.15	507	465	91.71

Tabla 2. Resultados de recobro de Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC) del método antes descrito.

Como podemos observar este último procedimiento ha sido el adecuado para extraer de manera apropiada a los analitos de interés.

A continuación, con fines comparativos, se muestran los resultados de las extracciones de SMC y AcSMC con los métodos en las páginas anteriores.

AUC Std SMC (mVolts/seg) En solución.	AUC SMC(mVolts/seg) Extracción	% Recobro	AUC Std ACSMC (mVolts/seg) En solución.	AUC Extracción ACSMC (mVolts/seg) En solución	% Recobro
495	39.10	7.18	N.D ¹	N.D ¹	N.D ¹
495	226.00	45.65	507	457	90.01
495	273.00	55.15	507	465	91.71

¹ No se obtuvieron datos de este analito en estos procedimientos.

Tabla 3. Resultados de recobro de Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC) de los métodos probados durante el desarrollo del método de extracción.

El último método de extracción y detección permite cuantificar a la Sulfametacina y Acetilsulfametacina aun en presencia de las sustancias propias de la orina, siendo este un método selectivo y propuesto como método de extracción final; lo que nos permite continuar con la búsqueda del estándar interno y así comenzar la validación del método analítico.

9.1.3 Elección del Estándar Interno

Las sustancias a probar como Estándar Interno se inyectaran por triplicado bajo las mismas condiciones en las que separo a la Sulfametacina y Acetilsulfametacina, para después inyectarlo junto con los analitos y la matriz biológica, para observar si existe alguna interferencia o interacción entre estos analitos. Se elaboraron soluciones de estos estándares a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$:

Se pesó 0.001 g de cada estándar interno (Sulfadiazina, Sulfaguanidina, Cafeina, Sulfatiazol y Sulfametoxazol), se depositó cada pesada en un matraz volumétrico de 10 mL rotulado adecuadamente y se aforo con Metanol grado analítico, mezclar en vórtex y depositar en un tubo, rotular y guardar en refrigeración. Para evaluar su comportamiento cromatográfico se elaboró una dilución 1:10 de la solución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$:

Se alícuotó 1.00 mL de la solución de y se vertió en un tubo de ensaye, se tomó una alícuota 9.00 mL de agua grado HPLC para al final obtener una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de SMC.

Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

Columna Grace Prosphere HP C18 AQ $5\mu\text{m}$ 4.6 x 250 mm

Fase móvil: Buffer de Fosfatos pH= 3.3 ± 0.01 a 0.01M: Metanol 63: 37 (v/v).

Flujo: 1.5 mL min^{-1}

Longitud de onda: 268 nm Temperatura: 30°C .

A continuación se muestran los cromatogramas de las inyecciones de los analitos a probar.

Sulfadiazina

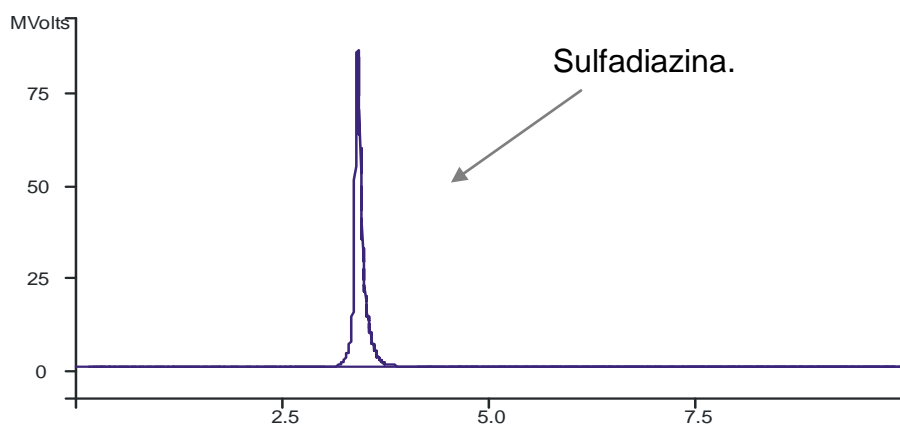


Fig.9. 21 Cromatograma que muestra la inyección de Sulfadiazina a una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se observa que la señal de la Sulfadiazina ($t_r=3.4$ min, $t_r'=2.8$ min.) se encuentra en los tiempos en los cuales se presentan las señales más pronunciadas de la orina (entre 2 y 4 minutos), por lo tanto este analito no califica como Estandar Interno, debido a las interferencias de la matriz biológica.

Se probaron otras sustancias, como Sulfaguanidina, Cafeína, Sulfatiazol y Sulfametoxazol, a continuación los resultados.

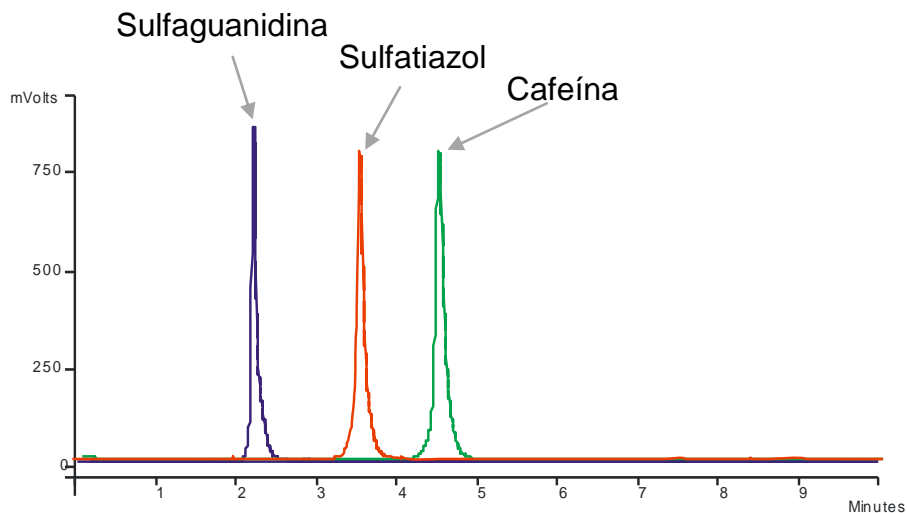


Fig. 9.22 Cromatograma que muestra la inyección de Sulfaguanidina, Sulfatiazol y Cafeína a una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se observa que los tiempos de retención de Sulfaguanidina, Sulfatiazol y Cafeína no se encuentran en el tiempo adecuado para la cuantificación sin interferencias de las sustancias propias de la orina, ya que los tres tienen tiempos de retención menores a 5 min.

Estas sustancias se descartan como estándares internos.

Sulfametoxazol

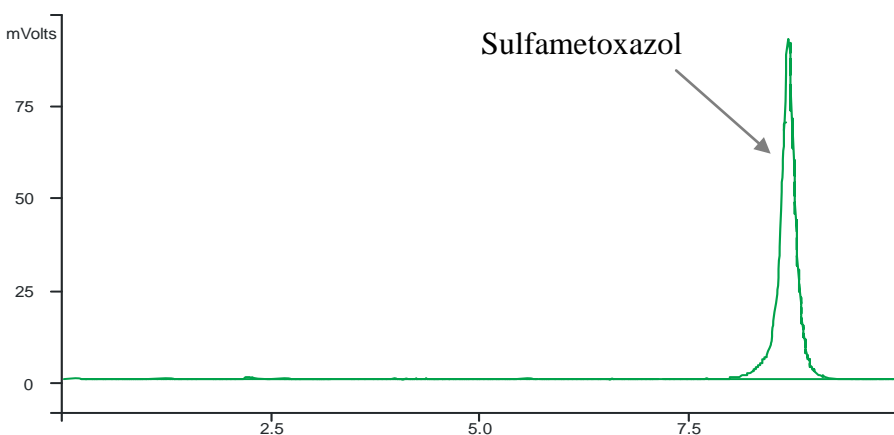


Fig. 9.23 Cromatograma que muestra la inyección de Sulfametoxazol a una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

Sulfametoxazol es el analito que cumple con el tiempo de retención en el cual no interfieren ni las señales de la orina (las señales están entre 2 y 4 minutos) ni existe coelusion con los analitos de interés (SMC $Tr'=5.21\text{min}$ y AcSMC $Tr'=6.79\text{min}$) con valores de $tr=9.85\text{min}$ y $Tr'=9.23\text{min}$. El Sulfametoxazol es una sustancia con propiedades similares a los analitos, a continuación se muestran las principales características de dicho analito.

Sinónimos: Solfisomezol, Sulfametoxizol.

Descripción: Polvo blanco ligeramente amarillo el cual obscurece y se descompone a la exposición a la luz.

Formula empírica: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$

Peso molecular: 253.3

Punto de fusión: $169\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $172\text{ }^{\circ}\text{C}$

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en acetona, soluble en etanol. Se disuelve en soluciones diluidas de hidróxido de sodio y en ácidos diluidos.²⁰

A continuación se muestra un cromatograma que ilustra la inyección de una solución diluida 1:10 con una mezcla de Sulfametacina, Acetilsulfametacina y Sulfametoxazol a una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

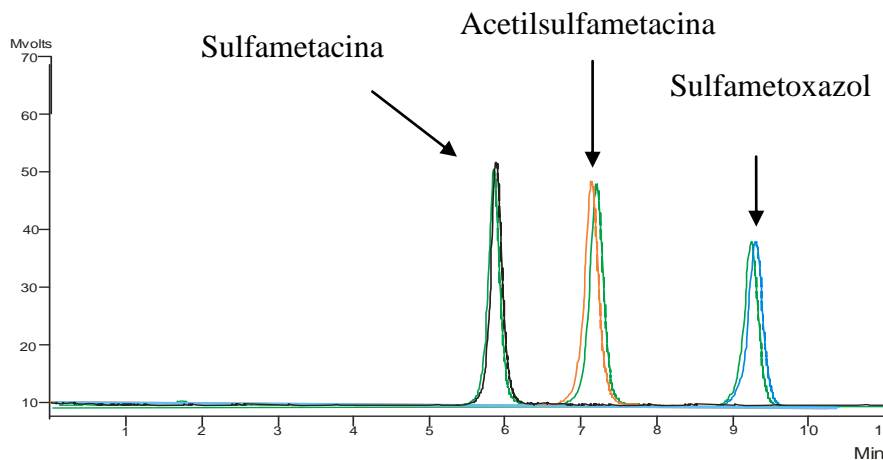


Fig. 9.24 Cromatograma de una inyección de SMC, ACSMC y SMX a una concentración de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ cada una. En verde: mezcla de analitos y estándar interno. Por separado, negro: SMC; naranja: ACSMC y azul: SMC.

Como podemos observar no existe ninguna interferencia ni efecto de arrastre del Sulfametoxazol sobre la Sulfametacina ni la AcetilSulfametacina o viceversa, dando más argumentos para elegir como estándar interno al Sulfametoxazol.

9.2 Inicio de la validación del método analítico para cuantificar Sulfametacina y Acetilsulfametacina en orina humana.

Se elaboraron soluciones de Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC) en Metanol grado analítico, con una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada una.

Se pesaron 0.050 g de Sulfametacina, se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se aforo con Metanol grado analítico, se trasvaso a tubos de 14 mL, se taparon con tapones de goma, se rotularon y refrigeraron hasta su uso.

Se pesaron 0.0500 g de AcSMC, se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se llegó hasta la marca de volumétrico con Metanol grado analítico, trasvaso a tubos de 14 mL, tapar rotular y refrigerar hasta su uso.

A partir de las soluciones arriba descritas se obtendrán las siguientes soluciones con las concentraciones de SMC y AcSMC en soluciones concentradas 3X: 15, 30, 45, 90, 120, 180, 240, 300 y $360 \mu\text{g mL}^{-1}$, las soluciones se harán por separado; las siguientes tablas resumen el procedimiento:

Curva de Calibración en solución 3X $\mu\text{g mL}^{-1}$	Mililitros adicionados de solución primaria SMC $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Volumen final de aforación con Metanol grado analítico.
15	0.375	25
30	0.750	25
45	1.125	25
90	2.250	25
120	3.000	25
180	4.500	25
240	6.000	25
300	7.500	25
360	9.000	25

Tabla 4. Preparación de las soluciones de Sulfametacina que componen a la curva de calibración.

Curva de Calibración en solución 3X ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mililitros adicionados de solución AcSMC de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Volumen final de aforación con Metanol grado analítico.
15	0.375	25
30	0.750	25
45	1.125	25
90	2.250	25
120	3.000	25
180	4.500	25
240	6.000	25
300	7.500	25
360	9.000	25

Tabla 5. Preparación de las soluciones de Acetilsulfametacina que componen a la curva de calibración para este analíto.

Después de aforar los matraces con metanol grado analítico, las soluciones se agitaron en vórtex por aproximadamente 30 seg, se trasvasaron a tubos rotulados y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

A la par se elaboró una solución de Sulfametoxazol (SMX, estándar interno) a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la siguiente manera: Se pesó 0.0100 g de Sulfametoxazol, verter en un matraz de volumétrico de 10 mL, aforar hasta la marca con Metanol grado analítico.

A partir de esta solución se elaboró la solución de trabajo 3X de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la siguiente manera:

Tomar 7.50 mL de la solución de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ SMX y verter en un matraz de volumétrico de 25.0 mL, aforar con Metanol grado reactivo. Se trasvaso a tubos rotulados, se taparon y almacenaron en refrigeración hasta su uso.

9.2.1 Linealidad del método

Se tomaron alícuotas de 5 mL de cada solución de curva de calibración de SMC y AcSMC 3x, junto con 1 mL de la solución de SMX $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, y se depositaron en un tubo rotulado de acuerdo a la concentración alicuotada, se evaporó a 60°C , cuidando que no hubiera ebullición. Cada tubo evaporado se reconstituyó con 1 mL de pool de orina, agitar muy bien y después se diluyó con 14 mL de agua grado HPLC hasta obtener una dilución 1:15 de la muestra de orina, obteniendo así las soluciones con las concentraciones reales en orina que componen a la curva de calibración, es decir: 5, 10, 15, 30, 40, 60, 80, 100 y $120 \mu\text{g mL}^{-1}$, la concentración final del estándar interno es de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Procesar por triplicado.

Teniendo todas las soluciones reconstituidas y diluidas se procesaron con el método de extracción desarrollado, tal como se indica en las páginas 47 y 48. Los resultados se utilizaron para calcular los parámetros de linealidad.

9.2.2 Precisión

Procesar por quintuplicado tres puntos de la curva de calibración de SMC y AcSMC: 10, 40 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (controles bajo, medio y alto, correspondientemente) y cargado con estándar interno SMX $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, se procesó el método de extracción descrito en las páginas 47 y 48. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar del tiempo de retención y del área de ambos analitos.

9.2.3 Selectividad del método

Se calcularon los parámetros cromatográficos que nos indicaron una correcta separación (factor de capacidad k, factor de separación α) y efectividad en el método cromatográfico (factor de coe, asimetría, resolución, platos teóricos). Se utilizaron los datos del experimento de precisión del método, en específico el punto de la curva de calibración de SMC y AcSMC de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (control medio) y cargado con estándar interno SMX $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

9.2.4 Repetibilidad

Se procesó por quintuplicado el punto C2 de la curva de calibración de SMC y AcSMC a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y SMX $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, se aplicó el método de extracción descrito en las páginas 47 y 48. A los resultados obtenidos se le calculó el coeficiente de variación del tiempo de retención y del área de ambos analitos.

9.2.5 Reproducibilidad

Un segundo analista procesó por triplicado las curvas de calibración de la misma forma que se procesó la linealidad del método indicados párrafos anteriores, bajo las mismas condiciones y en los mismos días, evaluando así solo al método analítico y al analista.

9.2.6 Límite de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ).

Estos parámetros de validación se calcularon a partir de los resultados de las curvas de calibración aplicando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = a + 3 S_{y/x} \qquad LOQ = a + 10 S_{y/x}$$

Donde a= ordenada al origen $S_{y/x}$ =error estándar de estimación de y.

9.2.7 Robustez

Las pruebas de robustez se hicieron al tiempo de retención de Sulfametacina y Acetilsulfametacina, ya que las señales propias de la orina se encuentran cerca de los picos de los analitos. Estas interferencias se observan entre 2.5 y 5.0 minutos, por lo cual se hace de particular importancia evaluar las variaciones que pueden afectar el tiempo de retención; cabe recordar las condiciones óptimas de trabajo:

Columna Grace Prosphere HP C18 AQ 5 μ m 4.6 x 250 mm.

Fase móvil: Buffer de Fosfatos pH= 3.30 \pm 0.01 a 0.01M: Metanol 63: 37 (v/v).

Flujo: 1.5 mL min⁻¹

Longitud de onda: 268 nm. Temperatura: 30°C. Condiciones Isocráticas.

Procesar por quintuplicado el punto C2 de la curva de calibración de SMC y AcSMC a 10 μ g mL⁻¹ y SMX 20 μ g mL⁻¹, para cada uno de las siguientes condiciones modificadas:

Porcentaje de Metanol en Fase Móvil: 32% y 42%

Cambio en temperatura de columna: 28 C y 32 C

Variación en la longitud de onda: 266 y 270

Cambio en el pH del Buffer de Fosfatos de la Fase móvil: 2.80 y 3.80

Variación del Flujo de la Fase móvil: 1.0 mL min⁻¹ y 2.0 mL min⁻¹.

9.3 Resultados de la Validación del método analítico

9.3.1 Linealidad del método

Los datos crudos son obtenidos directamente del software Varian workStation v 6,1 incluido en el equipo cromatografico. El cociente analito/estándar interno se calculó en Excel a partir de los datos crudos obtenidos del equipo cromatográfico, con la finalidad de minimizar los errores aleatorios atribuidos al método analítico y de detección¹³. Dichos cocientes se utilizaron después en el paquete estadístico Statgraphics para calcular los parámetros de linealidad. A continuación se muestran los datos crudos y los cálculos en Statgraphics.

Resultados crudos de la curva de calibración compuesta por SMC, AcSMC y SMX (E.I.), la curva de calibración fue elaborada por el analista A.

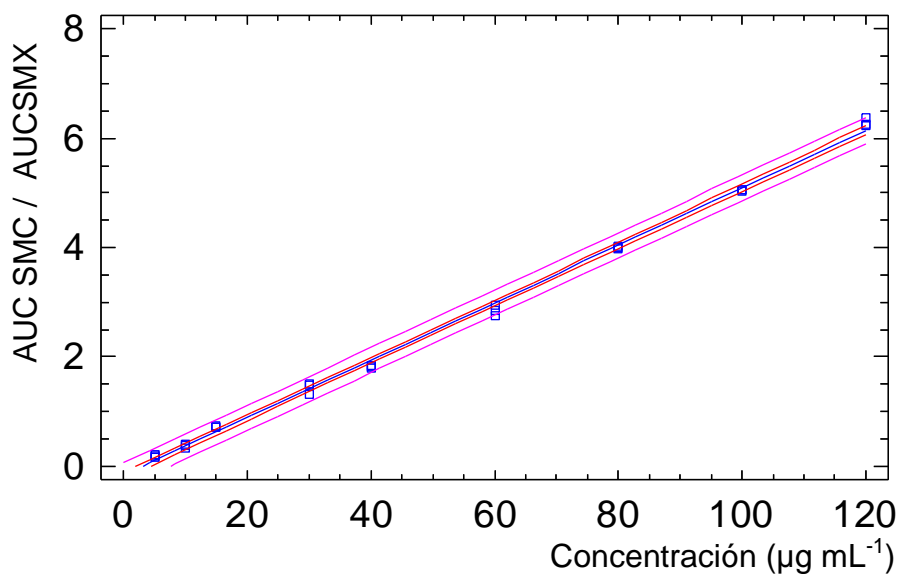
[C]	Área Bajo la Curva (mVolts/seg)			SMC/SMX	AcSMC/SMX
	SMC	AcSMC	SMX		
5	40	70	163	0.2453	0.4294
5	47	77	172	0.2732	0.4476
5	43	66	169	0.2544	0.3905
10	105	288	255	0.4117	1.1294
10	112	298	284	0.3943	1.0492
10	138	311	316	0.4367	0.9841
15	485	717	656	0.7393	1.0929
15	473	700	584	0.8099	1.1986
15	460	661	570	0.8070	1.1596
30	694	1080	533	1.3020	2.0262
30	606	1026	425	1.4258	2.4141
30	722	1092	483	1.4948	2.2608
40	787	1216	425	1.8517	2.8611
40	828	1303	471	1.7579	2.7664
40	821	1289	472	1.7394	2.7309
60	1822	2517	654	2.7859	3.8486
60	1573	2397	594	2.6481	4.0353
60	1466	2352	556	2.6366	4.2302
80	2692	3375	670	4.0179	5.0373
80	2617	3375	655	3.9954	5.1526
80	2783	3520	701	3.9700	5.0213
100	3466	4245	700	4.9514	6.0642
100	3554	4323	714	4.9775	6.0546
100	3222	4179	653	4.9341	6.3996
120	4289	5008	724	5.9240	6.9171
120	4457	5248	749	5.9506	7.0066
120	4603	5290	777	5.9240	6.8082

Tabla 6. Resultados de la Curva de Calibración procesada por el analista A del procedimiento para cuantificar Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC).

En la siguiente grafica se muestra el resultado de la regresión lineal aplicada al cociente de las áreas de Sulfametacina/Sulfametoxazol del Analista "A", mediante el paquete estadístico Statgraphics XV Centurion. Se anexan en esta tabla los resultados del cálculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), obtenidos con las siguientes ecuaciones:

$$LOD = a + 3 S_{y/x} \qquad LOQ = a + 10 S_{y/x}$$

Gráfico de AUC SMC/AUC SMX vs Concentración



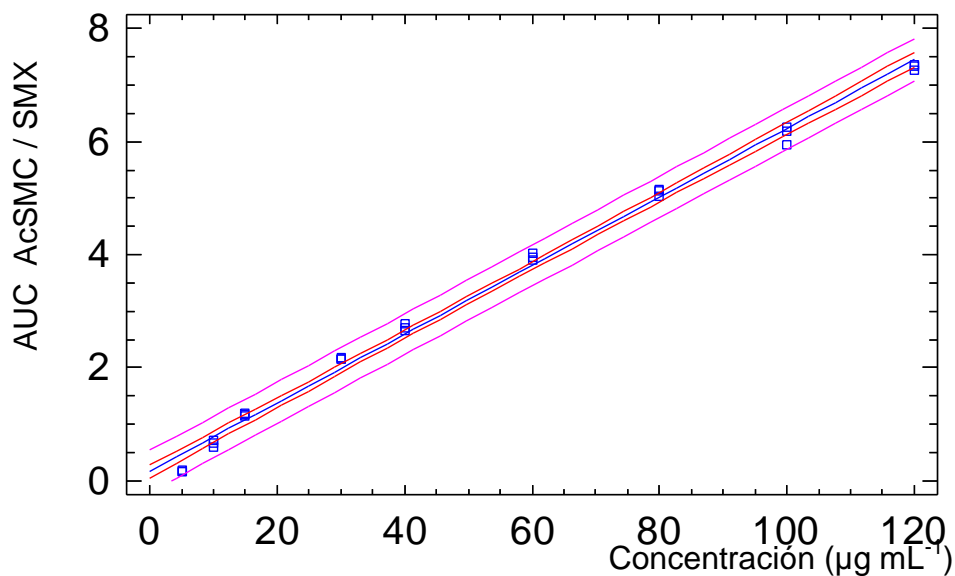
Parámetros:

Ordenada al Origen (a) = -0.1231	Desviación Estándar de a (s _a) =0.0345
	Varianza de a (V _a) =0.0011
Pendiente (b) = 0.0522	Desviación Estándar de b (s _b) = 0.0005
	Varianza de b (V _b) =2.87x10 ⁻⁷
Coef. de Correlación (r) = 0.9987	Coef. de Relación (r ²) = 99.74%
Error std. de estimación (S _{y/x}) = 0.1089	
Límite de Detección (LOD) = 0.1651	Límite de Cuantificación (LOQ) = 0.9246
Promedio =2.5194	Desviación Estándar = 2.1045

Tabla 7. Resultados de los parámetros de la curva de calibración de SMC obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

En la siguiente grafica se muestra el cálculo de la regresión lineal del conjunto de datos de Acetilsulfametacina/Sulfametoxazol del Analista "A", con el mismo software estadístico, también en la tabla se muestran los resultados de los cálculos correspondientes.

Gráfico de AUC AcSMC/SMC Vs Concentración



Parámetros:

Ordenada al Origen (a) = 0.201	Desviación Estándar de a (s_a) = 0.0546
	Varianza de a (V_a) = 0.0029
Pendiente (b) = 0.0587	Desviación Estándar de b (s_b) = 0.0008
	Varianza de b (V_b) = 7.21×10^{-7}
Coefficiente de Correlación (r) = 0.9975	Coefficiente de Relación (r^2) = 99.49%
Error Std de estimación ($S_{y/x}$) = 0.1723	
Límite de Detección (LOD) = 0.6804	Límite de Cuantificación (LOQ) = 1.8871
Promedio = 3.2651	Desviación Estándar = 2.4215

Tabla 8. Resultados de los parámetros de la curva de calibración de AcSMC obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

Resultados crudos de la curva de calibración de SMC, AcSMC y SMX (E.I.), la curva de calibración fue elaborada por el analista “B”.

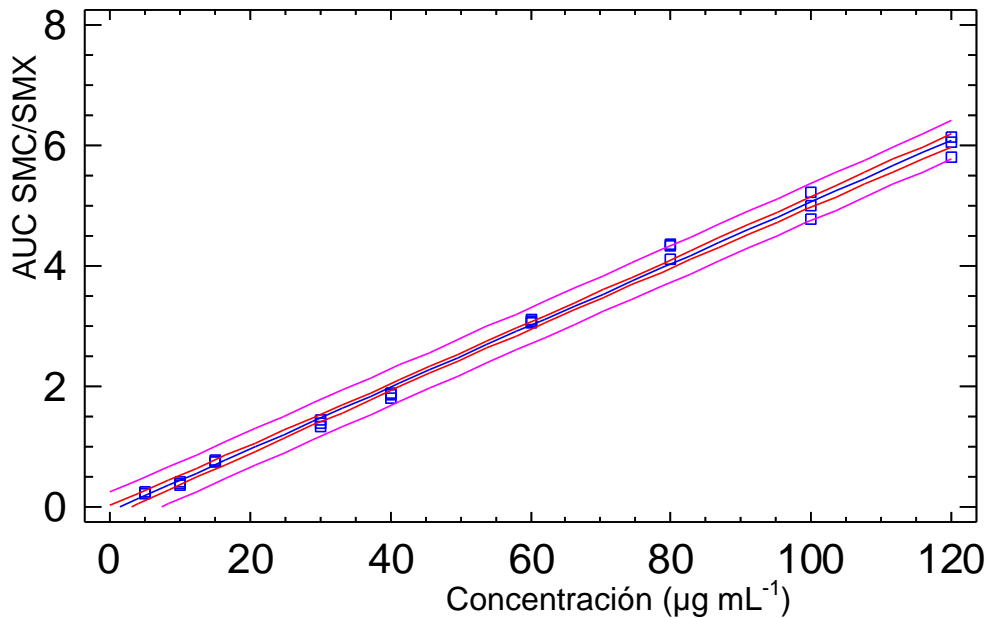
ANALISTA “B”

[C]	Area Bajo la Curva (mVolts/seg)			SMC/SMX	AcSMC/SMX
	SMC	AcSMC	SMX		
5	88	134	417	0.2110	0.3213
5	96	138	430	0.2232	0.3209
5	118	167	455	0.2593	0.3670
10	198	411	497	0.3983	0.8269
10	207	451	509	0.4066	0.8860
10	189	444	521	0.3627	0.8522
15	376	593	503	0.7475	1.1789
15	457	636	581	0.7865	1.0946
15	403	628	547	0.7367	1.1480
30	914	1229	663	1.3785	1.8536
30	965	1280	675	1.4296	1.8962
30	878	1347	661	1.3282	2.0378
40	1213	1596	639	1.8982	2.4976
40	1084	1523	599	1.8096	2.5425
40	1251	1666	676	1.8505	2.4644
60	2032	2584	664	3.0602	3.8915
60	1978	2349	638	3.1003	3.6818
60	2108	2577	686	3.0728	3.7565
80	3032	3489	695	4.3625	5.0201
80	3141	3517	762	4.1220	4.6154
80	3061	3450	707	4.3295	4.8797
100	3524	4344	736	4.7880	5.9021
100	3583	4088	685	5.2306	5.9678
100	3621	4209	724	5.0013	5.8135
120	4308	4914	712	6.0505	6.9016
120	4423	4902	719	6.1515	6.8178
120	4363	4957	751	5.8095	6.6005

Tabla 9. Resultados de la Curva de Calibración elaborada por el analista B del procedimiento para cuantificar Sulfametacina (SMC) y Acetilsulfametacina (AcSMC).

A continuación se presentan los resultados de la regresión lineal de SMC/SMX y AcSMC/SMX del Analista "B", sus respectivos parámetros de linealidad, obtenidos con el programa estadístico Statgraphics XV Centurion. Se anexan los datos de límite de detección y de cuantificación.

Gráfico de AUC SMC/SMX Vs Concentración

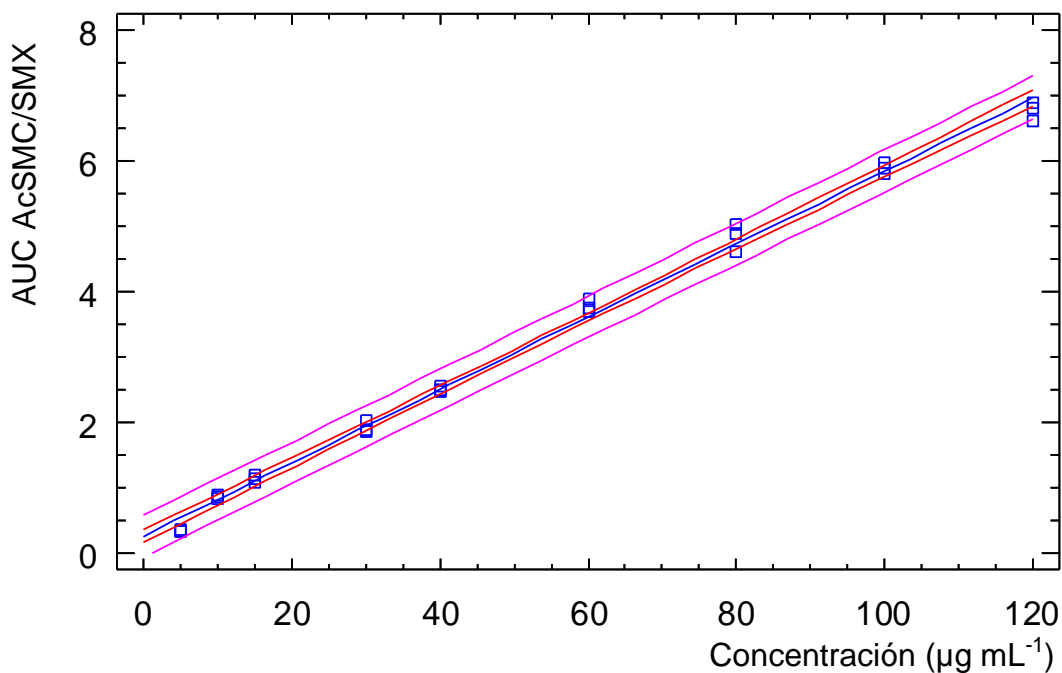


Parámetros:

Ordenada al Origen (a) = -0.0722	Desviación Estándar de a (s_a) = 0.00456
	Varianza de a (V_a) = 2.7×10^{-5}
Pendiente (b) = 0.0513	Desviación Estándar de b (s_b) = 0.0007
	Varianza de b (V_b) = 4.9×10^{-7}
Coefficiente de Correlación (r) = 0.9976	Coefficiente de Relación (r^2) = 99.52
Error Std. de estimación ($S_{y/x}$) = 0.1440	
Límite de Detección (LOD) = 0.3598	Límite de Cuantificación (LOQ) = 1.3678
Promedio = 2.5521	Desviación Estándar = 2.0492

Tabla 10. Resultados de los parámetros de la curva de calibración de SMC obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

Gráfico de AUC AcSMC/SMX Vs Concentración



Parámetros:

Ordenada al Origen (a) = 0.2600	Desviación Estándar de a (s_a) = 0.0475
	Varianza de a (V_a) = 0.0022
Pendiente (b) = 0.0558	Desviación Estándar de b (s_b) = 0.0007
	Varianza de b (V_b) = 4.9×10^{-7}
Coefficiente de Correlación (r) = 0.9978	Coefficiente de Relación (r^2) = 99.56
Error std. de estimación ($S_{y/x}$) = 0.1499	
Lim. de Detección (LOD) = 0.7097	Lim. de Cuantificación (LOQ) = 1.7590
Promedio = 3.1162	Desviación Estándar = 2.2298

Tabla 11. Resultados de los parámetros de la curva de calibración de AcSMC obtenidos mediante el análisis de los datos por el programa estadístico STATGRAPHICS XV.

En las páginas siguientes se presentan los resultados de los demás parámetros de validación del método desarrollado para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina en orina humana.

9.3.2 Selectividad del método

Parámetros cromatográficos que muestran la Selectividad y efectividad del método cromatografico (n=5):

Parámetros	SMC	AcSMC	SMX
Tiempo de retención ajustado (t_r') en min	5.25	7.51	9.23
Factor de Capacidad (k)	6.90	8.91	11.14
Factor de Separación (α)	1.29*	1.25**	N/A
Resolución (R_s)	4.55*	5.10**	N/A
Factor de Coleo	0.99	0.94	1.08
Factor de Asimetría	1.01	0.98	1.2
Platos teóricos	7331	11447	17291

* Entre Acetilsulfametacina y Sulfametacina.

** Entre Sulfametoxazol y Acetilsulfametacina.

9.3.3 Limite de Detección y Cuantificación

Parámetros	Sulfametacina	Acetilsulfametacina
Límite de detección (LOD)	0.1621 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.6804 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de Cuantificación (LOQ)	0.9246 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.8871 $\mu\text{g mL}^{-1}$

9.3.4 Precisión

Sulfametacina

Control (n=5)	Desv. Est. T_r	Desviación Est. AUC
Bajo	0.0508	4.449
Medio	0.0572	3.962
Alto	0.0138	3.701

Acetilsulfametacina

Control (n=5)	Desv. Est. T_r	Desviación Est. AUC
Bajo	0.0616	8.384
Medio	0.0387	5.215
Alto	0.0037	4.919

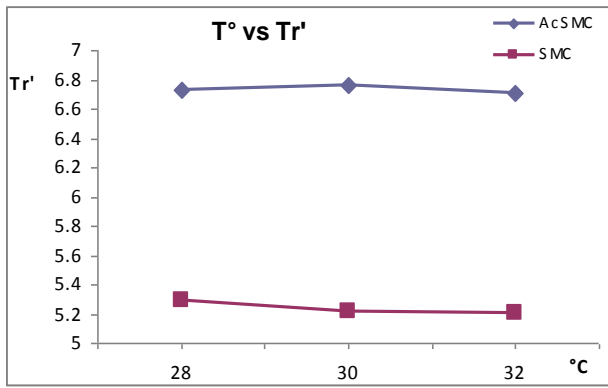
9.3.5 Repetibilidad

Parámetros	Sulfametacina	Acetilsulfametacina
Coefficiente de variación(DER) del t_r (n=5)	0.9685	0.9106
Coefficiente de variación del AUC (n=5)	1.4035	1.1557

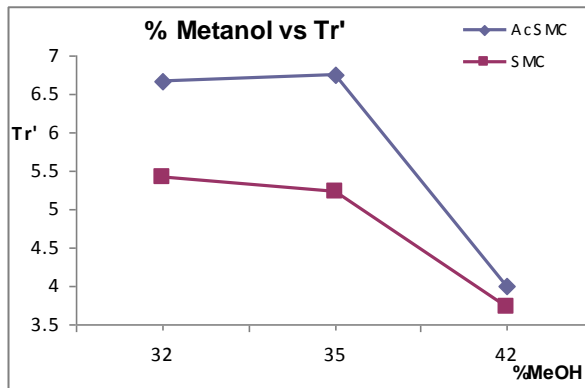
9.3.6 Robustez

Parámetros	T_r Sulfametacina		T_r Acetilsulfametacina	
	32%	42%	32%	42%
Porcentaje de Metanol en Fase Móvil	5.42 min	3.73 min	6.67 min	4.00 min
	28°C	32°C	28°C	32°C
Variación de la Temperatura	5.29 min	5.20 min	6.73 min	6.31 min
	266 nm	270 nm	266 nm	270 nm
Variación de Longitud de Onda	5.22 min	5.22 min	6.77 min	6.76 min
	2.80	3.80	2.80	3.80
Variación del pH del Buffer	3.44 min	5.29 min	3.76	6.83
	1.0 mLmin ⁻¹	2.0 mLmin ⁻¹	1.0 mLmin ⁻¹	2.0 mLmin ⁻¹
Variación del Flujo	5.23 min	5.20 min	6.75 min	6.76 min

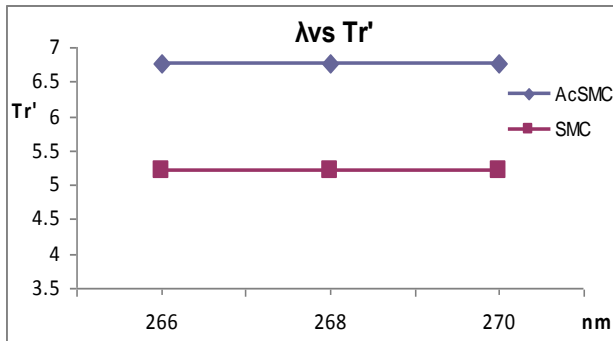
En la siguiente página se muestran las gráficas resultantes de estos experimentos de robustez al tiempo de retención.



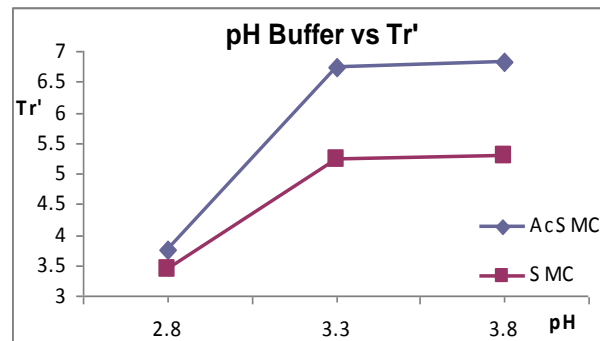
A



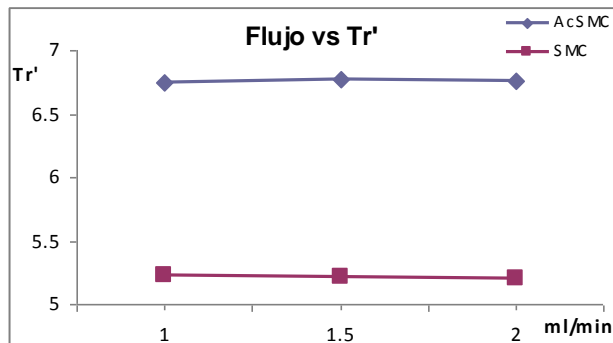
B



C



D



E

Figs. 9.27 Gráficos que muestran las variaciones del tiempo de retención ajustado frente las modificaciones aplicables para probar la robustez del metodo. A Variación de Temperatura, B Variación de Metanol, C Variación de Longitud de Onda, D Variación de pH del Buffer, E Variación de Flujo.

10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Comparación de los promedios de las Curvas de Calibración de Sulfametacina (SMC) de ambos analistas.

Con la finalidad de dar certeza estadística, se deberán contrastar los datos de ambas curvas de calibración y así obtener información veraz de que tan confiable son los datos del método desarrollado cuando se lleva a cabo por dos analistas²¹. El tipo de evaluación aplicado en este estudio, basado en una prueba de hipótesis, es la comparación estadística del promedio de dos curvas de calibración mediante la prueba t. Los datos utilizados para estos análisis son los promedios del ajuste de Sulfametacina (SMC/SMX) y el ajuste de Acetilsulfametacina (AcSMC/SMX).

Prueba para la media y la varianza de la curva de calibración de Sulfametacina.

Hipótesis planteadas:

H₀: Los promedios de ambas curvas de calibración para SMC de los dos procedimientos de los analistas son iguales.

$$H_0: \bar{x}_A = \bar{x}_B$$

H_A: Los promedios de ambas curvas de calibración para SMC de los dos procedimientos de los analistas son diferentes.

$$H_A: \bar{x}_A \neq \bar{x}_B$$

Datos:

SULFAMETACINA

	<i>Analista "A"</i>	<i>Analista "B"</i>
Media de la curva de cal.	2.5194	2.5521
Varianza	4.4293	4.1993
Numero de Observaciones	27	27

Análisis y Resultados:

Parámetro	Grados de libertad	$\alpha/2$	Valor
F calculado	--	--	1.054
F crítico(dos colas)	26 numerador 26denominador	0.025	2.194
t calculado	--	--	0.057
t crítico(dos colas)	52	0.025	2.007

El cálculo de F se hace para verificar que ambas muestras presentan la misma desviación estándar (relacionado con el error aleatorio²¹) de forma indirecta utilizando en esta prueba a la varianza.

De los resultados obtenidos se concluye que: El valor que se obtuvo de F_{calc} es menor al valor de $F_{\text{crítico}}$, esto indica que hay evidencia suficiente para concluir que las desviaciones estándar son iguales y que ambos métodos tienen el mismo error aleatorio.

Por lo tanto, conociendo que ambas muestras tienen misma desviación estándar, se obtuvo el valor del estadístico de prueba t, teniendo como conclusión:

Ya que $|t_{\text{calc}}|$ es menor a t_{tab} existen pruebas suficientes para no rechazar la hipótesis nula ($H_0: \bar{x}_A = \bar{x}_B$), por lo cual se concluye que las medias de ambas curvas de calibración de Sulfametacina son estadísticamente iguales, con una probabilidad del 95% de certeza.

Comparación de las medias muestrales de las Curvas de Calibración de Acetilsulfametacina (AcSMC) de ambos analistas.

Las Hipótesis de prueba serán las siguientes:

H₀: Los valores promedio de las curvas de calibración de Acetilsulfametacina de los analistas A y B son iguales;

$$H_0: \bar{x}_{Aa} = \bar{x}_{Ba}$$

H_A: Los valores promedio de las curvas de calibración de Acetilsulfametacina de los analistas A y B son diferentes;

$$H_A: \bar{x}_{Aa} \neq \bar{x}_{Ba}$$

Datos:

ACETILSULFAMETACINA

	<i>Analista "A"</i>	<i>Analista "B"</i>
Media de la curva de cal.	3.2651	3.1162
Varianza	5.8641	4.9720
Numero de Observaciones	27	27

Análisis y Resultados:

Parámetro	Grados de libertad	$\alpha/2$	Valor
F calculado	--	--	1.1794
F critico(dos colas)	26 en numerador 26 en denominador	0.025	2.194
t calculado	--	--	0.2351
t critico (dos colas)	52	0.025	2.007

El cálculo de F de Fisher se hace necesario para saber si las desviaciones estándar de ambas Curvas de Calibración son estadísticamente iguales. Por lo tanto se deduce:

El valor de $F_{\text{calc.}}$ es menor al valor de F_{crit} por lo que ambas desviaciones estándar son estadísticamente iguales.

Después de comprobar estadísticamente que las desviaciones estándar no difieren entre si, se hizo el cálculo del estadístico t; ya que el valor de la t_{cal} es menor a la t_{critico} , se acepta la hipótesis nula, teniendo como conclusión:

Ambos procedimientos para los dos analitos de interés, Sulfametacina y Acetilsulfametacina, tienen un valor promedio estadísticamente igual, indicando que no hay diferencia significativa que pueda invalidar los experimentos de validación, con una probabilidad de que los resultados sean verdaderos de un 95%, cuando dos analistas diferentes efectúan el proceso

11 PRUEBA DEL MÉTODO ANALÍTICO EN MUESTRAS DE VOLUNTARIOS SANOS.

Ya que uno de los objetivos de este trabajo es acercarnos a la estimación del fenotipo acetilador en voluntarios sanos, se aplicó el método desarrollado y validado a muestras de orina, después de la dispensación de 1.0 gramos de Sulfametacina de voluntarios sanos.

Para la prueba del método desarrollado en voluntarios sanos, estos deben cumplir con ciertas condiciones previas al experimento, como son:

1 No estar bajo algún tratamiento médico, ni tomar vitaminas ni complementos alimenticios.

2 No haber consumido alcohol en las últimas 24 horas antes de la prueba, ni refresco de cola, chocolate o te y no hacerlo durante el experimento.

3. Las voluntarias femeninas no deben estar en periodo de menstruación si es que aceptaron participar en el experimento.

4. Recolectar en un envase limpio, una muestra de orina (20 mL aproximadamente) antes de la ingesta del fármaco, para tomarlo como muestra blanco.

5. Después de la ingesta del fármaco se deberá recolectar TODA la orina en un solo recipiente, hasta 8 horas después de la hora de dosificación.

6. Se debe procurar mantener a la muestra y blanco de orina en un lugar fresco y protegido de la luz, para evitar el crecimiento microbiano.

7. Transportar la muestra al laboratorio, protegiéndola de la luz solar.

Hasta el término de este trabajo, la Universidad no contaba con un comité de bioética al cual nos dirigiéramos para la aprobación de este proyecto. Por lo cual solo se tiene en consentimiento de los voluntarios para participar en este trabajo.

En el momento en que los voluntarios nos proporcionaron sus muestras blanco y de análisis, se procedió a procesarlas de acuerdo al método descrito a continuación:

1.- Se tomó una alícuota 5 mL de muestra blanco de cada voluntario a un tubo de ensayo rotulado correctamente y 5 mL de muestra de análisis de cada voluntario en otro tubo rotulado correctamente, centrifugar a 3500 rpm por 10 min.

2.- Trasvasar por decantación a otro tubo rotulado correctamente (blanco y muestra de análisis).

3.- Se tomó una alícuota 1 mL de la solución de SMX $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, en tres tubos para blancos del voluntario y tres tubos para muestra de análisis (6 tubos por cada voluntario) se evaporó a 60°C , cuidando que no hubiera ebullición, para evitar pérdida de estándar interno.

4.- Cada tubo evaporado se reconstituyó con 1 mL de blanco de voluntario o de muestra de análisis según sea el caso, agitar muy bien y después se diluirá con 14 mL de agua grado HPLC hasta obtener una dilución 1:15 de la muestra blanco o muestra de análisis.

5.- Ajustar el pH de cada muestra a 8.00 con Hidróxido de Amonio.

Se continuó el método validado desde el paso 2 al paso 9 descritos en las páginas 47 y 48.

El fenotipo acetilador se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Indice Metabolico} = \frac{\text{concentracion del Metabolito en orina}}{\text{concentracion del Farmaco en orina}}$$

Donde la concentración del Fármaco (SMC) y del Metabolito (AcSMC) se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{concentracion} = \left(\frac{(\text{area ajustada}) - (\text{ordenada al origen})}{\text{pendiente}} \right) \text{factor de dilucion}$$

$$\text{area ajustada} = \left(\frac{(\text{area analito})}{\text{area est.interno}} \right)$$

Ordenada al origen de SMC= -0.1231

Pendiente de SMC=0.0522

Ordenada al origen de AcSMC= 0.201

Pendiente de AcSMC=0.058

Factor de dilución= 15

A continuación se muestran los resultados obtenidos.

ESTUDIO PILOTO CON VOLUNTARIOS

Tabla de Resultados.

VOL.	AUC AMC	AUC AcSMC	AUC SMX	AUC SMC/SMX	AUC AcSMC/SMX	SMC	ACSMC	Índice Metabólico (IM)		Desv. Estd
						Conc. mg	Conc mg	[M]/[F]	Prom.	
A	18.30	1329.00	441.00	0.041	3.014	52.339	704.669	13.464		0.634
	18.20	1320.00	469.00	0.039	2.814	51.567	655.445	12.711		
	18.20	1404.00	453.00	0.040	3.099	51.960	725.864	13.970		
B	45.10	1321.50	406.00	0.111	3.255	72.304	764.329	10.571		0.234
	43.10	1391.00	482.00	0.089	2.886	66.088	673.095	10.185		
	40.20	1252.00	427.00	0.094	2.932	67.444	684.515	10.149		
C	48.10	2763.00	459.50	0.105	6.013	70.467	1446.201	20.523		0.745
	50.00	2594.00	435.00	0.115	5.963	73.411	1433.879	19.532		
	46.20	2866.00	484.00	0.095	5.921	67.820	1423.562	20.990		
D	98.90	1646.00	432.00	0.229	3.810	106.117	901.601	8.496		0.230
	94.20	1744.00	546.00	0.173	3.194	89.933	749.301	8.332		
	89.50	1695.00	489.00	0.183	3.466	92.945	816.574	8.786		
E	144.00	1725.00	374.00	0.385	4.612	150.901	1099.902	7.289		0.325
	136.50	1734.00	409.00	0.334	4.240	136.187	1007.764	7.400		
	129.00	1747.00	388.00	0.332	4.503	135.823	1072.776	7.898		
F	35.10	1077.00	435.00	0.081	2.476	63.584	571.726	8.992		0.502
	39.60	1030.00	451.00	0.088	2.284	65.625	524.248	7.989		
	37.35	1053.50	443.00	0.084	2.378	64.623	547.558	8.473		
G	42.20	389.00	493.00	0.086	0.789	64.992	154.708	2.380		0.031
	44.20	395.00	484.00	0.091	0.816	66.634	161.400	2.422		
	40.20	381.00	475.00	0.085	0.802	64.715	157.936	2.440		
H	41.70	2040.00	505.00	0.083	4.040	64.124	958.319	14.945		0.300
	41.70	2057.50	486.00	0.086	4.234	65.051	1006.264	15.469		
	41.70	2075.00	518.00	0.081	4.01	63.53	949.96	14.95		

Tabla 11.1 Resultados de las muestras de voluntarios despues de la dosificación de Sulfametacina

De acuerdo a los estudios realizados para determinar el fenotipo acetilador, existe una clasificación en base a su índice metabólico¹¹ en metabolizadores deficientes (MD), metabolizadores intermedios (MI), metabolizadores rápidos (MR).

Los valores para la clasificación son los siguientes, para MD el valor es de <3.0, los valores de MI son : 3< MI >9, y para MR valores >9, por consiguiente podemos clasificar a los voluntarios sanos como se muestra en la siguiente gráfica:

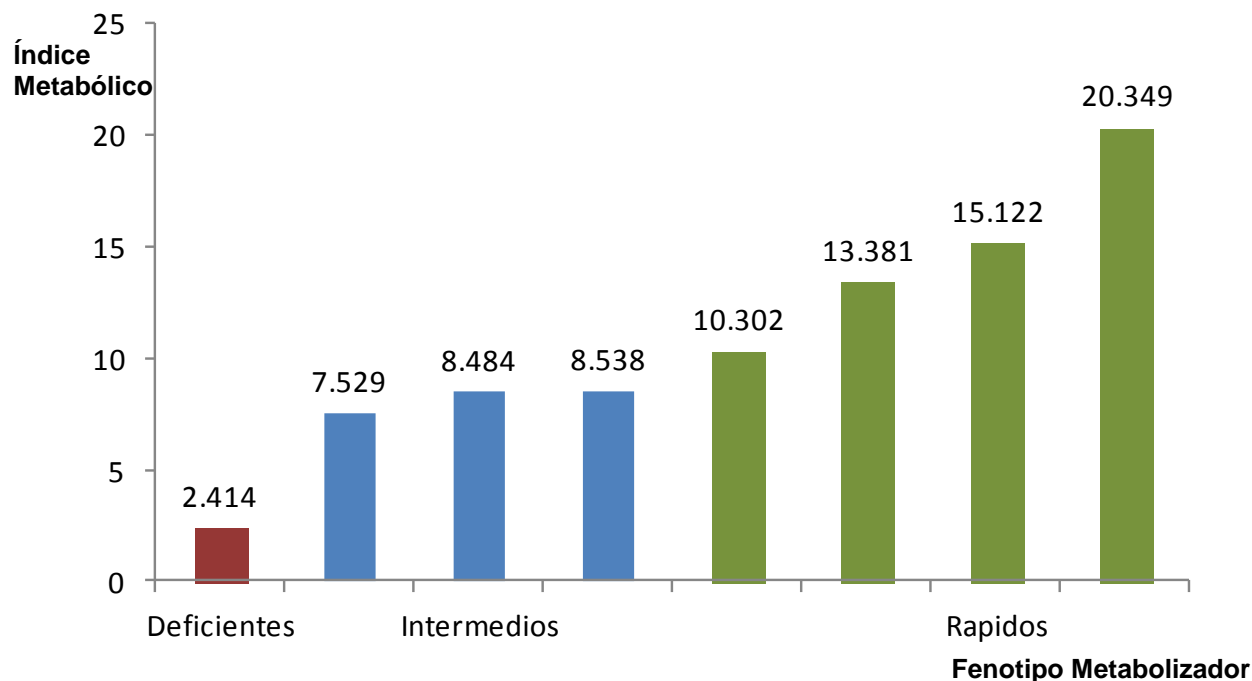


Fig. 11.1 Gráfica que muestra la clasificación del fenotipo metabolizador de los voluntarios sanos en base a su índice metabólico.

De acuerdo a los datos presentados podemos concluir que en los voluntarios de estudio predominan los metabolizadores Rápidos e Intermedios, cabiendo la posibilidad de agrupar a uno de estos (voluntario C con IM =20.349) como metabolizador súper rápido.

Estos datos concuerdan con otros estudios aplicados a muestras de población en diferentes zonas del Continente Americano (Amerindios y Esquimos), con lo cual se mantiene la tendencia de que en la población americana la frecuencia de los metabolizadores rápidos es mayor que la de los metabolizadores deficientes¹⁸.

12 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desarrollo y Validación del Método Analítico

Condiciones Cromatográficas

Durante el desarrollo inicial del método, se seleccionaron una serie de condiciones reportadas en la bibliografía especializada más o menos comunes en el análisis de Sulfonamidas (Fase móvil, columna, longitud de onda, etc.) con las cuales se obtuvieron los primeros cromatogramas y se comenzaron a hacer modificaciones para lograr el objetivo requerido, que es la separación de los analitos. Aun cuando las columnas mencionadas por los diversos reportes se encuentran catalogadas como fase reversa C18, los fabricantes son diversos, debido a que no contábamos con ninguna de las marcas señaladas, empleamos otra columna que también es fase reversa C18.

Por lo cual las modificaciones que efectuaremos serán con respecto a la composición de la fase móvil, tanto el tipo de columna como la composición de la fase móvil son los factores principales que afectan al factor de separación de analitos en el HPLC^{3,4}

Podemos observar que no hubo cambio alguno en el pH del buffer de la Fase Móvil, debido a que en varios artículos y libros mencionan a este buffer como el más utilizado y adecuado para Sulfonamidas y para muchos otros analitos. En cambio, a las demás condiciones se les aplicaron diversas modificaciones, muchas de ellas de manera ordenada y estudiada previamente, y otras obligadas o necesarias por las condiciones, por ejemplo, la aplicación de temperatura para disminuir la viscosidad de la fase móvil que modifica la resolución de los analitos, o el cambio de Acetonitrilo por Metanol, debido al aumento de precio del primero de éstos, obligándonos a buscar de nuevo las condiciones de separación de la Sulfametacina y Acetilsulfametacina.

De los cromatogramas obtenidos de las inyecciones correspondientes a la muestra biológica sola y a la muestra biológica cargada con los analitos de interés, se puede observar que a la muestra se le tuvieron que efectuar procedimientos de lavado y/o extracción de los analitos, ya que ciertas sustancias propias de la muestra (interferencias) impiden la adecuada cuantificación de la Sulfametacina y Acetilsulfametacina.

Procesamiento de la muestra

Con las condiciones adecuadas de separación de ambas sustancias, el siguiente paso fue la búsqueda de los procedimientos para eliminar o en su defecto disminuir lo más posible las interferencias propias de la muestra.

Casi todo tipo de muestra es susceptible a la aplicación de ciertos procedimientos previos al análisis en algún equipo, en el caso de una muestra de orina, se hacen indispensables los procesos de lavado y/o extracción, con el objetivo de disminuir las posibles interferencias que puedan causar las sustancias presentes en la orina.

La búsqueda de los solventes adecuados para el lavado de la muestra biológica y extracción de los analitos de interés a partir de la matriz biológica, se llevó a cabo de acuerdo a los solventes con los cuales se contaba en el Laboratorio de Farmacocinética y Biofarmacia

Para cada procedimiento se obtenían cromatogramas que nos permitían hacer las debidas conclusiones, por, ejemplo, cambiar los solventes, los volúmenes de dichos solventes o sus mezclas, pH, agitación, entre otros.

Validación del Método Analítico

De los análisis estadísticos aplicados a ambas curvas de calibración del método desarrollado para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina, efectuado por dos analistas, podemos observar que no existen diferencias significativas en los parámetros estadísticos que pudieran invalidar el proceso.

También podemos mencionar que el método desarrollado cumple con los requisitos de linealidad, selectividad, Repetibilidad, reproducibilidad entre analistas, robustez y con respecto a los parámetros cromatográficos, podemos observar que los factores de capacidad (k), separación (α), Resolución (R_s), Coleo (T_f) y Asimetría (A_s) se encuentran dentro de los valores aceptables que se encuentran en la bibliografía.^{7, 8, 9.}

Cabe mencionar que en la prueba de robustez, el método cromatográfico es muy sensible a pH ácido del buffer que compone a la fase móvil, aun cuando el cambio es pequeño, por lo cual se tuvo especial cuidado en esta condición.

Estudio Piloto con Voluntarios.

La finalidad de este trabajo fue desarrollar y validar un método por HPLC para determinar Sulfametacina y Acetilsulfametacina en una muestra de orina, en base a ciertos parámetros estadísticos y su comparación del método elaborado por dos analistas, dicho método se aplicó a voluntarios sanos para determinar su fenotipo metabolizador en metabolizadores lentos, intermedios o rápidos, y observar la adecuabilidad del proceso.

13 CONCLUSION

El diseño, desarrollo y validación de un método analítico para determinar Sulfametacina y Acetilsulfmetacina en orina humana como marcadores del Índice Metabólico por la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (o HPLC) se alcanzó con un nivel de confianza aceptable (nivel de significación $\alpha/2=0.025$) para aplicarlo en un estudio bioanalítico con muestras de voluntarios sanos a los cuales se les administro Sulfametacina; dicho esto, el método analítico cumple con los parámetros de validación aplicados y se pudo aplicar a muestras de voluntarios, con lo cual se logró fenotipificar de acuerdo a su índice metabólico.

- Evaluar los resultados obtenidos de las muestras de orina de voluntarios sanos y así fenotipificar a los voluntarios como acetiladores deficientes, intermedios o rápidos.

ANEXO I

Material ocupado para la cuantificación del Sulfametacina y Acetilsulfametacina en orina humana

INSTRUMENTOS Y SOFTWARE

INSTRUMENTO O SOFTWARE	MARCA	VERSION
HPLC VARIAN	VARIAN	PROSTAR 210
UV DETECTOR	VARIAN	PROSTAR 320
SOFTWARE ESTADISTICO STATGRAPHICS	STATGRAPHICS	CENTURION XV

SOLVENTES

SOLVENTE	GRADO	MARCA	LOTE
Metanol	Analítico	Química Meyer	B0908860
Hexano	Analítico	Química Meyer	V0109029
Éter Etilico	Analítico	Honey Well	CX338
Cloroformo	Analítico	Química Meyer	C33C18
Isopropanol	Analítico	Mallinckrodt	03694
Acetonitrilo	HPLC	J. T. Baker	H13C52
Metanol	HPLC	Honey Well	CY496

REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	LOTE
Fosfato dibásico de potasio	J. T. Baker	X06C14
Hidróxido de Sodio	J. T. Baker	9721-03
Ácido Clorhídrico	Golden Bell	2M01368
Ácido Fosfórico	Omnichem	220216

EQUIPO

EQUIPO	MARCA	MODELO
Pipeta automática 1000µL	Jencons Sealpette	CT48339
Pipeta automática 100 µL	Jencons Sealpette	ES28013
Pipeta automática 10- 100 µL	Accumax PRO	127769
Balanza Analítica	Startorius	BP1218
pH metro	Corning	430
Bomba de Vacío	Welch	1400
Parrilla Eléctrica	Thermolyne	SP46925
Centrífuga	LW Scientific	U8V-1
Centrífuga	SolBat	J-500

BIBLIOGRAFÍA

1. Haagsma N., Van De Water C., Rapid determination of five sulphonamides in swine tissue by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, Volumen 333, 1985, pp. 256-261
2. Weber, J. D. and M. D. Smedley. "Liquid Chromatographic Determination of Sulfamethazine in Milk." *Journal Association of Official Analytical Chemists* 72, no. 3, 1989 pp. 445-47
3. Metz, R. Muth, P., Ferger, M., Bolten, W.W., Vergin, H. "Improved determination of sulfadiazine in human plasma by high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, Volumen 729, 1996, pp. 243-249.
4. Malintan, N. T., Mohd, M. A., "Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography*. Volumen 1127, 2006, pp. 154-160.
5. Johannessen J. K., Christiansen, I., Schmidt, D. R. "Simultaneous determination of pyremethamine, sulfadiazine and N-acetyl-sulfadiazine in plasma for monitoring infants treatment of congenital toxoplasmosis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 36, 2005, pp. 1093-1098
6. Van't Klooster G. A. E., Van Seeventer P. B., Kolker H. J. "High performance liquid chromatographic method for the routine determination of sulphadimidine, its hydroxy metabolites and N-4-acetylsulphadimidine in body fluids and cell culture media". *Journal of Chromatography*. Volumen 571, 1991. pp. 157-168.
7. Dong, M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*. 286 p. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2006.
8. Snyder L.R., Kirkland, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 449 p. Ed John Wiley & Sons Inc. 1979.

9. S. Ahuja, M.W. Dong. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, 631 p. Ed. Elsevier, 2005.
10. Agarwal, Vipin K., "High performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs". Revisión de artículo. *Journal of Chromatography A, Volumen 624, 1992, pp 411-423*
11. Berzas Nevado, J.J., Castañeda Peñalvo, G., Guzman Bernardo F.J.. "Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyremethamine by liquid chromatography" *Journal of Chromatography A, Volumen 870, 2000, pp. 169-177.*
12. R. Whelpton G. Watkins, S. H. Curry. Bratton-Marshall and LC Methods Compared for Determination of Sulfamethazine Acetylator Status, *Clinical Chemistry, Vol. 27 No. 11, 1981 pp 1911-1914.*
13. D. A. Skoog, E. J. Holler, T. A. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. 1028 p. Ed. Mc Graw Hill 2001, pp. 12-19, 754.
14. T. E. Beesley, B. Buglio, R. P. W. Scott. *Quantitative Chromatographic Analysis* 394 p. Ed. Marcel Dekker, 2001
15. Gutiérrez Pulido, H. De la Vara Salazar, Román. *Análisis y Diseño de Experimentos*. 545 p. Ed. McGraw-Hill. 2004
16. Masahiro Hiratsuka, Yukinaga Kishikawa, Yoh Takekuma. Genotyping of the N-acetyltransferase 2 Polymorphism in the prediction of adverse drug reaction to isoniazid in Japanese Patient. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 17 (4): 357-362. 2002.

17. Patin, E., Barreiro L. B., Sabeti, P. C., *et al*, Deciphering the ancient and complex evolutionary history of human Arylamine N-Acetyltransferase genes. *American Journal of Human Genetics* 78,423-436, 2006.
18. Jeanes C. W. L., Shaefer, O., Eidus, L. Inactivation of Isoniazid by Canadian Eskimos and Indians. *Canadian Medical Journal*, 106 331-335, 1972.
19. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline for Industry, Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, p 2. 1995
20. British Pharmacopoeia. 5ta Edicion 2004. 11.0 Crown. Version electrónica.
21. Miller J., Miller, F., Estadística y quimiometría para Química Analítica. 360p. Ed Prentice Hall. 2005
22. Calpena A.C., Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. *Farmacología Clínica* 7: 749-758, 2005.
23. Varios Autores. La práctica de la Validación, Colegio de Farmacia. Instituto Politécnico Nacional. 1986.
24. Bernard T.L. Analytical Methods Validation, Pharmaceutical Process Validation. 355 p. Marcel Dekker Inc., New York and Basel. 1984.
25. Snyder L. R., Kirkland J.J., Glajch J.L. Practical HPLC Method Development. 425 p Segunda Edición. Ed Wiley-Interscience, New York, 1997.
26. Quattrocchi, O., Abelaira de Andrazzi, S., Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. 395 p. Ed Artes Graficas Farro. 1992.
27. Varios Autores. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics . Eurachem. Diciembre de 1998.

28 Varios Autores. Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance. Center for Drug Evaluation and Research. FDA. Noviembre de 1994.

29 Ermer, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. J. of Pharm. and Biom. Analysis 24, 755–767. 2001.

30 Ayesh, R., Smith R. L., Genetic polymorphism in human toxicology. Recent. Adv. Clin. Pharmacol. Toxicol. 4, 137-157, 1989.

31 Goldenkova-Pavlova I. V., Brouskin S. A., Abdeev R. M. Comparative Analysis of N-Acetylation Polymorphism in Humans as Determined by Phenotyping and Genotyping. Russian Journal of Genetics, 42, 947–953. 2006.

32 Yang, X., Takeshita, T., Morimoto, K., N-Acetyltransferase Polymorphism and Human Cancer Risk. Envir. Health and Prev. Med. 4, 165-173, 2000.

33 Meyer, U.A. and Zanger, U.M., Molecular Mechanisms of Genetic Polymorphisms of Drug Metabolism. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 37, 269–296. 1997.

Páginas de Internet y versiones electrónicas:

34 www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/pharma.shtml
Accesado el 13 de marzo de 2009.

35 www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/CLK1533.htm
Accesado el 26 de noviembre de 2008.

36 ISO/IEC 17025: 2000 Requisitos generales para la competencia de laboratorio de calibración y ensayo. Versión electrónica