



24 2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN  
METODO ANALITICO POR HPLC  
PARA LA CUANTIFICACION  
DE ALFAMETILDOPA  
EN PLASMA**

**TESIS CON  
SALA DE ORIGEN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:  
FELICITAS GUTIERREZ ROMAN**

**1 9 9 0 .**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

CAPITULO	PAGINA
I.- Introducción	1
II.- Generalidades	4
a) Hipertensión Arterial	5
Terapéutica	8
b) Cromatografía	10
I.- Cromatografía en Fase Normal	18
II.- Cromatografía en Fase Normal Ligada	20
III.-Cromatografía en Fase Reversa	20
IV.- Cromatografía de Intercambio Iónico	24
c) Detectores para HPLC	27
Detector de Absorción Ultravioleta	28
Detector de Fluorescencia	29
Detector Electroquímico	31
d) Teoría de la Detección Electroquímica	33
e) Validación	42
f) Monografía de la Metildopa	49
III.- Desarrollo del Método	60
a) Método por Absorción Ultravioleta	61
b) Método por Fluorescencia	68

c) Método Electroquímico	75
IV.- Validación del Método	88
1) Parte experimental	89
2) Condiciones cromatográficas	89
3) Reactivos	90
4) Preparación de soluciones	90
5) Preparación de curva estándar	91
6) Procesamiento de muestras	93
7) Procedimiento de validación	94
V.- Resultados y Análisis de Resultados	98
1.- Linealidad del Sistema	99
2.- Linealidad del Método	99
3.- Selectividad	106
4.- Precisión del Sistema	111
5.- Concentración Mínima Detectable	112
6.- Exactitud y Precisión del Método	112
7.- Reproducibilidad del Método	117
8.- Estabilidad de la Muestra en Plasma	121
9.- Estabilidad de la Muestra Procesada	124
10.- Tolerancia del Sistema	127
VI.- Conclusiones	130

VII.- Apéndice A

133

VIII.- Bibliografía

135

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Diagrama de los componentes de un cromatógrafo de líquidos.	12
2	Diagrama del empaque de una Columna Cromatográfica.	14
3	Energía de activación	34
4	Esquema de Energía de Distribución	35
5	Estados de una Reacción Electroquímica	38
6	Celda Analítica. Diagrama Eléctrico	41
7	Mecanismo de acción de la Metildopa	54
8	Método de extracción para detección ultravioleta.	67
9	Método de Kwan	69
10	Método de Laverty	73
11	Método de extracción con acetonitrilo y cloroforno.	74
12	Método de extracción para detección electroquímica.	76
13	Método de Ong	82
14	Método desarrollado	87
15	Linealidad del Sistema	103
16	Linealidad del Método	105

<b>FIGURA</b>		<b>PAGINA</b>
17	Selectividad del Método	107
18	Muestra de voluntario sano	109
19	Concentración mínima detectable	114
20	Estabilidad de la muestra en plasma	123
21	Estabilidad de la muestra procesada	126

## INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
1 Formas de Separación utilizadas en la cromatografía de líquidos.	16
2 Areas de aplicación de la cromatografía de líquidos.	17
3 Parámetros mínimos para validar métodos analíticos.	43
4 Criterios de aceptación en diferentes métodos de análisis.	48
5 Variaciones realizadas al método por HPLC, -- utilizando detector ultravioleta.	63
6 Variaciones realizadas al método por HPLC, -- utilizando detector de fluorescencia.	70
7 Variaciones en la cantidad de alúmina utilizada en el método por detección electroquímica.	77
8 Variaciones realizadas al método por HPLC, -- utilizando detector electroquímico y adsorción en alúmina.	79
9 Variaciones realizadas al método de Ong, en -- orden cronológico.	83
10 Modificaciones al método de Ong.	86
11 Linealidad del Sistema	102
12 Linealidad del Método	104



**TABLA****PAGINA**

13	Precisión del Sistema	111
14	Concentración Mínima Detectable	113
15	Exactitud y Precisión del Método	116
16	Reproducibilidad del Método	119
17	Tabla de ANADEV A	120
18	Estabilidad de la muestra en plasma	122
19	Estabilidad de la muestra procesada	125
20	Tolerancia del Sistema	128

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

La hipertensión arterial es una de las enfermedades de mayor prevalencia en nuestra sociedad, ya que por ejemplo, se estima que hay 25 millones de hipertensos en los Estados Unidos de Norteamérica (más del 20% de la población de adultos), es la segunda enfermedad cardiovascular en frecuencia y constituye el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la arteropatía coronaria aterosclerótica. No es una enfermedad exclusiva de la edad, ya que al parecer comienza en una etapa precoz de la infancia, pero aumenta su prevalencia con la edad. La supervivencia está en relación inversa con la presión arterial (26,31).

Existen varios fármacos antihipertensivos, con diferentes mecanismos de acción, entre los que podemos mencionar a los diuréticos, a la clonidina, guanetidina, reserpina, propranolol, etc. Entre estos fármacos se encuentra el del objeto de éste estudio, la alfa-metildopa, que es quizá, el fármaco hipotensor de mayor uso.

Se han reportado a nivel hospitalario, intoxicaciones debidas a la acumulación de alfa-metildopa, sobre todo en niños y ancianos, por lo que

es necesario monitorear el fármaco y de este modo, encontrar una dosificación ideal para evitar acumulaciones.

El objetivo de este trabajo, es el desarrollar un método analítico y validarlo, para que posteriormente sea utilizado en el monitoreo del fármaco en niños y ancianos.

Para cuantificar el fármaco fué necesario desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando un detector electroquímico; éste método requirió ser validado, por medio del diseño de una serie de experimentos, que serán especificados en el transcurso de este trabajo.

## **CAPITULO II**

### **GENERALIDADES**

## GENERALIDADES

Es importante describir algunos de los términos en que se basa este trabajo, por lo que a continuación se procederán a describir dichos términos.

### HIPERTENSION ARTERIAL

La hipertensión arterial se define como la elevación de la presión sanguínea sistólica y/o diastólica, pudiendo ser primaria (hipertensión esencial) o secundaria.

La hipertensión primaria o esencial no está vinculada a una etiología única. Puede ser sólo una desviación cuantitativa del promedio ( más que una alteración cualitativa) y un reflejo de una herencia poligénica de la presión sanguínea.

Algunos autores implican al riñón en la etiología de la hipertensión primaria, pero las observaciones seriadas sugieren en vez de esto, que las anomalías funcionales y estructurales, son consecuencia de la hipertensión.

Las paredes arteriales de los animales y las personas hipertensas contienen más agua y sodio que lo normal, por lo que se puede presentar alguna reducción

de la luz arterial. Aunque esta reducción de la luz puede contribuir a un aumento de la resistencia periférica, no es el mecanismo de acción incitante. No hay pruebas de que la ingestión excesiva de sodio, el stress emocional o la obesidad causen hipertensión, aún cuando cada uno de estos factores pueden agravar una hipertensión preexistente o acelerar la aparición de hipertensión en individuos genéticamente predispuestos.

La hipertensión primaria es asintomática hasta que se desarrollan complicaciones. El vértigo, el rubor facial, el dolor de cabeza, la fatiga, la epistaxis y el nerviosismo no son causadas por la hipertensión sin complicaciones.

La hipertensión secundaria está asociada a enfermedad parenquimatosa renal bilateral (por ejemplo, glomerulonefritis crónica, colagenosis del riñón, uropatía obstructiva, etc.) o a trastornos potencialmente curables, tales como feocromocitoma, hipertiroidismo, coartación de la aorta, vasculopatía renal. También puede estar asociada al uso de contraceptivos por vía oral.

La herencia predispone a la hipertensión, pero los

factores ambientales, neurógenos, humorales y vasculares también interaccionan e influyen sobre la presión sanguínea en grados diversos.

El enfermo hipertenso sin tratar tiene gran riesgo de desarrollar insuficiencia ventricular izquierda, hemorragia cerebral o insuficiencia renal incapacitadoras o fatales en edad temprana.

La hipertensión es el factor de riesgo más importante que predispone a la aterosclerosis coronaria y cerebral.

No hay cura de la hipertensión primaria, pero una terapéutica apropiada puede modificar su curso.

Los pacientes con hipertensión sin complicaciones deben vivir vidas normales, siempre y cuando mantengan su presión sanguínea controlada con medicación. Las restricciones de la dieta deben imponerse sólo para controlar la diabetes mellitus, la obesidad o las anomalías de los lípidos sanguíneos. Con diuréticos, generalmente es innecesaria una dieta pobre en sodio. Se debe alentar a que se realice un ejercicio prudente y se debe desalentar el consumo de cigarrillos para reducir el riesgo de cardiopatía aterosclerótica.



La hipertensión aumenta tanto los peligros maternos del embarazo, como la cifra de mortalidad fetal. Una supervisión prenatal continuada, la restricción del sodio de la dieta y los medicamentos antihipertensivos reducen la mortalidad materna, pero no la fetal (31).

### TERAPEUTICA

La acción antihipertensiva de los diuréticos parece deberse a una modesta reducción del volumen plasmático y a una disminución de la reactividad vascular, mediada posiblemente por desplazamiento de sodio desde la localización intracelular a la extracelular.

Si los diuréticos no controlan adecuadamente la hipertensión deben añadirse: metildopa 250 mg. 2 veces al día a 500 mg. 4 veces al día, o clonidina 0.1 a 1.2 mg. 2 veces al día o reserpina 0.25 mg. por día. Se prefiere metildopa porque sus efectos secundarios son mejor tolerados. La reserpina causa congestión nasal, lasitud, somnolencia y depresión y puede activar una úlcera péptica. Deprime el sistema nervioso simpático tanto en su aspecto central como periférico. La clonidina causa somnolencia que muchas veces es persistente, sequedad en la boca, siendo las dos cosas

molestas. La supresión súbita de la clonidina va a veces acompañada de un "rebote hipertensivo". La clonidina reduce la presión sanguínea por estimular los alfa-receptores del centro vasomotor del cerebro. La somnolencia inducida por la metildopa suele desaparecer al cabo de 3 ó 4 días. La metildopa puede causar hipotensión ortostática e impotencia, pero no con tanta frecuencia como la guanetidina. Son efectos secundarios poco frecuentes la fiebre medicamentosa y las anormalidades de las pruebas de función hepática. Aproximadamente un 15% de los pacientes que reciben metildopa desarrollan una prueba de Coombs directa positiva, pero es extremadamente rara una anemia hemolítica.

En la hipertensión moderada, suele ser aconsejable iniciar la terapéutica con un diurético por vía oral y depresor simpático ( por ejemplo, metildopa, clonidina, reserpina o propanolol) simultáneamente. En la hipertensión grave, la terapéutica debe comenzar con un diurético oral y guanetidina simultáneamente, añadiéndose metildopa si fuera necesario.

Una de las sustancias que interfieren con la acción de los antihipertensivos, son los antigripales que contienen aminas simpaticomiméticas (28,32).

## CROMATOGRAFIA

La cromatografía se define como la migración diferencial de los componentes de una mezcla, en base a sus diferentes velocidades de migración, a través de una fase estacionaria, cuando son arrastrados por una fase móvil.

La fase estacionaria puede ser: sólida ó líquida

La fase móvil puede ser: líquida ó gaseosa

Cualquier método cromatográfico incluye cuatro pasos:

1. "Unión" de la o las sustancias a la fase estacionaria.
2. Separación de las sustancias entre sí.
3. Recuperación de las sustancias por su elución progresiva.
4. Análisis cualitativo y/o cuantitativo de las sustancias ya separadas.

La cromatografía es un método de separación de mezclas químicas (principalmente orgánicas) en sus componentes individuales. Esta es una técnica de separación, no una técnica de identificación. En contraste la espectrofotometría puede identificar la presencia de moléculas específicas en la mezcla, sin

embargo, ésta habilidad de proveer información cuantitativa exacta es limitada cuando la muestra está formada por componentes de estructura química similar, pues esta técnica no puede separar los componentes. Por ésta razón la cromatografía de líquidos se encuentra frecuentemente unida con la espectrofotometría.

La muestra a ser analizada, es disuelta en un solvente adecuado (idealmente este solvente es idéntico a la fase móvil) e introducida, por medio de una inyección, con destino a la cabeza de la columna. La muestra es acarreada a través de la columna por un flujo continuo de la fase móvil proveniente de la bomba. En la figura No.1 se muestra un diagrama de los componentes de un cromatógrafo de líquidos.

Algunos componentes de la muestra pasan a través de la columna más lentamente que otros. Aquellos componentes que son más retenidos en la columna son de este modo separados, por el tiempo en que eluyen al final de la columna. Un detector monitorea los componentes cuando emergen del final de la columna. El detector transmite señales a un registrador, que traza el cromatograma en una carta, el cual provee de la información cualitativa y cuantitativa de la muestra.

La separación ocurre en una columna limitada.

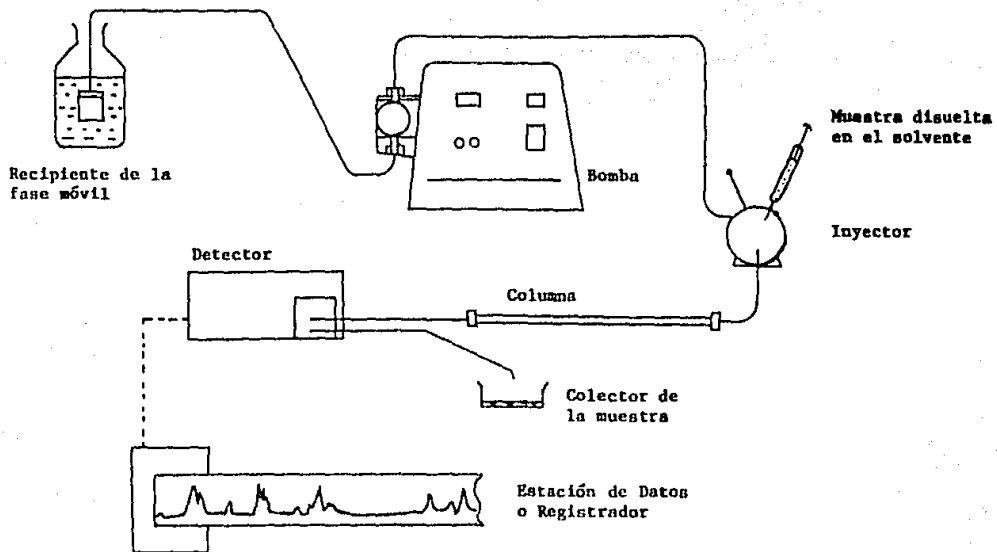


Figura N° 1. Diagrama de los componentes de un Cromatógrafo de Líquidos.

estrechamente empaçada con pequenas partículas s3lidas (ejemplo, silicagel), citada como material de empaque. La retenci3n es generalmente condicionada por el tipo de material de empaque.

En la figura No. 2 se presenta un diagrama del empaque de una columna cromatogr3fica.

El gran potencial de la cromatograf3a de l3quidos es comparado con el de la cromatograf3a de gases, por dos factores primarios.

El primero es que una gran variedad de mol3culas pueden ser disueltas en un solvente que no necesariamente debe ser volatilizado y retener la estructura molecular original. La cromatograf3a de l3quidos es una t3cnica m3s delicada que la cromatograf3a de gases y con menos probabilidad de alterar las mol3culas de la muestra.

La segunda ventaja de la cromatograf3a de l3quidos es su habilidad de contar con una vasta variedad de mol3culas ionizadas y no-ionizadas, con peso molecular extremadamente alto y actividad biol3gica (enzimas, p3ptidos, etc.), que pueden ser determinadas por esta t3cnica.

En la tabla No.1 se muestran las diferentes formas

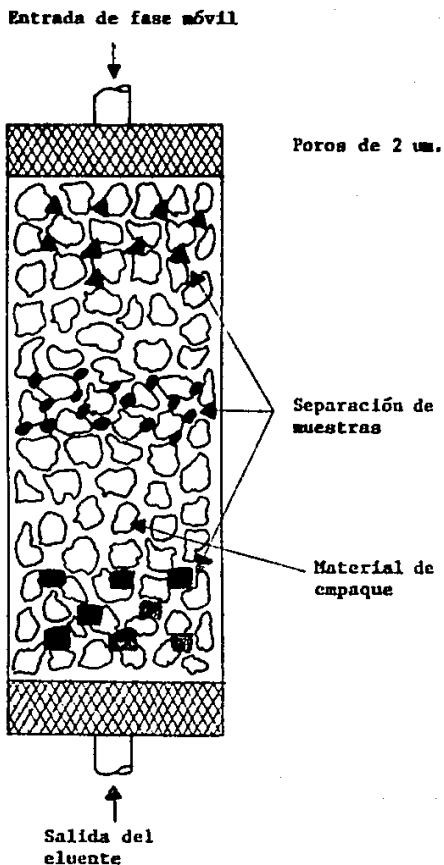


Figura N.º 2 Diagrama del Empaque de una Columna Cromatográfica.

de separación en la cromatografía de líquidos.

En suma, la cromatografía de líquidos es una innovación para la química analítica, orgánica y biológica. El campo de la química orgánica es extremadamente extenso, así como para la investigación biomédica. En la tabla No.2 se enlista una muestra de las áreas de aplicación donde la cromatografía de líquidos, es una técnica analítica vital.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, se encuentra dividida según el tipo de empaque que es utilizado en la columna.



Formas de Separación	Mecanismo
1. Separación por tamaño. Cromatografía de Exclusión estérica.	Las moléculas son separadas -- por peso molecular, con la -- elución de las de mayor tamaño primero. (Permeación en Gel).
2. Adsorción	Separación de moléculas basa-- das en la polaridad, con las -- menos polares eluyendo primero
3. Fase Reversa	Separación de moléculas basa-- das en una combinación de pa-- rámetros de solubilidad, coe-- ficiente de partición y pola-- ridad con el componente más -- soluble en agua ( el más po-- lar), eluyendo primero.
4. Ión - Par	Iones contrarios (moléculas -- con una carga opuesta a la de los iones de interés) se adi-- cionan a la fase móvil para -- formar un par neutro con la -- muestra iónica, la partición -- entre una columna de fase re-- versa y el eluyente sigue el -- cambio de la fase reversa.

Tabla No.1 Formas de separación utilizadas en la Cromatografía de Líquidos.

1. **Farmacéutica**  
Investigación y control de calidad.
2. **Clínica**  
Monitoreo de fármacos, caracterización de enfermedades, situaciones de emergencia.
3. **Forense**
4. **Pesticidas**
5. **Investigación bioquímica**
6. **Alimentos y bebidas**
7. **Universidad**  
Investigación y técnica.
8. **Polímeros/ Plásticos**

Tabla No.2 Areas de Aplicación de la Cromatografía de Líquidos.

La cromatografía líquida de alta resolución, es una rama de la Química Analítica de desarrollo más reciente, de crecimiento más rápido y potencialmente extensa. La función de la química analítica es de identificar y medir los componentes de una muestra. Esto permite el monitoreo de productos competidores. El análisis de fármacos durante el desarrollo, la producción, control de calidad, monitoreo terapéutico en pacientes ya sea en sangre u orina, de fármacos o sus metabolitos entre usos.

A continuación se definen algunos de los tipos de cromatografía de líquidos de alta resolución más utilizados.

#### I. CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL

La cromatografía en fase normal se encuentra basada en la cromatografía de adsorción, siendo ésta la forma más antigua de la cromatografía de líquidos. La técnica depende de interacciones específicas del soluto con la superficie de un adsorbente finamente dividido. El adsorbente puede ser:

- a. Silica-gel.- el más popular (  $\text{SiO}_2$  ) X
- b. Alúmina.- (  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ) X
- c. Carbón.- raramente utilizado.

## Mecanismo de la Cromatografía de Adsorción

Generalmente, se entiende que la fase móvil y las moléculas del soluto están en competencia por los sitios activos del adsorbente. La interacción adsorbente-soluto es el parámetro más importante que gobierna la separación por cromatografía de adsorción. Aunque el soluto tiene afinidad por la fase móvil, el compuesto no puede ser fuertemente retenido. Sin embargo, el soluto tiene una alta afinidad por la fase estacionaria, por lo que el compuesto puede ser fuertemente retenido. En otras palabras, al elevar la polaridad, la interacción es mayor y así el tiempo de retención se alarga.

### Limitaciones de la Cromatografía de Adsorción.

1. Tiempos de regeneración de la columna muy largos.
2. La sílica se desactiva al utilizar agua.
  - a. Es preciso usar solventes muy secos o la cromatografía no puede ser reproducible.
  - b. Puede regenerarse la columna por calentamiento a 110° C.
3. Retención irreversible.

## II CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL LIGADA

Esta es una técnica similar a la de cromatografía en fase normal, en la que utiliza sílica como adsorbente, sólo que en este caso se utilizan silanos que se encuentran químicamente ligados a la fase estacionaria polar.

El mecanismo básico, de este tipo de cromatografía, está basado en la partición del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Las técnicas de extracción son muy similares a las de cromatografía en fase normal.

Las columnas utilizadas en la cromatografía en fase normal ligado son:

- a. Alquilamina. Algunas aplicaciones típicas pueden ser la separación de monosacáridos.
- b. Alquilonitrilo. Hay una gran variedad de aplicaciones, para este tipo de columna, por ejemplo, para la detección de catecolaminas.

## III CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA

Se define a la cromatografía en fase reversa, como un tipo de técnica cromatográfica de partición:

1. Partición del soluto entre dos solventes inmiscibles, uno que es fijo (fase estacionaria) y

el otro es la fase móvil.

2. Material de empaque, fase-ligada donde la fase estacionaria está químicamente ligada al soporte.
3. El material de empaque de la fase normal ligada es más polar que la fase móvil, mientras tanto el empaque de la fase reversa ligada es menos polar que la fase móvil.

El material de empaque de la cromatografía en fase reversa, está basado en la utilización de sílica.

1. Las propiedades químicas del grupo sílica gel ----- (-Si-O-Si) y silanol (-Si-OH-) pueden ser importantes para una ligadura covalente de especies orgánicas con la superficie de la sílica.
2. Diferentes tipos de silanos son usados en sílica ligada: el monoclorosilano y el di-orto trifuncional silano.

Características Generales de la Cromatografía en Fase Reversa.

1. Puede ser utilizada para muestras con un extenso rango de polaridades y pesos moleculares.
2. La rapidez general de equilibrio de la columna con la fase móvil, durante métodos desarrollados y regeneración por gradiente.

3. Generalmente es de uso fácil.
4. Es aplicable para separación de compuestos iónicos o ionizables por manipulación y equilibrio químico secundario, semejante al control de ionización y ión-par en la fase móvil acuosa.
5. La posibilidad de especial selectividad para cada estructura o forma estérica por aditivos específicos de la fase móvil.

#### Selección de Solventes para HPLC en Fase Reversa.

La retención y selectividad son determinadas por la combinación de interacciones soluto-fase móvil e interacciones de soluto en la fase estacionaria. La composición de la fase móvil tiene un importante papel para determinar la selectividad para una separación idónea.

Tal vez, la forma más simple de fase móvil, que emplea la cromatografía de líquidos en fase reversa, consiste en agua y un solvente orgánico. Los solventes orgánicos más comunes son metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano y otros. Diferentes solventes orgánicos pueden ser usados para generar selectivamente grupos funcionales específicos.

La forma más simple de control de equilibrio

químico es amortiguar el pH de la fase móvil. Los factores que deben ser considerados para seleccionar una solución reguladora incluyen:

- a. Debe ser suficientemente puro, para evitar contaminación en la columna y minimizar el ruido de impurezas.
- b. Debe ser muy soluble en la fase móvil.
- c. La compatibilidad de la solución con el sistema de detección empleado es esencial. Transparencia óptica abajo de 200 nm, es muy deseable cuando se utiliza baja detección ultravioleta.

#### Selección de Columna para HPLC Fase Reversa

La selección de la columna se realiza obteniendo un alquil apropiado y esto se hace cambiando la longitud de la cadena C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>6</sub>, ó C<sub>2</sub>.

La diferencia en selectividad entre grupos alquilo de diferente longitud no está entendida completamente, ya que la relación entre el contenido de carbón, la longitud de la cadena carbonada y las propiedades de retención del soluto no son simples.

Con un empaque C<sub>18</sub>, la retención del soluto y selectividad hidrofílica son grandes. Esta fase C<sub>18</sub> puede ser más utilizada para cromatografía ión-par,



porque la matriz fundamental de sílica está mejor protegida para el ataque de la fase móvil conteniendo aditivos químicos. Las separaciones con columnas C y otras cortas son, sin embargo, más rápidas, <sup>8</sup> la eficiencia de la columna puede ser prácticamente igual y además son aptas para un factor de transferencia de masa del soluto. Para la separación de moléculas polares por la técnica de fase reversa, han sido sugeridas fases ligadas a cadenas cortas ya que se obtienen picos más simétricos comparándolos con los obtenidos con fases ligadas a cadenas largas.

#### IV CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

El mecanismo que sigue éste tipo de cromatografía se resume a continuación.

La resina inmóvil tiene un grupo funcional que fija la carga iónica ligada a ella. Este es un contraión cambiante cerrado que preserva la neutralidad de la carga. La muestra iónica puede intercambiarse con el contraión, haciendo pareja con la carga fija, cuando esto sucede, el ión no se mueve hacia abajo de la columna. A causa de que los materiales tienen diferentes afinidades para fijar la carga es posible la

separación de mezclas de componentes iónicos.

Existen tres tipos de empaques para columnas de intercambio iónico, estos son:

1. Poliestireno -- 10 u -- poroso.
  2. Silica -- 5 a 10 u -- poroso.
  3. Vidrio -- 40 u -- pelicular, poco utilizado.
- 
1. Empaque de Poliestireno. Este fué desarrollado originalmente para análisis de aminoácidos. Es un empaque esférico de grandes cadenas cruzadas, capaz de operación a alta presión sin excesiva compresión. Se compone de estireno copolimerizado y divinilbenceno como una cadena cruzada; se incrementa la estabilidad de la resina a presiones altas.

Dependiendo de la carga que se desee, la selectividad de la resina se modifica. Existen dos tipos de resina:

- a. Resina de intercambio aniónico, son normalmente sustituidas en la posición cloruro.
  - b. Resina de intercambio catiónico, son normalmente sustituidas en la posición del hidrógeno.
- 
2. Empaques de intercambio iónico con silica como

base.

A continuación se mencionan algunas ventajas de los soportes de ésta resina.

- a. Diferencia en selectividad.
- b. Fuertes estructuralmente.
- c. Pueden usarse con una gran variedad de solventes, sin desarreglo del empaque.
- d. Pueden utilizarse a altas temperaturas.

Las desventajas son las siguientes:

- a. No pueden utilizarse a pH de 2 a 7.5.

Sus aplicaciones son:

1. Para determinar N-Bases en partisol-10 SCX.
  2. Para determinar N-Nucleótidos en partisol - 10 SAX.
- Partisol SCX y SAX son empaques de intercambio iónico con bases de sílica de 10 u. Los grupos funcionales son ácido sulfónico y aminas cuaternarias respectivamente.

## DETECTORES PARA HPLC

El propósito de un detector para HPLC es el monitorear la composición del líquido eluido por la columna cromatográfica y proporcionar un dato de como varía la composición del eluyente, conforme transcurre el tiempo. Estos datos pueden ser presentados en la carta de un registrador, pueden ser analizados por una estación de datos o un integrador.

Existen diferentes detectores que son utilizados según la aplicación que se necesite. La siguiente es una lista de algunos de los detectores más comunes y utilizados en la cromatografía de líquidos.

Detector Espectrofotométrico ( UV/Vis ).

Detector de Índice de refracción.

Detector de Fluorescencia.

Detector Electroquímico.

Detector Infrarojo.

Detector de conductividad.

Detector de radio actividad.

En un detector, la respuesta eléctrica producida es directamente proporcional a la masa o concentración de los componentes que pasan a través de él.

Los detectores pueden ser clasificados en dos

tipos. Detectores de volúmen o tamaño, que funcionan por medición de alguna propiedad física del eluyente proveniente de la columna ( por ejemplo, constante dieléctrica, índice de refracción, etc.).

Estos detectores responden a un gran número de sustancias con el mismo orden de sensibilidad. También son llamados no específicos o detectores universales.

El segundo tipo de detectores son aquellos selectivos en sus respuestas. Estos son detectores de propiedades del soluto cuya función de medición en una propiedad física y/o química, que es característica solamente del soluto (por ejemplo, absorción ultravioleta).

A continuación se describen tres de los detectores más utilizados en HPLC.

#### DETECTOR DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

El detector de absorción ultravioleta es el más utilizado en HPLC, ya que responde a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. El mecanismo de trabajo de este detector se describe a continuación.

El rayo de luz es transmitido hacia la celda de flujo del detector, cuando los solutos pasan a través

de la celda, disueltos en la fase móvil, la luz es absorbida y de este modo la intensidad de la luz baja en la fotocelda, ésta reducción produce un cambio en la salida eléctrica, que puede ser amplificada y transmitida al registrador o sistema de datos. La afinidad entre la absorción de luz, en la celda de flujo y la concentración del soluto siguen la ley de Beer.

Un gran número de compuestos pueden ser detectados por este medio, se incluyen todas las sustancias que tienen una o más dobles ligaduras, además se incluyen también sustancias que tienen electrones no divididos (no ligados), por ejemplo, todas las olefinas, todos los compuestos aromáticos y compuestos que contienen grupos  $>C = O$ ,  $>C = S$ ,  $- N = O$ ,  $- N = N -$ .

#### DETECTOR DE FLUORESCENCIA

La detección por fluorescencia provee de una técnica muy eficaz para el análisis de trazas, ya que la mayor ventaja de la fluorescencia es la selectividad y sensibilidad.

La fluorescencia se presenta cuando una molécula absorbe energía, pasando a un estado de excitación. Esta energía puede ser liberada cuando la molécula

retorna a un nivel de energía que puede ser el inicial o uno mayor. Cuando la molécula pasa a un estado de mayor energía, con la emisión de ésta en forma de luz, la molécula fluoresce. La emisión de luz es generalmente de baja energía.

El detector de fluorescencia consta de una lámpara, que provee de un haz luminoso de cierta energía, y dos filtros: el primario para la excitación de la molécula y el secundario para la emisión de energía; ambos dotados de diferentes longitudes de onda.

El tipo de compuestos que fluorescen pueden ser divididos en dos grandes grupos: aquellos que poseen fluorescencia natural y los que necesariamente tienen que ser derivatizados para que fluorescan.

#### 1. Compuestos con Fluorescencia Natural

- . Generalmente son estructuras cíclicas conjugadas semejantes a anillos benzénicos.
- . La detección de fluorescencia puede ser difícil pues depende del valor de pH, solvente utilizado y sustituciones en la molécula.

#### 2. Compuestos Derivados Fluorescentes.

Para estos compuestos que no poseen fluorescencia natural, frecuentemente pueden ser empleadas

técnicas de derivatización como las que a continuación se mencionan.

- a. Cloruro de dansilo: (5-dimetil-amino naftaleno-1-cloruro sulfonil) para reacciones con aminas primarias o secundarias, así como para fenoles. Este método emplea una precolumna como agente derivatizante.
- b. Fluorescamina. Reacciona con aminas primarias, empleando una postcolumna como agente derivatizante. La reacción es muy rápida.
- c. OPA (orto-ftalaldehído). Reacciona con aminas primarias. Se pueden detectar rangos de picomoles; se utiliza para derivatizar pre y postcolumna (25,35).

#### DETECTOR ELECTROQUIMICO

El detector electroquímico muestra gran expectativa de uso en la cromatografía de líquidos, sin embargo, se presentan pocos tipos disponibles comercialmente. Todos dependen de alguna electroactividad del soluto en la fase móvil. Esta es una evidencia normal de oxidación o reducción o la habilidad de actuar como un conductor de carga eléctrica. Por esto los solventes requeridos



normalmente son sistemas agua - base, pudiendo extenderse posteriormente a mezclas agua - alcohol y a soluciones amortiguadoras fuertes.

Los detectores electroquímicos son generalmente más simples en diseño y características operacionales que los detectores ópticos, puesto que no requieren de fuentes de luz, lentes monocromáticos, filtros o fotodetectores.

La sensibilidad en general es muy buena, cuando hay estándares presentes es capaz de detectar picogramas de muchas especies electroactivas. Los niveles de ruido se elevan por algunas fuentes incluyendo electrónicas, fluctuaciones en sitios eléctricos comunes, irregularidades de flujo en la carga de la celda geométrica, fluctuaciones de temperatura, reacciones anormales en las superficies de los electrodos y cambios de flujo; estos factores pueden afectar la respuesta electroquímica.

Estos detectores son considerados selectivos, puesto que sólo especies electronegativas pueden proveer de una respuesta. La selectividad puede ser frecuentemente variada por alteraciones de voltaje (para reacciones de oxidación - reducción). Por

ejemplo, solutos fácilmente oxidables pueden ser detectados selectivamente en presencia de solutos que son más difíciles de oxidar, manteniendo el potencial debajo del necesario para la oxidación del segundo, pero lo suficientemente alto como para la reacción con el primero (23).

## TEORIA DE LA DETECCION ELECTROQUIMICA

### REACCIONES DE ELECTROLISIS

La detección electroquímica difiere de otros métodos de detección, porque en éste la muestra se transforma al paso por el detector.

Después de que la muestra es separada, en la columna, ésta pasa por un electrodo (conocido como electrodo de trabajo) en la celda analítica. El electrodo de trabajo resta cierto potencial con respecto al potencial del electrolito (medido por el electrodo de referencia).

El detector electroquímico aplica un voltaje al electrodo de trabajo, de este modo se adiciona energía al sistema. La diferencia de potencial necesaria para activar la reacción de electrólisis depende de ésta energía.

En la figura No. 3 se muestra una gráfica de como se encuentra distribuida la energía de activación.

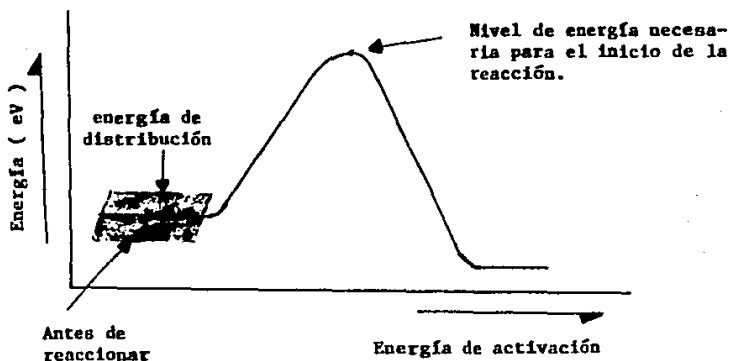


Figura N.º 3 Energía de Activación.

En caso de que el potencial del electrodo de trabajo sea positivo, con respecto al potencial del electrolito, la molécula es despojada de uno o más electrones (oxidación). Si el potencial es negativo, la molécula es reducida (por ejemplo, el electrodo dona uno o más electrones a la molécula).

La energía de distribución en una muestra de una solución típica, forma una curva de campana, donde algunas moléculas, con más energía que otras, alcanzan el nivel de energía necesario para que inicie la reacción.

En la figura No. 3 se muestra una gráfica de como se encuentra distribuida la energía de activación.

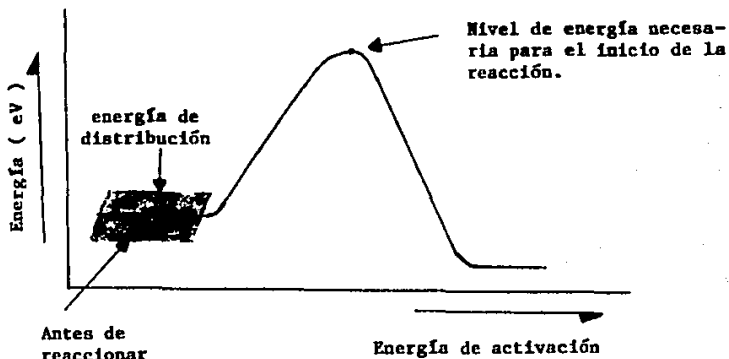


Figura N.º 3 Energía de Activación.

En caso de que el potencial del electrodo de trabajo sea positivo, con respecto al potencial del electrolito, la molécula es despojada de uno o más electrones (oxidación). Si el potencial es negativo, la molécula es reducida (por ejemplo, el electrodo dona uno o más electrones a la molécula).

La energía de distribución en una muestra de una solución típica, forma una curva de campana, donde algunas moléculas, con más energía que otras, alcanzan el nivel de energía necesario para que inicie la reacción.

La corriente producida es proporcional a la cantidad de analito inyectado en la columna. Esta ecuación describe la afinidad entre la corriente y la cantidad inyectada.

$$i = nKF D^{2/3} C$$

donde:  $i$  = la corriente producida por la reacción de electrólisis.

$n$  = el número de electrones involucrados en la reacción.

$F$  = Constante de Faraday (98,500 coulombs/mol).

$K$  = Constante de celda.

$D$  = Coeficiente de difusión del analito.

$C$  = La cantidad del analito inyectado en la columna.

Una reacción electroquímica ocurre en tres pasos:

1. Transporte de masa (difusión). El compuesto difunde de la solución, en la celda, a la superficie del electrodo.
2. Electrolisis. En la superficie del electrodo, los electrodos son removidos (oxidación) o suplidos (reducción) en el compuesto.
3. Redifusión. El compuesto electrolizado pasa del

electr6do a la soluci6n.

La velocidad de estos pasos (factor limitante) controla la ruta por la cual la reacci6n toma lugar.

En la figura No. 5 se presentan esquematizados los pasos de una reacci6n electroqu6mica.

### POTENCIALES DE MITAD - ONDA

El potencial mitad - onda ( $E_{1/2}$ ) es el potencial al cual la mitad del m6ximo de la respuesta de la muestra se presenta. El valor de potencial de mitad - onda es independiente de la concentraci6n y la altura de la onda es proporcional a la concentraci6n de los compuestos de inter6s.

Diferentes compuestos pueden poseer diferentes potenciales mitad - onda, por ello, pueden ser usados para separar e identificar compuestos. Cuando son analizados dos compuestos con diferentes potenciales mitad - onda ( de menos de 150 a 200 mV de diferencia) se puede ajustar el potencial aplicado para electrolizar un compuesto ( el 6nico requerimiento es el aplicar un bajo potencial) . Los otros componentes pasan a trav6s de la celda sin reaccionar.

Generalmente se puede escoger la colocaci6n del

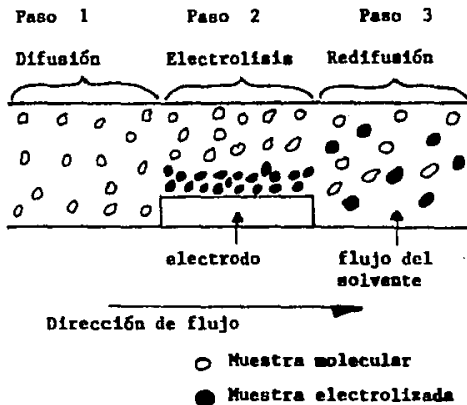


Figura N.º 5 Estados de una Reacción Electroquímica.

menor potencial posible para mantener el análisis en orden y con los picos indeseables fuera del cromatograma y mantener una selectividad óptima.

El detector electroquímico contiene 3 electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el electrodo auxiliar.

Cuando el aparato se coloca en posición de encendido, se conecta el electrodo de trabajo eléctricamente. El detector mantiene la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia; esta diferencia es igual al valor seleccionado, usando los indicadores del detector. Cuando la muestra fluye a través de la celda, el potencial contenido en el electrodo de trabajo, electroliza los componentes de interés, esto produce un aumento para la transferencia de electrones. El electrodo auxiliar permanece como tierra. Este electrodo auxiliar está recubierto con una solución de cloruro de potasio.

La cantidad que fluye a través del electrodo de trabajo es convertida a un valor de voltaje. Con los controles adecuados se logra colocación y atenuación de filtros y amplifica la señal, entonces esta pasa a el



registrador o integrador.

En la figura No. 6 se presenta un esquema de como está formada la celda analítica y también un diagrama eléctrico del detector electroquímico (40).

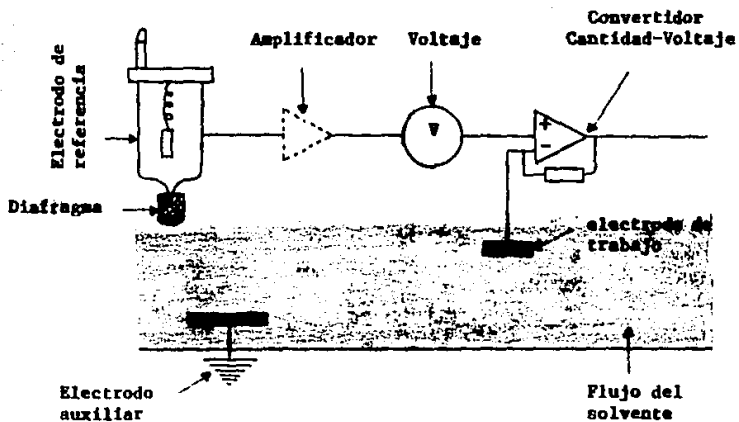


Figura N°6 Celda Analítica. Diagrama Eléctrico.

## VALIDACION

Por definición tenemos que:

Validación es la determinación del grado de validez de un proceso de medición.

La validación de un método analítico se lleva a cabo según los fines para los cuales se aplicará éste, por lo que no hay un formato exacto que nos indique cuales son las pruebas que tienen que desarrollarse, así como también no hay un acuerdo general en cuanto a los criterios de aceptación que se aplicarán para cada una de las pruebas necesarias para la validación.

En la tabla No. 3 se esquematizan las pruebas que es necesario desarrollar dependiendo de la aplicación que se le dará al método analítico.

Para validar el método analítico utilizado en este trabajo, se tomaron en cuenta los parámetros que a continuación se definen.

1. Linealidad del Sistema.- El grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, esto es con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 .
2. Linealidad del Método El grado al cual una

PARAMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD
		BAJAS CONC.	ALTAS CONC.	
Linealidad y Precisión	+	+	+	+
Límite de Detección		+		+
Precisión y Exactitud	+	+	+	+
Repetibilidad	+	+	+	+
Especificidad-Interferencia	+	+	+	+
Especificidad en Estabilidad		+	+	
Tolerancia del Sistema		+	+	+
Estabilidad de la Muestra	+	+	+	+

Tabla No.3 Parámetros Mínimos para Validar Métodos Analíticos

estándar, procesada por el método a validar, se aproxima a una línea recta, esto es con una pendiente con un valor aproximado de 1, una ordenada al origen aproximadamente igual a 0 y un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 .

3. Selectividad.- Habilidad de un ensayo de distinguir un fármaco de sus metabolitos, otros fármacos (en algunos casos relevantes) y constituyentes endógenos de fluidos biológicos.
4. Precisión del Sistema.- Grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad, en este caso mediciones a una misma concentración.
5. Cantidad Mínima Detectable.- El intercepto de la línea horizontal trazada a dos veces la longitud del movimiento de la línea base (ruido) se considera el límite inferior de detección.
6. Exactitud y Precisión del Método.- Concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia.
7. Reproducibilidad.- Precisión del método expresada como la concordancia entre determinaciones

realizadas por diferentes analistas y/o equipo, en el mismo y/o diferente laboratorio, en el mismo y/o diferente día.

8. Estabilidad de la muestra en plasma.- Verificación de si la muestra almacenada a diferentes temperaturas presenta algún cambio o degradación, tomando en cuenta el tiempo desde que la muestra biológica es obtenida hasta el momento en que se procesa para su análisis.
9. Estabilidad de la muestra procesada.- Verificar si la muestra procesada sufre algún cambio o degradación. Esta prueba se realiza con el fin de prever algún inconveniente como puede ser falta de energía eléctrica, descompostura del equipo de análisis o alguna otra causa por la que las muestras no puedan ser analizadas inmediatamente. Con esta prueba aseguramos la estabilidad en el medio de disolución final y dado el caso se dan las condiciones de almacenaje para las muestras.
10. Tolerancia del Sistema.- Establecidos los parámetros instrumentales y las condiciones de operación, se determina, como la variación de

parámetros determinantes o condiciones de operación afectan al análisis (13,15,17,35).

#### CRITERIOS DE ACEPTACION

Los criterios de aceptación necesarios para la validación de un método son los siguientes:

Coefficiente de variación  $< 2\%$  .

Desviación estándar  $< 2\%$  .

Para linealidad del Método: Coeficiente de correlación  $> 0.99$  . Pendiente aproximadamente = 1.0 .

Ordenada al origen aproximadamente igual a 0.0 .

Para prueba de " T de Student " :

T calculada debe ser menor que la T de tablas.

Para prueba de F:

F calculada debe ser menor que la F de tablas.

Estos criterios de aceptación fueron obtenidos de bibliografía, que aunque no se encuentra publicada, es aplicada en la validación de métodos analíticos por algunos laboratorios farmacéuticos de renombre.

El hecho de que no se haga referencia a ninguna

bibliografía publicada, se debe a que hay una variedad de criterios, dependiendo esto de cada autor, por lo que se avocó a los documentos utilizados por los laboratorios farmacéuticos, ya que se encuentran más cerca de nuestra propia realidad.

Otro factor que es importante resaltar es que estos criterios de aceptación, son aplicados para formas farmacéuticas y no para fluidos biológicos, sobre todo en lo que se refiere a coeficiente de variación, por lo que se considera que para éste, los criterios de aceptación tienen valores mayores.

También es importante hacer notar que dependiendo del tipo de método de análisis hay variaciones para estos criterios de aceptación. En la tabla No.4 se muestran algunos criterios de aceptación, diferenciando el tipo de método de análisis utilizado.



Precisión y Exactitud del Método

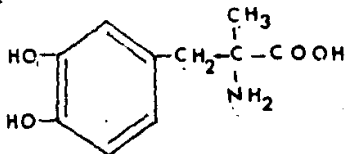
Critério	Prom.de recobro	Coefficiente de variación
Soluciones, cápsulas y tabletas.	98 - 102 %	3 %
Suspensiones y semisólidos.	97 - 103 %	3 %
Métodos HPLC	98 - 102 %	2 %
Métodos Titrimétricos	99 - 101 %	1 %
Métodos de disolución	96 - 104 %	3 %

Tabla No. 4 Criterios de Aceptación en Diferentes Métodos de Análisis ( 25 ).

## MONOGRAFIA

### ALFA - METILDOPA

Fórmula Desarrollada



Fórmula Condensada

C H NO  
10 13 4

Peso Molecular

211.21

### SINONIMOS

L-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina; metildopa; L-tirosina, 3-hidroxialfa-metil.

### CONSTANTES DE DISOCIACION

pKa.- 2.2 , 9.2 , 10.6 y 12.0 (a 25°C).

### DESCRIPCION

Polvo fino blanco o blanco amarillento, que puede contener trozos desmenuzables. Inodoro.

### SOLUBILIDAD

Soluble a 20°C, en 100 partes de agua, en 400 partes de alcohol y en menos de una parte de HCl diluido, casi insoluble en eter.

## CARACTERISTICAS

Punto de fusión.-	aproximadamente 290 °C.
Contenido de agua.-	entre 10.0 y 13% .
Metales pesados.-	Menor de 0.001% .
Rotación específica.-	entre -25° y -28°, calculada en base anhidra, determinada en una solución conteniendo 440 mg. en cada 10 ml., de una solución 2:3 de cloruro de aluminio en agua, previamente tratada con carbón activado, filtrada y ajustada con solución al 1% de hidróxido de sodio a pH de 1.5 .

## IDENTIFICACION

Han sido reportados diversos métodos de identificación en la literatura, entre los cuales se encuentran los siguientes:

- A. El espectro de absorción de infrarojo en una dispersión de aceite mineral, exhibe máximos solamente en las mismas longitudes de onda de una preparación similar de metildopa estándar de referencia.

- B. El espectro de absorción ultravioleta de una solución 1 en 25,000 en HCl 0.1 N, exhibe un máximo y un mínimo a las longitudes de onda de una solución similar de metildopa estándar de referencia, medida concomitantemente y las respectivas absorptividades calculadas en la base anhidra, de la longitud de onda de máxima absorción de aproximadamente 280 nm, no debe haber diferencia de más del 3%.  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$  en HCl - 0.1 N.
- C. A 10 mg. se adicionan 0.15 ml de una solución 1 en 250 de tricetohidrideno hidrato en ácido sulfúrico, se produce un color púrpura oscuro en un lapso de 5 a 10 minutos. Al adicionar 0.15 ml. de agua, el color cambia a amarillo castaño (7,28,37,38).

#### COMPUESTOS ANALOGOS

Alfa - aminoácidos, metildopato (etil ester de la metildopa), dopa (levodopa: antiparkinsoniano), tirosina y aminas biogénicas (dopamina, norepinefrina, epinefrina, etc.) (33).

#### ACCION FARMACOLOGICA

Es el agente de mayor uso para el tratamiento de la hipertensión arterial. La metildopa causa una reducción

progresiva en la presión sanguínea y ritmo cardíaco, siendo el máximo de 4 a 6 horas y persistiendo el efecto durante las 24 horas siguientes, después de la administración de una dosis oral simple. Después de una dosis intravenosa, los efectos aparecen de 1 a 2 horas (8,11).

#### MECANISMO DE ACCION

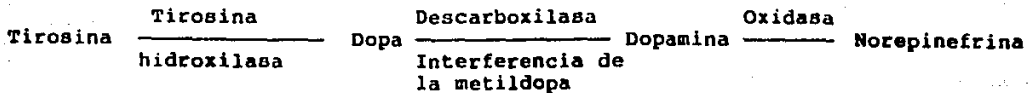
El efecto hipotensor del fármaco probablemente resulta de la suma de varios mecanismos. Una de las acciones de la metildopa es que supone ser parcialmente responsable de la actividad vasodepresora en la inhibición de la conversión bioquímica de la dopa a dopamina, de la cual resulta un agotamiento de norepinefrina neuronal (que es la responsable de la hipertensión).

Esto ocurre también por competición entre la dopa y la metildopa por la descarboxilasa, que es la enzima responsable de convertir la dopa a dopamina, siendo ésta la precursora de la norepinefrina. La falta de dopamina en las neuronas da como resultado una deficiencia de norepinefrina con la consecuente reducción de presión sanguínea. En suma la metildopa

también se comporta como un falso neurotransmisor, como se presenta en la figura No. 7 (12).

Los niveles de metildopa en plasma después de 80 minutos de una dosis intravenosa de 250 mg. son aproximadamente de 8 mcg/ml (33).

a. Inhibición de la descarboxilasa.



b. Falso Neurotransmisor.



Figura No. 7 Mecanismo de Acción de la Metildopa (13).

## ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRESION

Cuando la metildopa es administrada oralmente, aproximadamente el 50% es absorbida en el tracto gastrointestinal. Esta aparece rápidamente en la orina, predominando el compuesto inalterado. También son excretados algunos de sus conjugados y una pequeña cantidad de derivados descarboxilados que ya han sido identificados. La excreción de metildopa inalterada sigue dos curvas exponenciales. La primera tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 1.66 horas en sujetos con función renal normal y cuenta por lo menos el 90% de la dosis administrada. La segunda fase es mucho más lenta. En pacientes con severa disminución en la función renal, solo aproximadamente el 50% del fármaco es excretado durante esta primera fase ( $t_{1/2} = 3.5$  horas) y puede ocurrir acumulación durante la administración crónica. Entre ambas fases, la cantidad total absorbida y la distribución de metabolitos en la orina puede variar considerablemente por diferentes individuales y en un mismo paciente de día a día.

Estudios farmacológicos en hombre han sugerido una considerable variación en absorción, siendo la base el recobro urinario. Estudios sobre metabolismo con

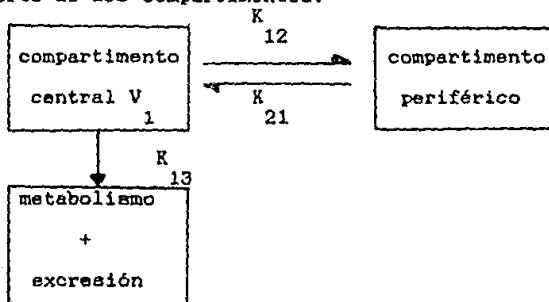


metildopa-C<sup>14</sup> en hombre han indicado que el conjugado mono - O - sulfato es el producto predominante en la biotransformación. La variabilidad en absorción y metabolismo es la razón para un gran intervalo en la dosis efectiva.

La media de concentración plasmática de metildopa libre y su conjugado, después de una administración oral de una dosis de 750 mg, es de un mínimo de 0.21 mcg/ml y un máximo de 3.91 mcg/ml., después de una dosis intravenosa de 250 mg., la concentración mínima es de 0.39 mcg/ml y la concentración máxima es de 7.50 mcg/ml.

Después de la dosis oral, la máxima concentración se alcanza a las 3 horas.

La cinética de metildopa después de una infusión intravenosa puede ser representada por un modelo abierto de dos compartimentos.



donde  $K_{12}$ ,  $K_{21}$  y  $K_{13}$  son constantes evaluadas de primer orden para el proceso designado y  $V_1$  es el volúmen aparente de distribución para el compartimento central, el cual incluye sangre y plasma.

Los metabolitos remanentes en orina son 3-O-metil-alfa-metildopa o sus conjugados (4%), alfa-metildopamina o sus conjugados (2%), 3-O-metil-alfa-metildopamina o sus conjugados (0.3%) y 3,4-dihidroxi-fenilacetona o sus conjugados (2.5%).

El total (libre + conjugado) de recobro urinario de metildopa es de 52 a 82%, después de una dosis intravenosa y de 9 a 57%, después de una dosis oral (21).

#### TOXICIDAD Y PRECAUCIONES

La metildopa, ya sea en su forma oral o parenteral, causa regularmente sedación. Después de una dosis simple, este efecto tiene una duración menor que el efecto hipotensor y éste tiende a decrecer con la medicación continua. Sin embargo una lasitud persistente y somnolencia causan disturbios particulares en el trabajo mental. Otros efectos referidos al Sistema Nervioso Central incluyen vértigo,

liberación de prolactina con resultado de lactación, signos extrapiramidales, pesadillas y depresión psíquica; el último de estos tres efectos es menos común con metildopa que con reserpina. Boca seca y congestión nasal pueden ser también de origen central. Varios trastornos gastrointestinales ocurren, aunque muy ocasionalmente pueden ser severos. Hipotensión postural puede desarrollarse, pero esto es con considerable menor frecuencia y menos severa que durante el tratamiento con guanetidina. La hipotensión por ejercicio es relativamente infrecuente. La retención de sal y agua con ganancia de peso y edema puede ocurrir con metildopa, así como otros fármacos antihipertensivos.

La metildopa causa un número de reacciones que también pueden tener bases "alérgicas". Menos del 20% de pacientes con terapia crónica de metildopa, desarrollan una prueba positiva directa de antiglobulina (Coomb's), aunque la incidencia es relativa a la dosis. En algunos casos la prueba de antiglobulina es positiva, pero sin significancia clínica, pero han sido reportados un número de casos de anemia hemofílica, que desaparece al terminarse la medicación con metildopa. La prueba de antiglobulina

comunmente resulta positiva por muchos meses después de la última dosis de metildopa. Han sido reportadas pruebas positivas de factor reumatoide y lupus como resultado de la administración de éste fármaco.

Otras reacciones adversas incluyen fiebre medicamentosa y raramente granulocitopenia y trombocitopenia.

La metildopa cruza la placenta, pero no han sido reportados efectos adversos, cuando es utilizada durante el embarazo (1,11).

## **C A P I T U L O   I I I**

### **DESARROLLO DEL METODO**

## DESARROLLO DEL METODO

El primer paso en el desarrollo del método fué determinar la longitud de onda, de máxima absorción, de la metildopa.

Esta se obtuvo mediante un barrido en la región ultravioleta, del cual se pudo observar, que ésta longitud es 280 nm, por lo que ésta es la longitud de onda indicada para la determinación del fármaco.

Para el desarrollo del método cromatográfico, se utilizó como referencia, el artículo de Walson y col.(39), en el cual se citan las siguientes condiciones:

1. Columna: intercambio catiónico (Aminex A - 6).
2. Fase móvil: formiato de amonio 0.5 M (pH = 4.3).
3. Detector: ultravioleta a 280 nm de longitud de onda.
4. Precipitación de proteínas con HClO<sub>4</sub> 4 N (0.1 ml/ml de plasma).

Dado que no se contaban con los requerimientos necesarios, se hicieron variaciones al método, en la fase móvil, precipitante, columna, etc., lo único que se mantuvo constante fué la longitud de onda, a la cual se estuvieron realizando las determinaciones.

En la tabla No. 5 se describen, en orden cronológico, las variaciones que se llevaron a cabo y los resultados obtenidos.

De la tabla No.5 podemos ver que no obstante que se hicieron diferentes variaciones al método, no se logró la resolución, entre la señal de los componentes del plasma y la señal del fármaco, ya que quedaba incluida o no se separaba lo suficiente como para poder cuantificarlo. Además no se obtuvo, por medio de la extracción, más del 40% del fármaco recuperado por lo que éste método fué descartado.

En la figura No. 8 se muestra el método de extracción utilizado para la detección ultravioleta.

Columna	Fase Móvil	pH de la fase móvil	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo de retención de (min)	Extracción			Resultados y Observaciones
					Preclipl-	Solvente extractor	Sep-pak	
u Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/Agua 60:40	---	1.0	1.80	0.1 ml de HClO <sub>4</sub> 4N	---	---	Sin resolución entre la señal de los componentes del plasma y el de la ND. (37).
*	Metanol/Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.02 M 60:40	5.5	1.0	1.95	"	---	---	"
*	Metanol/Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.02M 40:60	6.1	1.0	2.30	"	---	---	"
*	Acetonitrilo/Buffer 15:75	6.1	0.6	3.30	"	---	---	" (34)
Intercambio catiónico	Metanol/Buffer 40:60	6.1	0.6	4.30	"	---	***	"
*	Metanol/Buffer 40:60	6.1	0.6	4.30	TCA al 6% neutralizado con trisma 6%	---	---	" (27)
*	Metanol/Buffer 40:60	5.5	0.6	3.90	"	---	***	"

Tabla No.5 Variaciones realizadas al Método por HPLC utilizando Detector Ultravioleta, en orden Cronológico.



Intercambio catiónico	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	6.5	0.6	4.85	HClO <sub>4</sub> 4M	-----	*****	Sin resolución
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	6.0	0.6	4.90	"	-----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	4.5	0.6	4.95	"	-----	*****	"
u Bondapak C <sub>18</sub> y precolumna C <sub>18</sub>	Metanol/ Buffer 40 : 60	6.1	1.0	9.40	"	-----	----	"
u Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/ Buffer 40 : 60	6.1	0.6	4.90	HCl 0.1N pH=2.7	Acetato de etilo	----	Sin resolución y se logró solo un 20% de extracción.
"	Metanol/ Buffer 40 : 60	6.1	0.6	4.70	"	Benceno + cloruro de sodio	----	Sin resolución, se logró solo un 40% de extracción.
"	Metanol/ Agua 60 : 40	---	0.6	3.60	Acetonitrilo	Clorofor mo	----	Se analiza la fase acuosa. No hubo resolución.
"	Metanol/ Agua 30 : 70	---	0.6	3.50	"	"	"	"

Continuación de la Tabla No. 5

Intercambio cati6nico	Metanol/ Agua 20 : 80	7.0	0.6	3.60	TCA al 6% neutralizado con trizma 6%	----	*****	Sin resoluci6n
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 75	6.1	0.6	4.89	HClO <sub>4</sub> 4%	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 10 : 90	6.1	0.6	4.60	"	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 7.5 : 92.5	6.1	0.6	4.60	"	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 5 : 95	6.1	0.6	4.50	"	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	8.0	0.6	4.90	"	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	7.5	0.6	4.90	"	----	*****	"
"	Acetonitrilo/ Buffer 15 : 85	7.0	0.6	4.80	"	----	*****	"

Continuaci6n de la Tabla No. 5

u Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol/ Agua 15 : 85	---	0.6	4.16	Acetonitrilo	Cloroformo	---	Se analiza la fase acuosa. Sin resolu- ción.
	Metanol/ Agua 15 : 85	---	0.6	3.83	El método de extracción se presenta en la figura No. 8.		*	
*	Buffer de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05M	3.5	0.6	4.66	*	*	*	*
*	Buffer de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05M	2.2	0.6	4.50	*	*	*	*
*	Buffer de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05 M	4.8	0.6	4.70	*	*	*	*

Continuación de la Tabla No.5

NOTA:

\*\*\*\*\* utilizado en el método.

---- No utilizado en el método.

( ) Referencias Bibliográficas.

MD Alfa-Metildopa.

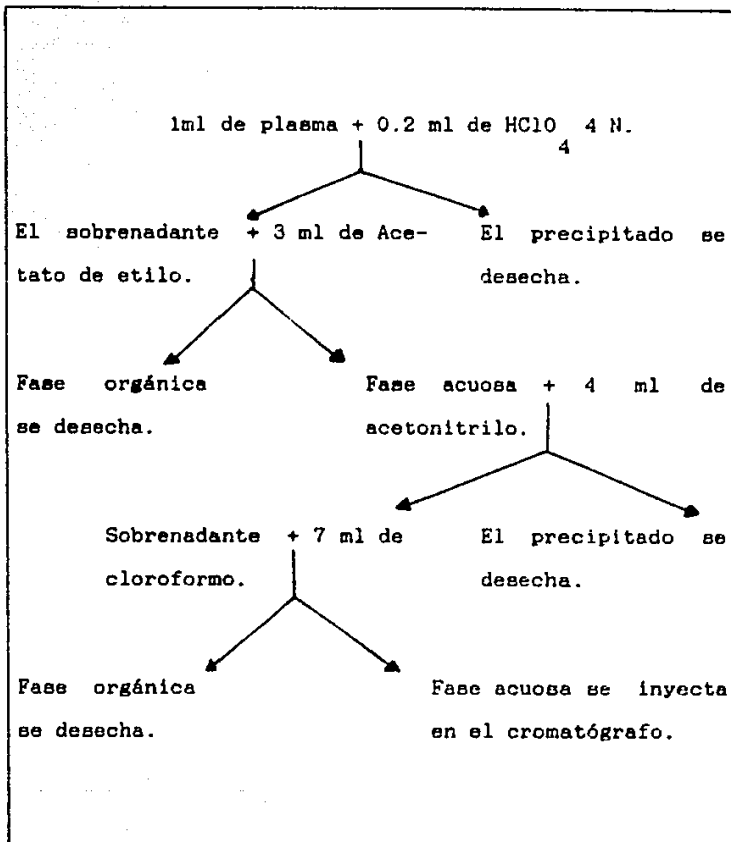


Figura No. 8 Método de extracción para Detección Ultravioleta.

Ya que existían referencias (20) de que la metildopa posee fluorescencia natural, se decidió cambiar el tipo de detección de ultravioleta a fluorescencia, probándose el método indicado por Kwan y col. (21), el cual se presenta en la figura No. 9.

Para este método la alúmina se preparó según lo indican Anton y Sayre (2).

En la tabla No.6 se detalla, cronológicamente, las variaciones que se realizaron utilizando el detector de fluorescencia y también los resultados obtenidos.

Analizando la tabla No.6 se observa, que el método no dió los resultados que se esperaban, por lo que se procedió a probar el método de Laverty (22), el cual se muestra en la figura No.10.

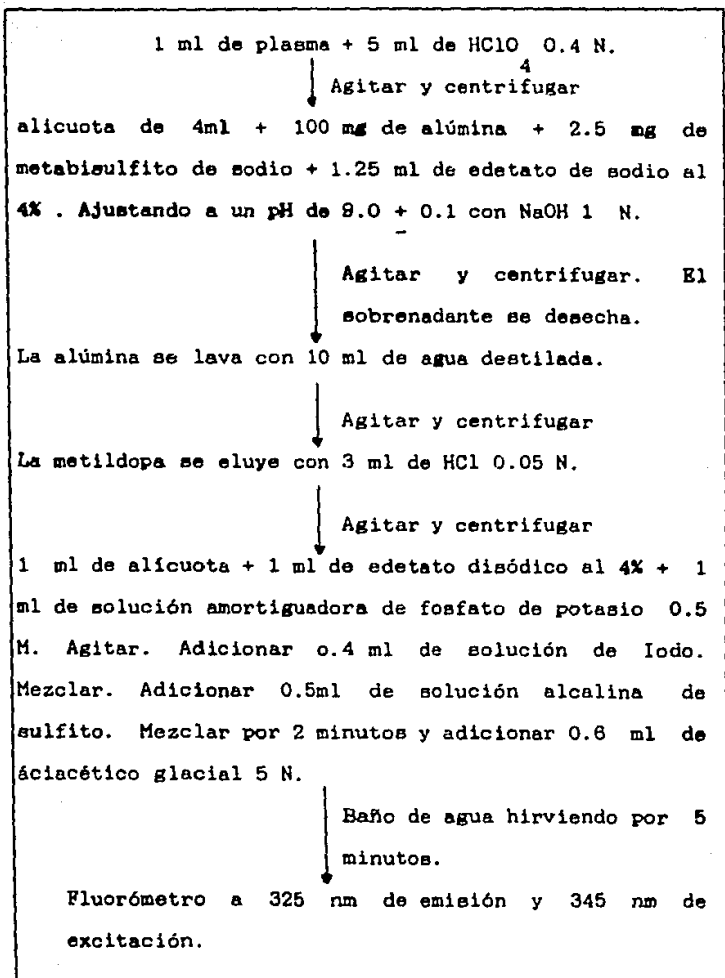


Figura No. 9 Método de Kwan

Columna y longitud de onda	Fase Móvil	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo de retención de MD (min)	Extracción			Resultados y Observaciones
				Precipitante	Solvente extractor	Alúmina (mg)	
u Bondapak C <sub>18</sub> 325 excitac. 345 nm emisión	Metanol/Agua 60 : 40	1.0	2.0	HCl <sub>4</sub> 0.4M (El método se presenta en la No. 14).	HCl 0.05M	100	Sin formación del hidroxindol, que es el que fluoresce. ( 17,20).
"	Metanol/Agua 60 : 40	1.0	2.16	HClO <sub>4</sub> 0.4M (El método se presenta en la No. 16).	Acetona/HCl (g)	500	Se formó el hidroxindol, pero no hubo resolución entre las señales (22).
"	Metanol/Agua 60:40 + cloruro de bromozalocinio al 0.1%	1.0	2.20	"	"	"	Sin resolución entre las señales de los componentes del plasma y la MD (3,8)
"	Metanol/Agua 60:40 + bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 0.01%.	1.0	2.20	"	"	"	Sin resolución. Se obtuvo un 50% de extracción en agua.
"	Metanol/Agua 60:40 + bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 0.01%.	1.0	2.22	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + acetona (El método se presenta en la No. 16)	Acetato de etilo	"	Sin resolución. Se obtuvo un menor del 50% de extracción.
Altes C <sub>18</sub> de 7.5 cm.de longitud	Metanol/Agua 5:95 + bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 0.01%.	0.35	4.10	El método se presenta en la No.17	"	"	Sin resolución de señales.
"	Metanol/Agua 5 : 95	0.35	4.15	Acetonitrilo + ATA al 5% pH=5 (1:0.016)	Cloroformo + trimax al 10% (1:0.016) pH=9	---	Sin resolución de señales. Se obtuvo un 75% de extracción en plasma y 93% en agua.

Tabla No.6 Variaciones realizadas al Método por HPLC utilizando Detector de Fluorescencia, en orden cronológico.

Altes C <sub>18</sub> 280nm excitac. 340 nm emisión	Metanol/ Agua 5 : 95	0.35	4.10	Acetonitrilo/ ATA pH=1	Cloroformo/ trizma pH= 7,5	---	Sin resolución de señales 85% de extracción en -- plasma.
"	Metanol/Agua/Acido acético 5 : 94 : 1	0.35	4.58	"	"	---	Sin resolución de señales
"	Metanol/Agua/Acido acético 5 : 94 : 1	0.35	4.62	"	" 2 extracciones	---	Sin resolución de señales 90% de extracción en plásm. a.
"	Metanol/Agua/Acido acético 5 : 94 : 1	0.35	4.60	"	Acetato de -- etilo	---	Sin resolución de señales
"	Metanol/Agua/Acido acético 5 : 94 : 1	0.35	4.70	"	Acetato de etil lo. 2 extrac- ciones.	---	"
"	Metanol/Buffer 30:70 buffer de KCl/HCl pH= 2.2	0.35	4.65	"	Cloroformo + trizma	---	"
"	Metanol/ Buffer 30 : 70	0.35	4.75	Acetonitrilo	Cloroformo	---	Sin resolución de señales 50% de extracción en agua
"	Metanol/Buffer 30 : 70	0.35	4.68	"	Acetato de etilo	---	"

Continuación de la Tabla No. 6



Alter $C_{18}$ de 7.5 cm de lon- gitud. 280 nm excitac. 340 nm emisión.	Metanol/Agua/Ac.Acético 30 : 69 : 1	0.35	4.80	Acetonitrilo + $H_2SO_4$ 0.1M (El método de extracción se pre- senta en la figura No.11)	Cloroformo	---	Buena resolución entre las señales de los componentes del plasma y de la metil- dopa. 80% de extracción en plasma.
---	--	------	------	---	------------	-----	--

Continuación de la tabla No. 6

NOTA:

--- No utilizado en el método.

( ) Referencias bibliográficas.

MD Alfa-Metildopa.

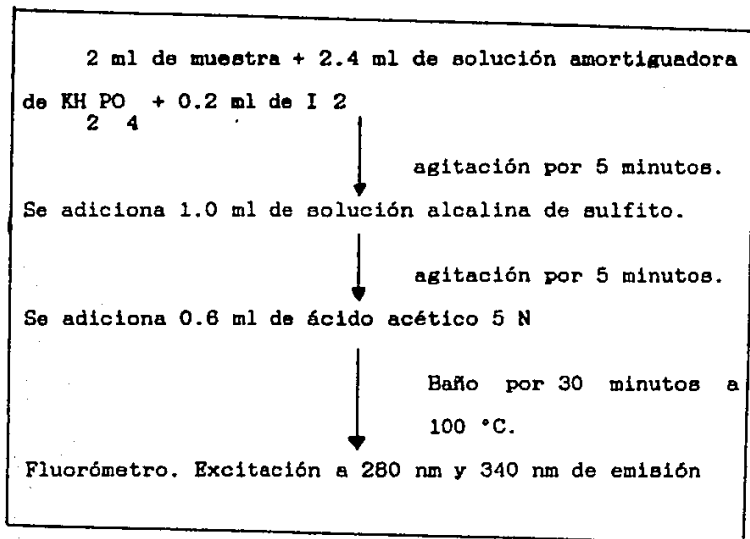


Figura No.10 Método de Lavery

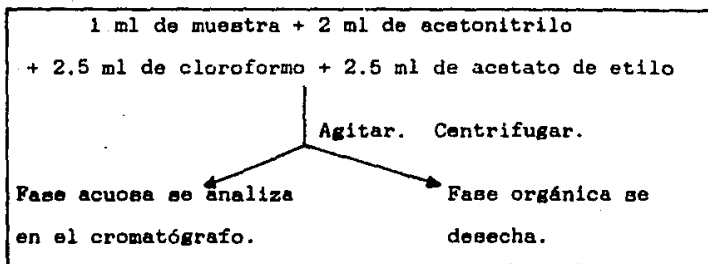


Figura No. 11 Método de extracción con acetonitrilo y cloroformo

Analizando la tabla No. 6 podemos observar que la extracción máxima fué del 80%, obteniendo resolución, entre la señal de los componentes del plasma y la señal del fármaco.

Una desventaja en el uso de éste método es que tiene una sensibilidad muy baja, ya que la concentración mínima detectable fué de 1 mcg/ml, siendo esto una gran desventaja para los fines a que está destinado el método, ya que para el monitoreo del fármaco se requiere que pueda ser detectado, cuando menos 0.2 mcg/ml (21,36), por lo que este método no funciona para el objetivo, para el cual fué diseñado.

Dados los resultados obtenidos por el método de fluorescencia, se decidió probar otro método, para ver si con él se podían mejorar los resultados, por lo que se sustituyó el detector de fluorescencia por un detector electroquímico, ya que se contaban con algunas referencias en donde se reportaba el uso de este detector (5,9,10,18,19,29).

El primer paso para el desarrollo de este método fué definir el potencial en que la metildopa proporcionaba la mayor respuesta. Esto se realizó haciendo pruebas a diferentes potenciales, obteniéndose la mayor respuesta a 750 mVolts, lo que nos indica que la determinación de la metildopa puede realizarse a este potencial.

El método que se siguió contaba con las siguientes características cromatográficas:

Columna :	C 18	uBondapak	
Fase móvil:	Acetato de sodio	50 mM.	
	Acido cítrico	20 mM.	
	Acido octansulfónico	2 mM.	
	EDTA	0.1 mM.	
	en. agua: metanol (96 : 4) ajustada a un pH = 3.5 con ácido acético (40).		

El método de extracción se presenta en la figura No.12.

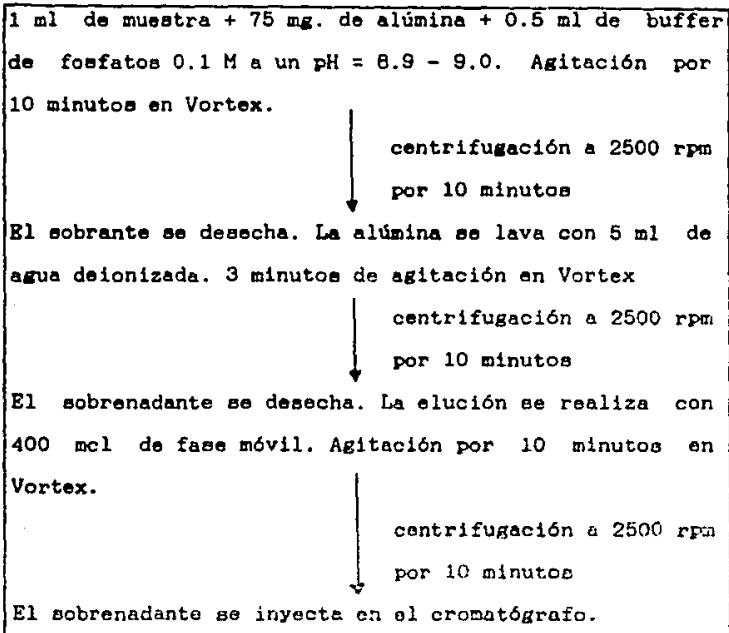


Figura No. 12 Método de extracción para detección electroquímica.

La alúmina es activada por calentamiento a 120 °C, por 4 horas.

La aplicación del método tal cual, nos dió un porcentaje de recuperación de no más del 20%, por lo que se procedió a realizar variaciones, una de las cuales fué en la cantidad de alúmina utilizada.

Se determinó la cantidad de alúmina que se debe adicionar para obtener el mayor porcentaje de extracción. Esta prueba se realizó probando diferentes cantidades de alúmina obteniendo de cada una de ellas el porcentaje de extracción del fármaco. Los resultados obtenidos son los que se mencionan en la tabla No. 7

mg de alúmina	% de extracción
100	20
150	25
200	28
250	33
300	35
350	37
400	38
450	38
500	39
750	37
1000	38

Tabla No. 7 Variaciones en la cantidad de alúmina utilizada en el método por detección electroquímica.

Como se puede observar, la cantidad de alúmina óptima fué de 500 mg.

La aplicación del método, ya con la variación en la cantidad de alúmina utilizada, nos dió un 50% de extracción del fármaco en agua, por lo que se realizaron variaciones, las cuales se muestran en la tabla No.8 siguiendo un orden cronológico.

Analizando la tabla No.8, podemos observar que el porcentaje de extracción, no fué mayor del 55%, lo que nos indica, que el método utilizando alúmina, no es el idóneo para la cuantificación del fármaco.

Es importante hacer resaltar, que en éste método, no apareció el problema de la resolución entre la señal de los componentes del plasma y la señal del fármaco, en este caso el problema se presentó en la elución del fármaco que se encontraba adsorbido en la alúmina.

Al observar los resultados obtenidos, se decidió cambiar el método, utilizando entonces el indicado por Ong y col. (30), el cual se describe en la figura No.13.

No se contaba con la centrifuga con control de temperatura, pero se trató de reproducir el método, dándonos como resultado el 70% de extracción y una

Buffer de adsorción	alúmina ( 500 mg )	Buffer de elución	Resultados y Observaciones
Fosfatos 0.1M a un pH= 8.9	activada por calentamiento 4 hrs. a 120° C.	Fase móvil pH= 3.5	Se obtuvo el 50% de extracción en prueba en agua.
Glicina a un pH=10:6 utilizado 1.5 ml.	"	"	"
"	"	Fase móvil a un pH= 3.5 con 2 eluciones.	55% de extracción en prueba en prueba en agua.
"	"	Fase móvil a un pH= 2.2 que es igual al pH de la ND.	Se obtuvo un 20% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1M ( 1 ml )	40% extracción en agua.
"	"	Glicina/HCl pH = 3.0	Se obtuvo un 6% de extracción.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1M ( 1 ml )	50% de extracción en plasma.
"	ácida a un pH= 3.4 ( 2 )	"	22% de extracción en agua.

Tabla No. 8 Variaciones realizadas al método por HPLC utilizando Detector Electroquímico y adsorción en alúmina, en orden cronológico.



Glicina a un pH=10.6	albúmina fécula a un pH= 0	$\text{HClO}_4$ 1N	19% de extracción en agua.
"	albúmina fécula a un pH=3.0	"	21% de extracción en agua.
"	estironeo por calentamiento 4 hrs. a 120° C.	"	40% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1N (1.2 ml)	33% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1N (1.4 ml)	31% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1 N (1.6 ml)	28% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1N (1.8 ml)	23% de extracción en agua.
"	"	$\text{HClO}_4$ 1N (2.0 ml)	30% de extracción en agua.

Continuación de la Tabla No.8

resolución no muy buena, por lo que se hicieron variaciones al método, con el fin de optimizarlo, estas variaciones se presentan en la tabla No.9, siguiendo un orden cronológico.

100 mcl de plasma o sangre entera +  
200 mcl de HClO<sub>4</sub> 1 M. Agitar por 30  
segundos en vortex. Colocar en baño  
de hielo de 5 a 10 minutos.

↓  
centrifugación por 20  
minutos a 2000 rpm a  
4 °C.

El sobrenadante se inyecta. Las muestras se -  
guardan en hielo hasta la inyección que debe  
ser dentro de los 30 minutos, después de que  
se adicionó el HClO<sub>4</sub>.

Figura No.13 Método de Ong y col.

Pase Móvil	Velocidad de Flujo (ml/min)	Tiempo de agitación (min)	Precipitante	Tiempo de retención de PD (min)	Resultados y observaciones
Acet.de Sodio 50 Ac.citríco 20 mM EDTA 0.01 mM. Ac. octansulfónico 2mM Metanol al 4%.	0.6	0.5	KClO <sub>4</sub> 1M ( 2 ml)	9.0	Baja resolución. 70% de extracción.
Ac.octansulfónico 7.5 mM y Metanol al 2%. sin variar los demás componentes.	"	1.0	"	9.0	Baja resolución. 90% de recuperación.
Ac.octansulfónico 7.5 mM y metanol al 1%.	"	"	"	9.42	Baja resolución. 95% de recuperación.
Ac.octansulfónico 8.5 mM y metanol al 1%.	"	"	"	10.08	Baja resolución. 95% de recuperación.
Ac. octansulfónico 12.5 mM y metanol al 0.5%.	"	"	"	10.50	Baja resolución. 96% de recuperación.

Tabla No. 9 Variaciones realizadas al Método de Ong (30), en orden cronológico.

Ac.octansulfónico 20 mM, metanol al 0.5%.	0.6	1.0	HClO <sub>4</sub> 1M	6.83	Sin resolución. 80% de recuperación
Ac.octansulfónico 12.5 mM, metanol al 0.5.	"	"	ATA al 6% 1 ml + 0.25 ml de tri- ma al 20%.	10.50	Sin resolución. 70% de recuperación
Ac.octansulfónico 12.5 mM, metanol al 0.5%.	"	"	HClO <sub>4</sub> 0.33 M	10.80	Buena resolución. 98% de recuperación.
Ac.decanosulfónico 12.5 mM, metanol al 0.5%.	1.00	1.0	HClO <sub>4</sub> 0.33 M	12.60	Excelente resolución. 100% de recuperación.

Continuación de la Tabla No. 9

Se realizaron pruebas para ver como afectaban los factores de temperatura y tiempo. Los resultados se muestran en la tabla No.10.

Después de haber realizado las modificaciones indicadas en la tabla No.10, se obtuvo el método óptimo para la cuantificación de alfa-metildopa en plasma, el cual se describe en la figura No.14.

<b>Tiempo de agitación (minutos)</b>		
0.5	1.0	3.0
2.6*	3.7*	3.6*
<b>Temperatura</b>		
Baño de hielo	Temperatura Ambiente	
3.5*	3.7*	
<b>Variación de tiempo al inyectar</b>		
Inyección inmediata	Inyección después de 2 hrs.	
3.6*	3.7*	

\* Datos de altura de la señal, en centímetros, de un estandard de 2 mcg/ml de alfa-metildopa.

Tabla No. 10 Modificaciones al Método de Ong. (30)

1 ml de plasma + 2 ml de HClO<sub>4</sub> 0.33 N.

Agitación por 1 minuto en vortex.

↓  
Centrifugación a 2500 rpm  
por 20 minutos.

El sobrenadante se inyecta en el cromatógrafo.

La fase móvil, con la cual se obtuvieron los resultados óptimos, consta de:

Acetato de sodio trihidrato 50 mM.

Acido cítrico monohidrato 20mM.

Etilendiamino tetraacetato disódico 0.01 mM.

Acido decansulfónico 12.5 mM.

Metanol HPLC al 0.5%

Todo esto en agua destilada y deionizada,  
ajustando el pH a 3.5 con ácido acético  
glacial.

Figura No. 14

Método Desarrollado



## C A P I T U L O I V

### VALIDACION DEL METODO

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos:
  - Bomba Waters Modelo M - 45
  - Inyector USK Waters.
  - Detector Electroquímico 460 Waters.
  - Columna C18 uBondapack de Waters.
  - Registrador BGC Goerz Metrawatt.
- Centrifuga Mod. IEC HN-SII DAMON/IEC DIVISION.
- Vortex SYBRON Thermolyne.
- Balanza analítica METTLER H54AR.
- Micropipeta automática de 200 a 1000 mcl Beckman.
- Microjeringa de 25 mcl de Scientific Glass Engineering PTY. LTD.
- Potenciómetro modelo 7 de CORNING.

### 2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Velocidad de flujo.- 1.0 ml/min.
- Volúmen de inyección.- 25 mcl.
- Detector electroquímico.- Potencial de 750 mV.
  - Rango.- 5nA.

Modo oxidativo.  
Electrododo de  
trabajo.- carbón.

Electrodo de  
referencia.- Ag - Ag.  
Electrodo auxiliar.-  
KCl.

Registrador.- Atenuación 20 mV.

Velocidad de carta.- 0.5 cm/min.

### 3. REACTIVOS

Acetato de sodio trihidratado R.A. Baker  
Acido cítrico monohidratado R.A. Baker  
Etilendiamino tetraacetato disódico (EDTA) R.A.  
Técnica Química,S.A.  
Acido decansulfónico R.A. Sigma,S.A.  
Metanol HPLC Aldrich,S.A.  
Acido acético glacial R.A. Técnica Química,S.A.  
Acido perclórico R.A. Baker

### 4. PREPARACION DE SOLUCIONES

FASE MOVIL

Pesar:

6.80 g. de acetato de sodio trihidrato.

4.20 g. de ácido cítrico monohidratado.

0.038 g. de EDTA.

3.05 g. de ácido decansulfónico.

Transferir estos reactivos, a un matraz aforado de 1000 ml, que contenga aproximadamente 200 ml de agua destilada y deionizada, disolver, adicionar 5 ml de metanol y aforar con agua destilada y deionizada. Ajustar el pH a un valor de 3.5 con ácido acético glacial.

Las concentraciones de los reactivos antes mencionados son de 50, 20, 0.01 y 12.5 mM respectivamente. La cantidad de metanol adicionada es de 0.5% . Filtrar a través de membrana Millipore de 0.45 micras y degasificar.

#### SOLUCION DE HClO

4

Tomar 14.3 ml de HClO<sub>4</sub>, transferir a un matraz aforado de 500 ml, aforar con agua destilada y deionizada. la concentración final del ácido perclórico es de 0.33 N.

#### 5. PREPARACION DE CURVA ESTANDARD

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó un estandar secundario proporcionado por los Laboratorios Merck Sharp and Dohme de México, cuyo certificado se anexa en el apéndice número 1.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de alfa-metildopa estandar de referencia, transferir a un matraz aforado de 10 ml, aforar con agua deionizada (concentración = 1 mg/ml).

Tomar una alícuota de 1 ml, transferir a un matraz aforado de 10 ml, aforar con agua deionizada (concentración = 100 mcg/ml).

Tomar una alícuota de 1 ml, transferir a un matraz aforado de 10 ml, aforar con plasma (concentración = 10 mcg/ml). Esta es la solución A.

Tomar una alícuota de 4 ml de la solución A, transferir a un matraz aforado de 5 ml, aforar con plasma (concentración = 8 mcg/ml).

Tomar una alícuota de 2 ml de la solución A, transferir a un matraz aforado de 5 ml, aforar con plasma (concentración = 4 mcg/ml).

Tomar una alícuota de 1 ml de la solución A, transferir a un matraz aforado de 5 ml, aforar con plasma (concentración = 2 mcg/ml).

Tomar una alícuota de 0.5 ml de la solución A, transferir a un matraz aforado de 5 ml, aforar con plasma (concentración = 1 mcg/ml).

Tomar una alícuota de 0.25 ml de la solución A, transferir a un matraz aforado de 5 ml, aforar con plasma (concentración = 0.5 mcg/ml).

Los estándares plasmáticos se procesan de la manera que a continuación se indica.

## 6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Tomar 1 ml de la muestra plasmática, adicionar 2 ml de HClO<sub>4</sub> 0.33 N, agitar en vortex durante 1 minuto, centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos. Inyectar el sobrenadante en el cromatógrafo, siguiendo las condiciones antes mencionadas.

## PROCEDIMIENTO DE VALIDACION

Para definir las concentraciones que se utilizarían para la determinación del fármaco, se tomaron en cuenta los artículos que reportan la farmacocinética de metildopa y contando con estos datos se definieron las concentraciones a utilizar, siendo la máxima de 8 mcg/ml y la mínima de 0.5 mcg/ml (5,21,36).

También es importante hacer notar que no se utilizó estandard interno, sino que la validación se llevó a cabo utilizando estandard externo.

En base a las definiciones sobre validación, dadas en el capítulo de generalidades, se procede a desarrollar cada una de las pruebas descritas. A continuación se detalla el procedimiento de cada una de estas pruebas.

1. Linealidad del Sistema.- Se prepara por duplicado, una curva estandard del fármaco, utilizando como medio de disolución  $\text{HClO}_4$ , a cinco niveles de concentración 8, 4, 2, 1 y 0.5 mcg/ml. Se verifica la linealidad mediante la determinación del coeficiente de correlación.

2. Linealidad del Método.- Se prepara por quintuplicado, una curva estandard del fármaco en plasma, se procesa siguiendo el método desarrollado. Se verifica la linealidad mediante el cálculo del coeficiente de correlación, la ordenana al origen y la pendiente de la curva resultante.
3. Selectividad.- Se comprueba utilizando dos plasmas diferentes, teniendo de cada uno de ellos un blanco de plasma y un plasma adicionado con el fármaco; se verifica la ausencia de picos y el tiempo de retención del alfa-metildopa.
4. Precisión del Sistema.- Se preparan 7 estandares al 100% de la concentración media esperada, (4 mcg/ml). Se evalúa la precisión del sistema mediante el cálculo del coeficiente de variación.
5. Cantidad Mínima Detectable.- Se preparan estandares, en concentraciones de 8,4,2,1,0.5,0.25,0.12,0.06 mcg/ml, utilizando HClO<sub>4</sub>, se determina el valor mínimo encontrado.
6. Exactitud y Precisión del Método.- Se preparan cinco curvas estandard en plasma, en las mismas



concentraciones mencionadas en linealidad, se aplica el método y se determina la exactitud mediante el estadígrafo "T de Student" y la precisión mediante el coeficiente de variación estimado en cada nivel de concentración.

7. Reproducibilidad.- Dos químicos, en dos días diferentes preparan y analizan estándares en plasma al 100% de la concentración esperada; (4 mcg/ml) evaluando los resultados mediante el análisis de varianza.
  
8. Estabilidad de la Muestra en Plasma.- Se prepara una solución estándar en plasma, al 100% de la concentración esperada (4 mcg/ml); esta solución se divide en alícuotas de 1 ml y se almacenan a Temperatura Ambiente (20 °C), refrigeración (4 °C) y congelación (-10 °C); posteriormente se procesan y analizan, esto a diferentes tiempos.
  
9. Estabilidad de la Muestra Procesada.- Se prepara una solución estándar en plasma, al 100% de la concentración esperada, se le adiciona el agente precipitante (HClO<sub>4</sub>) y se centrifuga. Se separa el sobrenadante y se almacena a diferentes

temperaturas, refrigeración (4 °C) y congelación (-10 °C), para posteriormente ser analizadas a diferentes tiempos.

10. Tolerancia del Sistema.- En este caso se varía el valor de pH de la fase móvil, para verificar como afecta a la detección del fármaco. Esta verificación se hace mediante la determinación de la resolución y el tiempo de retención del fármaco. Se tomó como parámetro determinante el pH de la fase móvil, pues se observó que a variaciones de éste había cambio en el tiempo de retención del alfa-metildopa, teniendo como consecuencia variación en la resolución.

## **C A P I T U L O V**

### **RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

## RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para la validación del método analítico para cuantificar alfa-metildopa en plasma.

### 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se utilizó una curva estándar cuyas concentraciones fueron de 8, 4, 2, 1 y 0.5 mcg/ml, la curva se realizó por duplicado. Para este caso la metildopa se encuentra en  $\text{HClO}_4$ .

En la tabla No.11 se concentran los resultados obtenidos para esta prueba.

En la figura No.15 se observa la gráfica de linealidad del sistema, en la cual se nota la respuesta lineal que existe entre los microgramos adicionados (concentración) y la respuesta obtenida (altura del pico).

### 2. LINEALIDAD DEL METODO

Se utilizaron cinco curvas estándar en plasma, con las mismas concentraciones utilizadas cuando se

cuantificó la linealidad del sistema, se procesaron según el método y se cuantificaron.

En la tabla No.12 se concentran los resultados obtenidos para esta prueba.

En la figura No.16 se observa la gráfica de linealidad del método, con la cual podemos observar la respuesta lineal existente entre los microgramos adicionados y los microgramos recuperados.

El cálculo de la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación, se realizó mediante el método de regresión por mínimos cuadrados; para ello se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Pendiente (m)} \quad m = \frac{n(\sum Sxy) - (\sum Sx)(\sum Sy)}{n(\sum Sx^2) - (\sum Sx)^2}$$

Ordenada al origen

$$(b) \quad b = \frac{(\sum Sy) - m(\sum Sx)}{n}$$

Coefficiente de correlación "r"

$$r = \frac{n(\sum Sxy) - (\sum Sx)(\sum Sy)}{[n(\sum Sx^2) - (\sum Sx)^2] [n(\sum Sy^2) - (\sum Sy)^2]}^{1/2}$$

donde:  $S_{xy}$  = Suma de los productos de x por y.  
 $S_x$  = Suma de los valores de x.  
 $S_y$  = Suma de los valores de y.  
 $n$  = Número de pares ordenados.

Por los datos obtenidos de pendiente, coeficiente de correlación y ordenada al origen, podemos observar que la respuesta se relaciona linealmente con la concentración del estándar adicionado, tanto para la linealidad del sistema, como para la linealidad del método. Además se observa que el coeficiente de variación es menor del 2%, lo cual se encuentra dentro de los criterios de aceptación especificados anteriormente.

**Respuesta**

<b>Concentración ( mcg/ml )</b>	<b>Altura ( cm )</b>	<b>% de recuperación</b>
0.5115	0.9	102.34
0.5115	0.8	100.34
1.023	1.7	101.95
1.023	1.6	98.22
2.046	3.2	99.53
2.046	3.0	98.60
4.092	6.5	101.76
4.092	6.3	99.34
8.184	12.5	98.88
8.184	13.0	102.09

$$\bar{x} = 100.35$$

**Tabla No. 11 Linealidad del Sistema.**

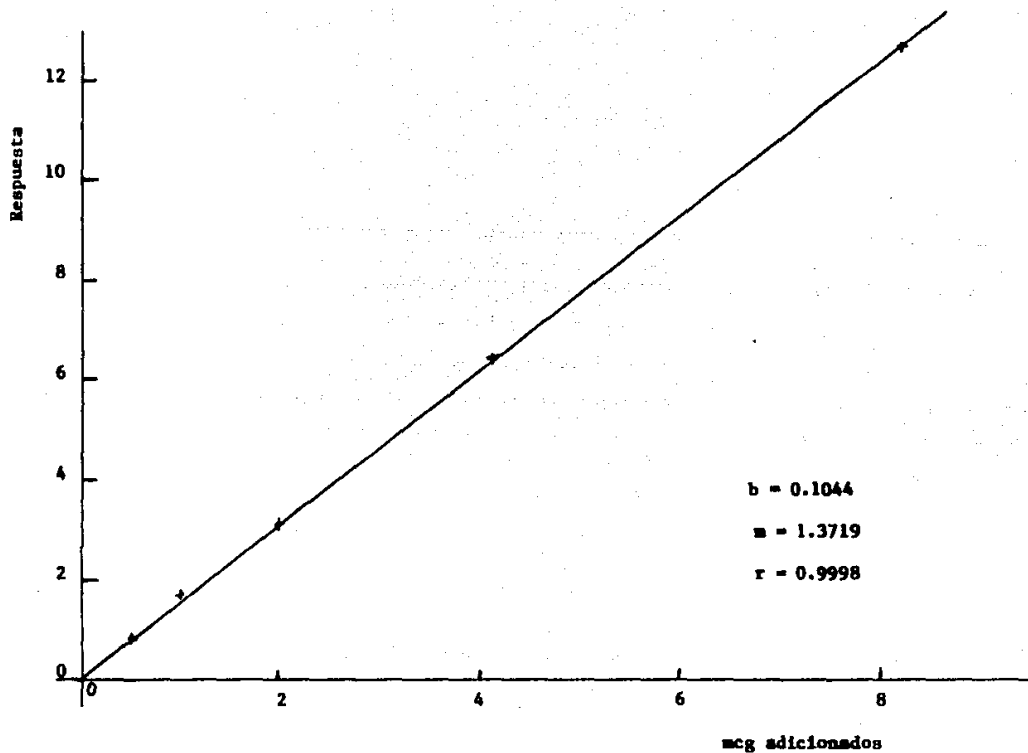


Figura N° 15 Linealidad del Sistema



0.5		1.0		2.0		4.0		8.0	
MOG ADIC.	MOG RBC.	MOG ADIC.	MOG RBC.	MOG ADIC.	MOG RBC.	MOG ADIC.	MOG RBC.	MOG ADIC.	MOG RBC.
0.5303	0.5167	1.0610	1.0467	2.1220	2.1737	4.2440	4.3959	8.488	8.8495
0.5115	0.5286	1.0230	1.0625	2.0460	2.1331	4.0920	3.9823	8.184	7.9581
0.5355	0.5498	1.0710	1.0545	2.1420	2.1698	4.2840	4.2921	8.568	8.6896
0.5160	0.5304	1.0320	1.0632	2.0640	2.1378	4.1280	4.3183	8.256	8.4508
0.5070	0.5237	1.0140	1.0498	2.0280	1.9722	4.0560	4.0925	8.112	7.9027
0.5200	0.5298	1.0402	1.0553	2.0804	2.1173	4.1608	4.2162	8.3216	8.3701

Tabla No. 12 Linealidad del Método

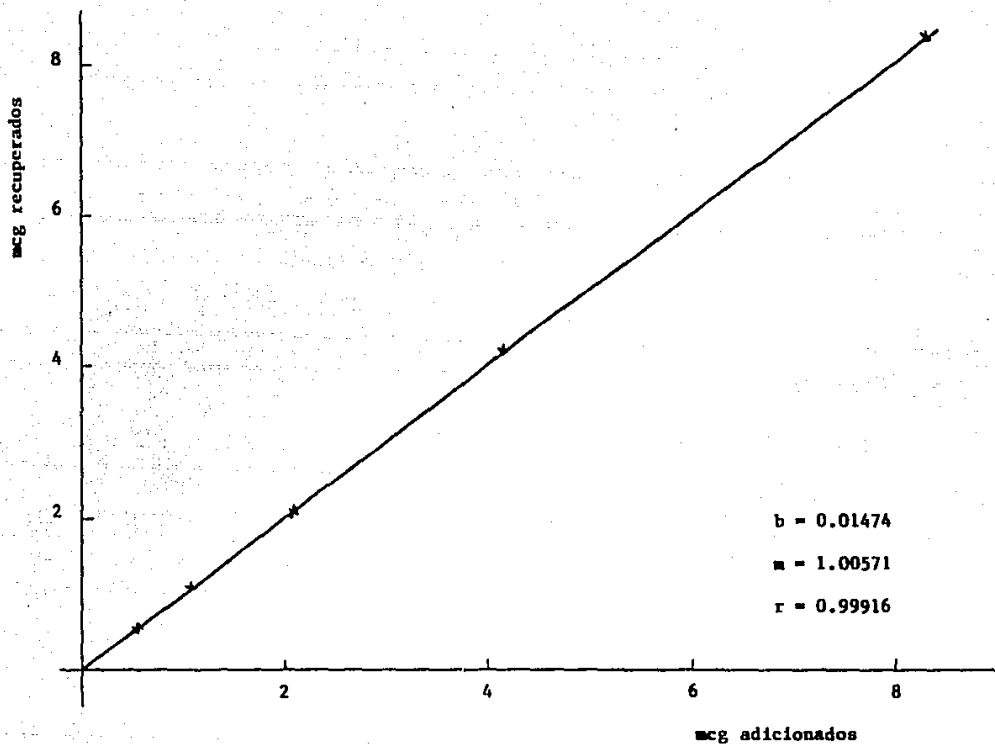


Figura N.º 16 Linealidad del Método ( promedios)

### 3. SELECTIVIDAD

Se analizaron dos plasmas distintos, obteniendo de cada uno de ellos, un blanco de plasma y un plasma adicionado con el estándar de referencia.

Se utilizó un estándar de alfa-metildopa, a una concentración de 2 mcg/ml. Los plasmas utilizados fueron:

Plasma A.- Plasma envejecido (después de dos años de obtención).

Plasma B.- Plasma recién obtenido.

Dado que el plasma recién obtenido podía tener la presencia de aminas endógenas, que pudieran interferir con el método, se decidió probar esto, utilizando un plasma reciente y un plasma envejecido, ya que en el segundo no se encuentran dichas aminas.

En la figura No. 17 se pueden observar los cromatogramas obtenidos para esta prueba, en donde se puede observar que, a pesar de los distintos tipos de plasma, no hay interferencia alguna entre los componentes del plasma y la metildopa, ya que no hay ninguna señal que aparezca al tiempo de retención del fármaco.

Para confirmar la selectividad del método, con

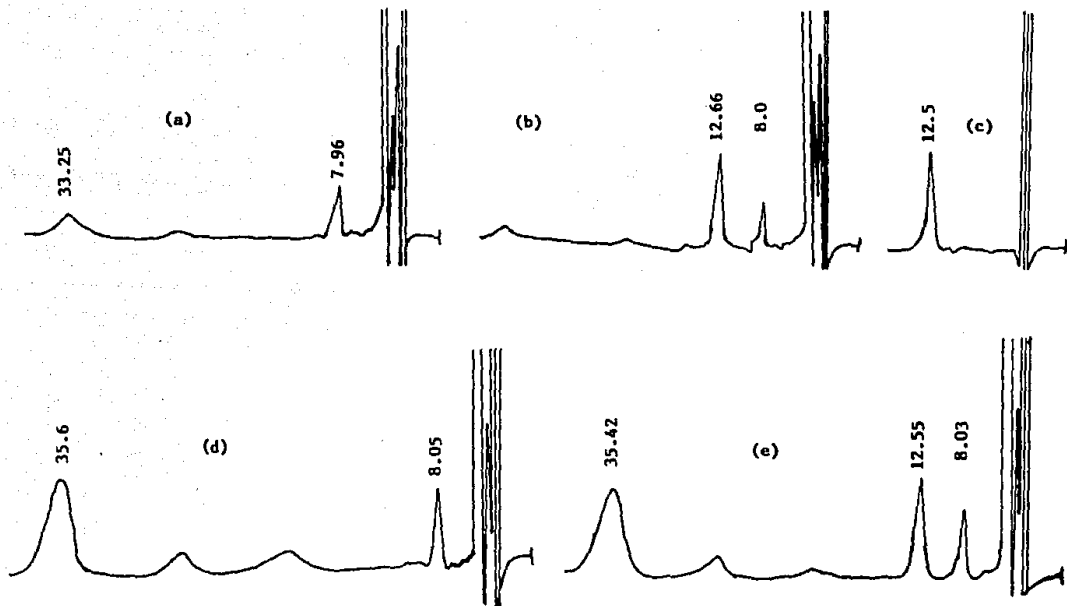


Figura N° 17 (a) blanco de plasma recién obtenido. (b) plasma recién obtenido adicionado con 2 mcg/ml de alfa-metildopa. (c) estandar de 2 mcg/ml de alfa-metildopa. (d) blanco de plasma envejecido. (e) plasma envejecido adicionado con 2 mcg/ml de alfa-metildopa.

respecto a catecolaminas endógenas, se utilizaron muestras de un voluntario sano, antes y después de una dosis oral de 500 mg. del fármaco.

En la figura No. 18 se pueden observar los cromatogramas obtenidos para esta prueba, en donde se puede notar la ausencia de interferencias que pudieran presentar las catecolaminas endógenas, con lo que se prueba la selectividad del método.

No fue posible cuantificar los metabolitos del fármaco, ya que no se disponía de ellos, pero se tiene en la literatura que después de una dosis oral, aproximadamente el 30% presente en plasma es 3-O-sulfato de metildopa (39). Del 80 - 90% de la dosis se excreta en orina en 48 horas, como metildopa inalterada (24%), 3-O-sulfato de metildopa (40 - 65%), 3-O-metilmetildopa (4%) y fracciones de alfa-metildopamina y alfa-metilnoradrenalina (10%) (39,40). Podemos deducir, mediante la estructura química y los pesos moleculares de estos metabolitos, que tienen una polaridad diferente a la del fármaco, por lo cual no causarían interferencia con la determinación, además de que existe bibliografía que apoya este criterio (4).

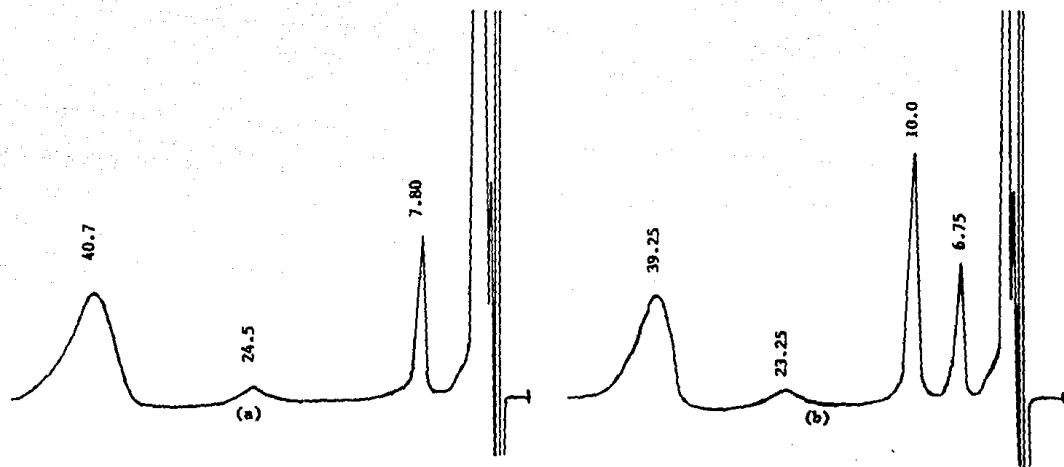


Figura N<sup>o</sup> 18 Muestras de un voluntario sano

(a) antes de la administración de alfa-metildopa.

(b) después de 3 hrs. de una dosis oral de 500 mg. de alfa-metildopa.

Se encontró en la bibliografía reportes de estudios anteriores, en que no se presentan interferencias con algunos fármacos, entre los que podemos mencionar: propranolol, hidroclorotiazida, clorotiazida, adrenalina, cafeína, dihidroxibenzilamina, normetanefrina, dopamina, deoxiepinefrina, L-dopa, tirosina, metanefrina, 3-O-metildopamina, acetaminofen, hidrazina, guanetidina, reserpina, clortalidona, clorpropamida, acetohexamida, clorpromazina, diazepam e indometacina.

Dados estos reportes podemos pensar que no se presente ninguna interferencia con la determinación de metildopa. Con respecto a las catecolaminas endógenas, la noradrenalina puede interferir con la metildopa, pero se debe tomar en cuenta que, las concentraciones plasmáticas de esta amina son entre 0.1 y 0.3 ng/ml, por lo que se considera que esto no interferiría al emplear el método para cuantificar al fármaco (3, 4, 25, 28, 32).

#### 4. PRECISION DEL SISTEMA

La precisión se determinó con el análisis de 7 estándares, encontrándose estos en  $\text{HClO}_4$ . Los resultados se presentan en la tabla No.13.

No.Estándar	mcg adicio- nados	mcg recupe- rados	% recupe- ción
1	4.0	3.9968	99.92
2	4.0	4.1000	102.50
3	4.0	3.9968	99.92
4	4.0	4.0532	101.33
5	4.0	4.1000	102.50
6	4.0	4.1268	103.12
7	4.0	4.0532	101.33

$$\bar{x} = 101.52$$

$$DE = 1.28$$

$$\% \text{ C.V.} = 1.26$$

Tabla No.13 Precisión del Sistema

Con los resultados obtenidos observamos que el coeficiente de variación es menor del 2%, por lo que la precisión del sistema se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido.



## 5. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE

La concentración mínima detectable se determinó con la preparación de una curva estándar en  $\text{HClO}_4$ , con valores de concentración 8,4,2,1,0,5, 0.12, 0.06 mcg/ml., obteniéndose los resultados que se presentan en la tabla No. 14.

La concentración mínima detectable es de 0.125 mcg/ml, ya que la concentración de 0.0625 mcg/ml, queda de la misma magnitud del ruido y ya no es un valor aceptado, pues el criterio de aceptación para este parámetro es que la respuesta sea 2 veces la magnitud del ruido.

En la figura No. 19 se presenta la gráfica de esta curva.

## 6. EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO

Estos parámetros fueron determinados mediante la elaboración de 5 curvas estándar en plasma. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No.15.

Para los cálculos presentados en la tabla No.15 se utilizaron las siguientes fórmulas:

Concentración ( mcg/ml )	Altura ( cm )
8.000	11.10
4.000	5.6
2.000	2.80
1.000	1.5
0.500	0.8
0.250	0.45
0.125	0.30
0.062	0.15

Altura de ruido = 0.15 cm.

Tabla N° 14 Concentración Mínima Detectable

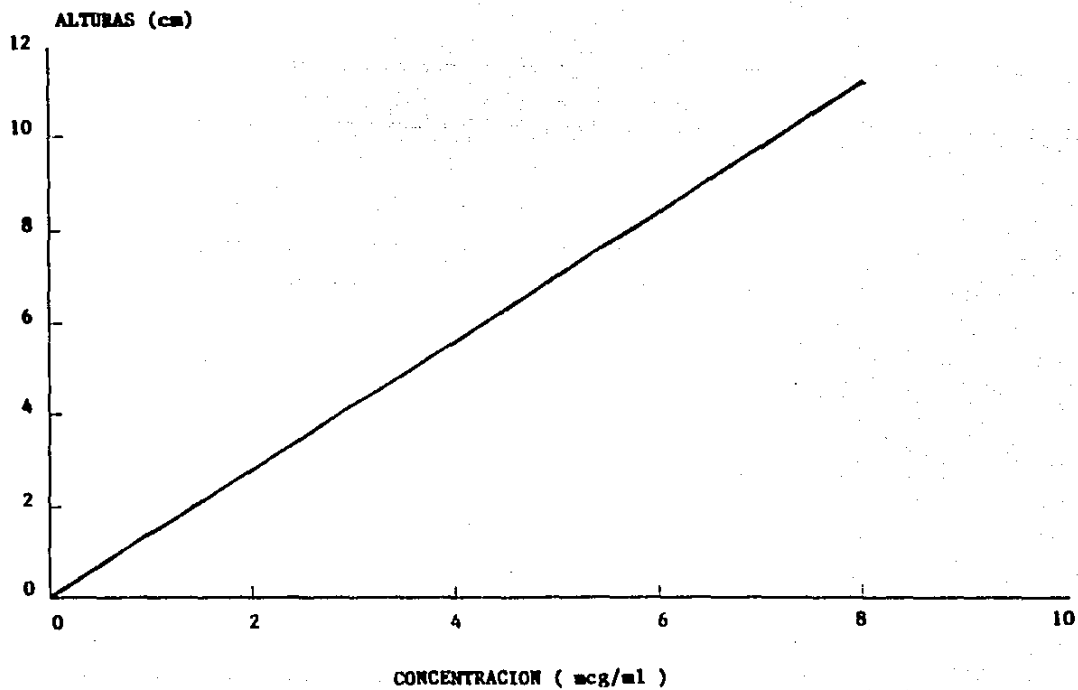


Figura N° 19 Concentración Mínima Detectable.

$$\text{"T" calculada} = \frac{\bar{y} - 100}{S} \left( n \right)^{1/2}$$

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{y} \pm \left( T_{(n-1, 0.975)} \right) \left( \frac{S}{n} \right)^{1/2}$$

donde: S = desviación estándar.

n = número de muestras.

Como se puede observar en la tabla No.15, vemos que para exactitud, los valores de "T" calculada, son menores a los de "T" de tablas, por lo que se puede decir que, las variaciones en la exactitud del método no son significativas, sino debidas únicamente a variaciones en la manipulación que se realiza durante el procesamiento de las muestras.

Para la precisión del sistema tenemos que, a pesar de que el coeficiente de variación es mayor del 2%, ésta no sale de los límites del criterio de aceptación, ya que se trata de un fluido biológico, por lo que podemos deducir que tenemos un método de cuantificación con una precisión aceptable y que las variaciones que se presentan son debidas únicamente al manipuleo durante

Curva No.	CONCENTRACION ( mcg/ml)				
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
1	97.45	98.66	102.44	103.58	104.26
2	103.36	103.87	104.26	97.32	97.24
3	102.68	98.46	101.30	100.19	101.42
4	102.80	103.03	103.58	104.61	102.36
5	103.30	103.54	97.25	100.90	97.42
$\bar{x}$	102.018	101.512	101.766	101.320	100.540
PRECISION					
Desv. Est.	2.56	2.71	2.76	2.88	3.10
% Coef.Var.	2.51	2.67	2.71	2.85	3.08
EXACTITUD					
Prueba de "T"					
T calculada	1.762	1.246	1.430	1.024	0.389
Intervalo de Confianza al 97.5%	102.01 ± 3.17	101.51 ± 3.36	101.76 ± 3.42	101.32 ± 3.57	100.54 ± 3.84

T<sub>tablas (4,0.025)</sub> = 2.776

Tabla No. 15 Exactitud y Precisión del Método, reportada en porcentaje de alfa-metildopa recuperada.

el procesamiento de las muestras y no debidas al método desarrollado.

## 7. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

La reproducibilidad del método se realizó mediante el análisis hecho por 2 analistas, en 2 días diferentes, utilizando el mismo equipo para el análisis de las muestras, con doce muestras en total, obteniéndose un cuadrado de 2 x 2. Las muestras fueron preparadas en plasma. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 16.

Con los resultados obtenidos, se procedió a realizar análisis de varianza. Estos cálculos fueron:

Suma de cuadrados al analista (SCa) = 8.68

Suma de cuadrados del día anidado al analista (SCd) = 3.78

Suma de cuadrados del error (SCe) = 10.70

Con estos resultados se elaboró la tabla de análisis de varianza ( ANADEV A ), que aparece en la tabla No.17.

Observando la tabla No. 17, vemos que la F

calculada es menor que la F de tablas, por lo que se puede decir, que la diferencia entre analistas y la diferencia entre días, no es significativa para el método; asimismo el coeficiente de variación es menor del 2%, por lo que también nos da una idea de que tan reproducible es el método desarrollado.

		ANALISTA	
		1 ( i )	2
D	1	103.08	99.96
		103.84	103.06
		101.51	102.29
I	( j )	103.90	101.77
		104.61	103.19
		104.61	101.06

$$\bar{x} = 102.73$$

$$DE = 1.4511$$

$$\% C.V. = 1.4124$$

Tabla No. 16 Reproducibilidad del Método, tomando en cuenta el porcentaje de recuperación de alfa-metildopa.



FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADROS	MEDIA DE CUADROS	F CALCULADA
TOTAL DE GRADOS DE LIBERTAD	11			
ANALISTA	1	8.68	8.68	6.4897
ANALISTA-DIA	2	3.78	1.89	1.4130
ERROR	8	10.70	1.3375	

De Tablas el valor de F es:  $F_{(0.025,1,8)} = 7.57$

$$F_{(0.025,2,8)} = 6.06$$

Tabla No. 17 Reproducibilidad del Método. Tabla de Anadeva.

## 8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN PLASMA

Se almacenaron muestras plasmáticas adicionadas con el fármaco, en una concentración de 4 mcg/ml y se analizaron a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No.18.

Por medio de la tabla No.18, podemos observar que hay degradación de la metildopa en plasma, ya que al cabo de 24 horas, a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$  C), la muestra ha perdido alrededor del 20% del fármaco; en refrigeración ( $4^{\circ}$  C) se ha perdido aproximadamente un 7% y en congelación ( $-10^{\circ}$  C) un 5%, en el mismo lapso de tiempo.

Con estos resultados podemos asegurar que las condiciones adecuadas para almacenar las muestras plasmáticas de metildopa es a temperatura de congelación ( $-10^{\circ}$  C), ya que aunque se presenta degradación, no es tan significativa como la que se obtiene a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$  C); aún así se debe tratar que el procesamiento de las muestras plasmáticas sea lo más rápido posible.

En la figura No. 20 se presenta la gráfica en donde se observa la magnitud de la degradación del fármaco, a las diferentes temperaturas.

<b>Tiempo</b> <b>Temp.</b>	<b>Temperatura Am- biente 20 °C</b>	<b>Refrigeración 4 °C</b>	<b>Congelación -10 °C</b>
0.0 Hrs.	99.36	99.36	99.36
1.0 Hr.	92.40		
3.0 Hrs.	87.34	98.67	
6.0 Hrs.	81.25	95.51	
24 Hrs.	67.25	92.79	95.49
96 Hrs.		81.08	92.64

**Tabla No. 18** Estabilidad de la Muestra en Plasma, reportada en porciento de recuperación del fármaco.

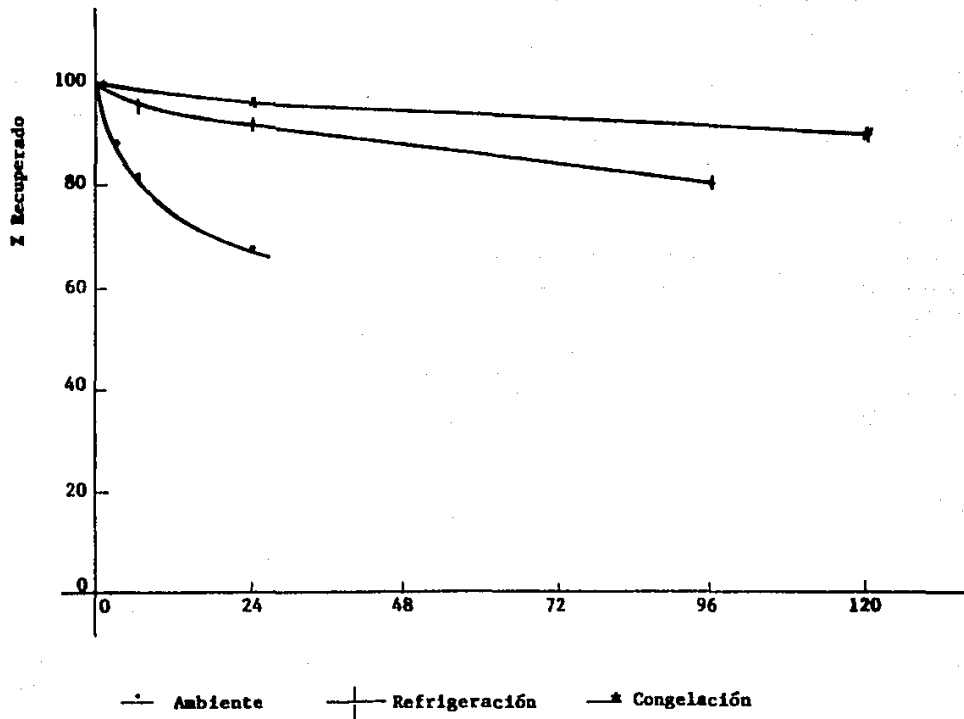


Figura N° 20 Estabilidad de la muestra en plasma

## 9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Se procesaron muestras plasmáticas adicionadas con el fármaco, a una concentración de 4 mcg/ml, se almacenaron y analizaron a diferentes tiempos. Los resultados se presentan en -- la tabla No. 19.

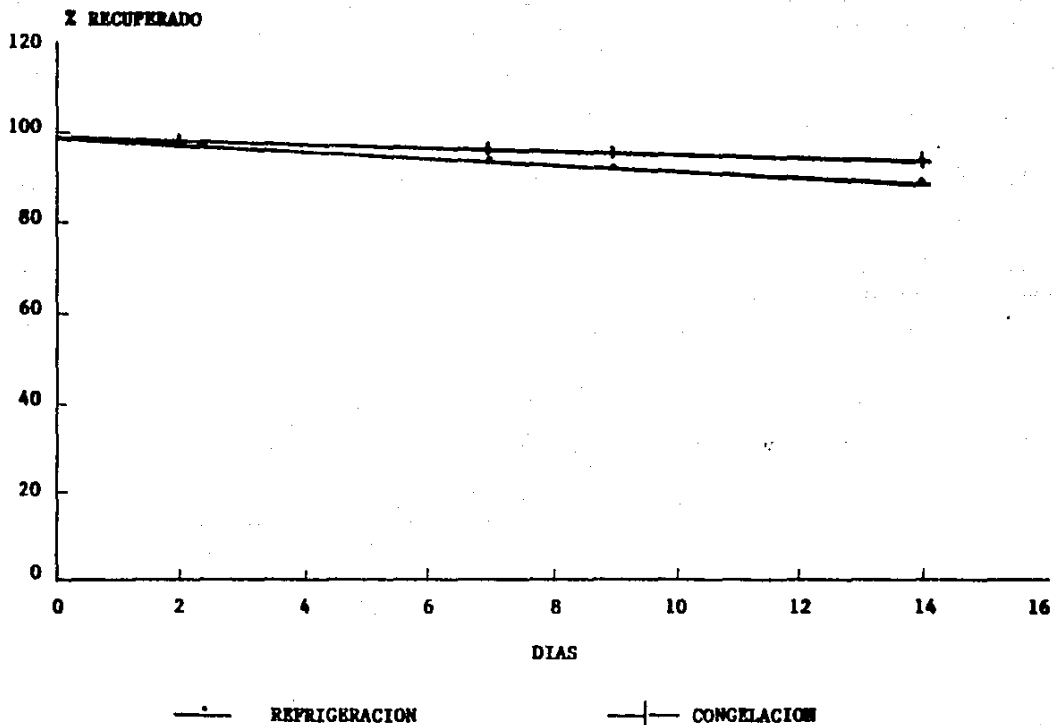
Analizando la tabla No. 19 podemos observar que, la metildopa es más estable en la muestra ya procesada, porque -- aunque se presenta degradación, ésta no es mayor del 10%, -- cuando la muestra se mantiene en congelación ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) durante 14 días y del 15% cuando la muestra se conserva en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ), durante este mismo lapso de tiempo.

Si comparamos la estabilidad de la muestra plasmática y la de la muestra ya procesada, vemos que la segunda es más estable y que por lo tanto, cuando no se pudiera hacer el análisis de la muestra inmediatamente, sería conveniente procesarla y almacenarla a temperatura de congelación.

En la figura N<sup>o</sup> 21 se presenta la gráfica en donde se observa la magnitud de la degradación del fármaco, cuando la muestra se encuentra ya procesada y almacenada a diferentes temperaturas.

Días Temp.	Refrigeración 4 °C	Congelación -10 °C
0	98.41	98.41
2	96.23	98.21
7	92.53	95.93
9	91.22	93.54
14	86.67	91.36

Tabla No. 19 Estabilidad de la Muestra Procesada, reportada en porciento de recuperación del fármaco.



**Figura N° 21 Estabilidad de la muestra procesada**

## 10. TOLERANCIA DEL SISTEMA

Se probaron dos modificaciones a la fase móvil, variando a cada una de ellas 0.5 unidades de pH.

Para analizar la tolerancia del sistema se toma como indicador la Resolución del cromatograma. La fórmula para obtener el valor de resolución es la siguiente:

$$\text{Resolución} = \frac{2(T_2 - T_1)}{W_1 + W_2}$$

donde: T = tiempo de retención (minutos).

W = ancho del pico (centímetros).

1 = pico de referencia.

2 = pico de metildopa.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 20, en donde podemos observar que la resolución no se ve grandemente afectada al hacer la variación en el valor de pH de la fase móvil, aunque a un valor de pH de 4.0, si hay una disminución en la resolución, lo que se deberá tomar en cuenta al reproducir el método.

Es conveniente señalar, que como no se utilizó estándar interno, en el método, para cuantificar la



pH de la fase móvil	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	Resolución
<u>3.0</u> HClO <sub>4</sub>	3.13	10.75	0.4	1.66	7.62
Plasma	4.10	10.75	1.5	1.80	3.993
<u>3.5 (*)</u> HClO <sub>4</sub>	3.46	12.66	0.4	1.80	7.82
Plasma	8.00	12.40	1.2	1.90	3.00
<u>4.0</u> HClO <sub>4</sub>	3.50	10.58	0.5	1.60	6.74
Plasma	6.83	10.36	1.0	1.70	2.61

(\*) Condiciones normales de uso.

Velocidad de carta = 2 cm/min.

Tabla No. 20 Tolerancia del Sistema

resolución se tomó en cuenta:

- a. Cuando se utilizó curva estándar en  $\text{HClO}_4$ , se tomó el último pico de la señal de éste como el pico de referencia para calcular la resolución.
- b. Cuando se utilizó curva estándar en plasma, se tomó el pico más cercano al de la metildopa, siendo éste el de un componente del plasma, para utilizarlo como pico de referencia al calcular la resolución.

Por este motivo, se está reportando la resolución en los dos medios en que se puede encontrar el fármaco, dependiendo esto de la prueba que se esté realizando.

**CAPITULO VI**

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método adecuado a nuestras condiciones, sin un proceso de manipulación complicado y rápido, que es factible de ser utilizado, posteriormente, en el monitoreo del fármaco.
2. El método desarrollado se encontró ser:
  - Lineal. Con un coeficiente de correlación de 0.9997.
  - Preciso. Con un coeficiente de variación de 2.764%.
  - Exacto.
  - Selectivo. No presentando interferencias con los componentes del plasma.
  - Reproducible.
3. La concentración mínima detectada fué de 125 ng/ml.
4. La tolerancia del sistema es aceptable en un rango de + 0.5 unidades de pH.
5. Las muestras plasmáticas se degradan un 20%, en 24

horas a temperatura ambiente, 4 días a 4 ° C y 14 días a -10 ° C.

6. Las muestras plasmáticas ya procesadas, presentan mayor estabilidad, observándose una degradación de aproximadamente el 10%, en un lapso de 14 días, tanto a 4 ° C como a -10 ° C.

**CAPITULO VII**

**APENDICE A**

**MSO**

LABORATORIOS PROSALUD, S. DE R.L. DE C.V.

ANÁLISIS  
DE  
CADA MUESTRA

CERTIFICADO DE ANALISIS

SP1423 Metildopa U.S.P.

Lote: 90104

ESPECIFICACIONES

RESULTADOS

Color	Blanco
Olor	Sin olor
Forma	Polvo Fino
Apariencia	Limpia
Identidad (U.V.)	Pasa prueba
Agua (K.F.)	11.67%
Ensayo (B.S.)	100.12%
Identidad (I.R.)	Pasa prueba
Rotación Específica	-26.36°

Atentamente,

  
QFB. MA. GUADALUPE ZAMORA S.  
Gerente de Control de Calidad.

**CAPITULO VIII**

**BIBLIOGRAFIA**



## B I B L I O G R A F I A

- 1.- AMA Drug Evaluations.  
American Medical Association  
4a. Edition                    USA  
pág. 570-571                    (1980)
- 2.- Anton, A.H. and Sayre, D.F. "A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines". J.Pharmacol. Exp. Ther. 138, 360-375 (1962).
- 3.- Asmus, P.A. and Freed, C.R. "Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and their congeners with simple acids as ion-pairing reagents". J.chrom. 169, 303-311 (1979).
- 4.- Clarke, E.G.C. Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press London.  
pág. 422-423 (1988).
- 5.- Cooper, M.J., O'Dea, R.F. and Mirkin, B.L. "Determination of methyldopa and metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". J. chrom. 162, 601-604 (1979).
- 6.- Drill's Pharmacology in Medicine. Edited by Dipalma, J.R.  
4th edition. MC. Graw-Hill Book Company. USA. pág.701, -  
859-860 (1971).

- 7.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.  
5a. Edición. SSA. México. pág. 767-768 (1988).
- 8.- Ghanekar, A.G. and Das Gupta, V. "Applications of Paired -  
Ion Hihg-Pressure Liquid Chromatography to Catecholamines  
and Phenylephrine". J. Pharma. Sci. 67 [9 1247-1250(1978).
- 9.- Goldstein,D.S. et al. "Simultaneous measurement of Dopa, -  
Dopac and catecholamines in plasma by liquid chromatography  
with electrochemical detection". Elec. Detn. Sep. Review.  
II [1 1-3 (1986).
- 10.- Goldstein,D.S. et al. "Validity and reliability of liquid  
chromatography with electrochemical detection for measuring  
plasma levels of norepinephrine and epinephrine in man.  
Life Sci. 28, 467-475 (1981).
- 11.- Goodman, A, Goodman,L.S. and Gilman, A. The Pharmacological  
Basis of therapeutics. 6a. Edición. Mac Millan Publishing  
C.O., INC. USA 793-797 (1980).
- 12.- Gouveia, W.A. et al.- editors. Clinical Pharmacy and clinical  
Pharmacology. Proceeding of an International Symposium  
Boston, Mass. USA 93-123 (1975).
- 13.- Guerra, J. "Validation of Analytical Methods by FDA Labora  
tories". Pharm. Technol. 153-169 (1986).
- 14.- Herfindal,E.T. and Hirschman, I.L.J. Clinical Pharmacy and  
Therapeutics. Ed.The Williams and Wilkins Company. USA.  
202-206 (1975).

- 15.- Irman, E.L. et al. "General Method Validation Guidelines - for Pharmaceutical Samples". J.Chrom. Sci. 25, 365-369 -- (1987).
- 16.- Jenner, D.A., Brown, M.J. and Lhoste, F.J.M. "Determination of alfa-metildopa, alfa-metilnoradrenaline, noradrenaline - and adrenaline in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". J. Chrom. 224, 507-512 (1981).
- 17.- Kafadar, K. "Some basic statistical methods for chromatographic data". Adv. Chrom. 24, 1-34 (1984).
- 18.- Kim, B.K. and Koda, R.T. "Fluorometric Determination of Methylidopa in biological fluids". J.Pharm. Sci. 66 [11] -- 1632-1634 (1977).
- 19.- Kochack, G.M. and Mason, M.D. "Determination of free methylidopa in plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection". J.Pharm. Sci. 69 [8] 897-900 (1980).
- 20.- Krstulovic, A.M. and Powell, A.M. "Use of native fluorescence measurements and stopped-flow scanning technique in the high-performance liquid chromatographic analysis of catecholamines and related compounds". J.Chrom. 171, 346-356 (1979).
- 21.- Kwan, K.C. et al. "Pharmacokinetics of methylidopa in man". J. Pharm. Exp. Ther. 198, 264-277 (1976).

- 22.- Laverty, R. and Taylor, R.M. "The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: Improvements and extensions to the hydroxyindole technique". Anal. Biochem. 22, 269-279 (1968).
- 23.- Lawrence, F.J. Organic trace analysis by liquid chromatography. Academic Press. 84-92 (1981).
- 24.- Litter, M. Farmacología Experimental y Clínica. Ed. El Ateneo Buenos Aires, Arg. 4 Ed. (1980).
- 25.- Manual de cromatografía de líquidos de alta resolución de Beckman, Co.
- 26.- Manual Merck de diagnóstico y terapéutica. Editado por Merck Sharp and Dohme Research Laboratories. 6a. edición. 419-426 (1978).
- 27.- Mell, L.D. and Gustafson, A.B. "Urinary free methyldopa - determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography". Clin. Chem. 24 [1] 23-26 (1978).
- 28.- Merck Index and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Published by Merck and Co., INC. USA. 10 th ed. 867-868 (1983).
- 29.- Nissinen, E. and Taskinen, J. "Simultaneous determination of carbidopa, levodopa and 3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid - using-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". J. chrom. 231, 459-462 (1982).

- 30.- Ong, H., Sved, S. and Beaudoin, N. "Assay and stability of  $\alpha$ -metildopa in man using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". J.Chrom. 229, 433-438 (1982).
- 31.- Orland, M.J. and Saltman, R.R. Manual de Terapéutica Médica. Dept. of Medicine. Washington University. School of Medicine. St. Louis Missouri. 6th edition. Salvat edit. 430-434 (1986).
- 32.- Prado, V.R. "Farmacología clínica de los antihipertensivos". Rev. Fac. Med. 28 2 105-115 (1985).
- 33.- Sadée, W. and Beelen, G.C.M. Drug level monitoring. Analytical techniques, metabolism and pharmacokinetics. A Wiley-Interscience Publication. USA. 334-337 (1979).
- 34.- Scratchley, G.A. et al. "High-performance liquid chromatographic separation and detection of catecholamines and related compounds". J.Chrom. 169, 313-319 (1979).
- 35.- Smith, R.V. and Stewart, J.T. Textbook of Biopharmaceutic Analysis. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. 79-112 (1981).
- 36.- Stenbaek, O. et al. "Pharmacokinetics of methyl dopa in healthy man". J. Clin. Pharmacol. 12 2, 117-123 (1977).
- 37.- The Pharmaceutical Codex. Incorporating The British Pharmaceutical Codex. 11th edition. The Pharmaceutical Press. 559-560 (1970).

- 38.- The United States Pharmacopeia. USP XXI. The National For  
mulary. NF XVI. USA. 673-675 (1985).
- 39.- Walson, P.D. et al. "Metabolic disposition and cardiovas-  
cular effects of methyldopa in Unanesthetized Rhesus Monkeys"  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 195 1 151-158 (1975).
- 40.- Waters 460. Electrochemical Detector. Operator's Manual.