

23
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE BUPIVACAINA EN PLASMA
SANGUINEO POR CROMATOLOGRAFIA DE GASES**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S

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

**P R E S E N T A:
ROSA MARIA LOPEZ FLORES**

México, D. F.

1987



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

	Pag
I. INTRODUCCION	3
II. ANTECEDENTES	4
1. Generalidades de los anestésicos	4
2. Propiedades químicas de los anestésicos locales	5
3. Interacción anestésico local-receptor	12
4. El pH y la acción anestésica local	14
5. La Bupivacaína	17
5.1 Generalidades	17
5.2 Métodos de purificación	19
5.3 Métodos de análisis	20
6. Detectores	25
6.1 Detector de ionización de llama	25
6.2 Detector de ionización de llama alcalina	27
III. IMPLEMENTACION DEL METODO	30
1. Reactivos utilizados	30
2. Material y equipo utilizado	31
3. Discusión de la metodología	32
4. Preparación de la columna	33
5. Comportamiento de la bupivacaína en cromatografía en fase vapor	35
6. Curva de calibración para el DIL	36
7. Desarrollo metodológico del aislamiento de la bupivacaína	37

7.1	Influencia del pH en la retención de la bupivacaína en columnas de fase inversa químicamente unida	37
7.2	Influencia de la concentración de ácido tricloroacético	39
7.2.a.	En la precipitación de proteínas	39
7.2.b.	En la fase inversa químicamente unida	39
7.2.c.	En la columna de cromatografía en fase vapor	40
7.3	Procedimiento propuesto para la extracción	40
8.	Construcción de un detector de llama alcalina	41
8.1	Con una espiral de dos vueltas	41
8.2	Con una espiral de cinco vueltas	43
8.3	Sobre una base	44
9.	Calibración de una válvula micrométrica	45
10.	Evaluación de las condiciones óptimas de funcionamiento de cada detector	45
11.	Curva de calibración para el DILA	46
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	47
V.	CONCLUSIONES	72
VI.	BIBLIOGRAFIA	73

INTRODUCCION

Es importante disponer de un método sencillo y rápido que permita conocer en neonatos la concentración sanguínea de los anestésicos locales con precisión, ya que algunos síntomas indeseables o el retraso en la evolución durante los primeros días de vida pueden ser originados por una concentración relativamente alta (1), pudiendo incluso sobrevenir la muerte.

Las concentraciones a las cuales se encuentran los anestésicos locales en el plasma sanguíneo son muy pequeñas, del orden de $\mu\text{g/ml}$; si se toma en cuenta que la determinación desea realizarse en neonatos, el volumen original de la muestra necesitará también ser pequeño, del orden de las décimas de mililitro; todo lo cual impone restricciones tanto al método de extracción como al de análisis.

En este trabajo se describe un nuevo método para aislar bupivacaína a partir de muestras sanguíneas usando volúmenes pequeños.

La cromatografía gas-líquido es la técnica de análisis empleada para realizar las determinaciones cuantitativas.

Se incluye una discusión sobre la construcción de un detector de llama alcalina y la evaluación de los parámetros que afectan su sensibilidad.

ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES DE LOS ANESTESICOS

Los anestésicos son drogas que bloquean la conducción nerviosa produciendo una pérdida temporal, ya sea parcial o general de la sensibilidad.

Existen dos clases de anestésicos: generales y locales. Los primeros no son específicos, ya que no existe relación entre estructura y actividad(2); como su nombre lo indica, producen pérdida de la sensibilidad en todo el organismo (3). Los anestésicos locales causan insensibilidad exclusivamente en la zona inervada, y a partir de su punto de aplicación, actúan sobre cualquier parte del sistema nervioso y tipo de fibra nerviosa; son específicos porque interactúan con receptores selectivos que se encuentran en la membrana celular (fig. 1), para ser transportados al interior de la célula nerviosa y llegar a su sitio de acción (2). Además de bloquear la conducción nerviosa, poseen acción secundaria, e indeseable que ocurre debido a la absorción sistémica del fármaco en el torrente sanguíneo, el cual lo lleva a todo el organismo interfiriendo en la función de todos los órganos.

Este tipo de acción es indeseable debido a que produce múltiples reacciones tóxicas en el sistema nervioso central y en el aparato cardiovascular. A concentraciones suficientemente elevadas, pueden producir inquietudes, temblores y convulsiones seguidas de depresión, palidez, taquicardia, síncope y coma; ocasionando inclusive la muerte, generalmente por insuficiencia respiratoria (4).

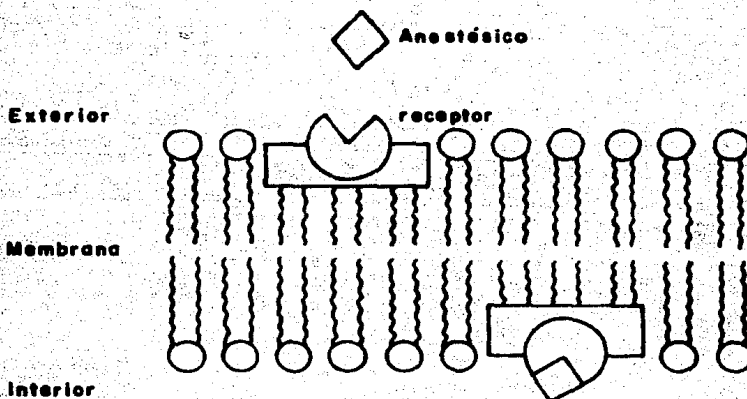


Fig 1 Interacción droga-receptor. Transporte del anestésico al interior de la célula nerviosa

Los requisitos más importantes con los que debe cumplir una molécula para ser útil como anestésico local son: su acción debe ser completamente reversible, con recuperación de la función nerviosa total y sin pruebas de daños estructurales (4), no ser demasiado tóxica, hidrosoluble y termicamente estable en soluciones acuosas (5).

2. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS ANESTÉSICOS LOCALES

Químicamente pueden ser divididos en diferentes grupos, de los cuales los de mayor importancia clínica y los más frecuentemente

usados son los ésteres (principalmente los derivados del ácido benzóico y aminoalcoholes) (6) y las anilidas (7). Estos últimos son preferidos por su mayor estabilidad que puede explicarse por la presencia de los dos metilos en la posición orto (fig.2) (7).

Muy probablemente cada uno de los diferentes grupos provocan el bloqueo de la propagación de los impulsos a lo largo de la fibra nerviosa por diferentes mecanismos de acción farmacológica. Es posible que para los anestésicos de los tipos éster y anilida, el mecanismo de acción sea el mismo, debido a que las distribuciones de carga y densidades electrónicas son muy parecidas en ambos tipos de moléculas (6).

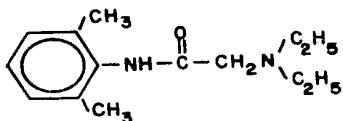
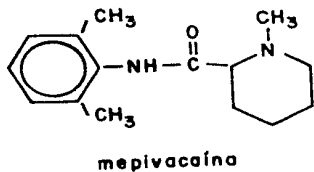
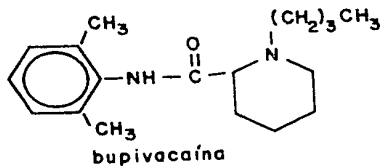
El bloqueo causado se debe a la estabilización del potencial de la membrana en la fibra nerviosa, al disminuir la permeabilidad al intercambio de los iones sodio y potasio (7).

Los anestésicos locales derivados tanto de los ésteres del ácido benzóico como de la anilida, poseen dos grupos funcionales: amino ($-NH_2$) y carbonilo ($C=O$) que le confieren a la molécula la acción característica de estas drogas (fig. 2).

El átomo de oxígeno del carbonilo atrae fuertemente electrones, y crea un dipolo cuya densidad de carga positiva se encuentra en el átomo de carbono. En este tipo de drogas, la función carbonilo se encuentra unida directamente al anillo aromático o por medio de un nitrógeno formando una amida (fig. 2).

En el caso de los ésteres del ácido benzóico, la conjugación de los dobles enlaces del anillo con el grupo carbonilo dan origen a estructuras resonantes que contribuyen a la formación de un mayor dipolo (figs. 2b y 3a).

a) Derivados de las Anilidas



b) Derivados del ácido Benzoico

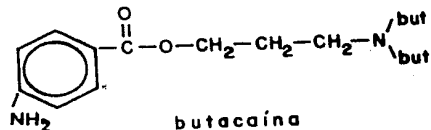
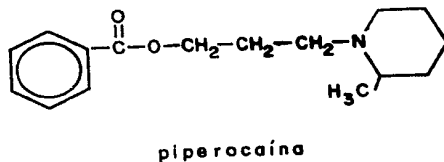
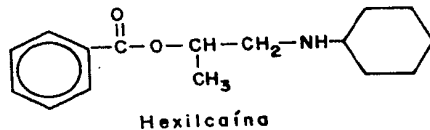


Fig 2 Moléculas con actividad anestésica local derivadas del ácido benzoico y de las anilidas.

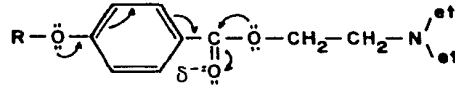
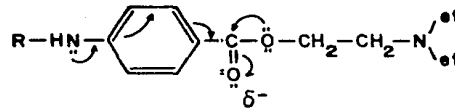
La introducción de grupos donadores de electrones tales como: $-NH_2$, $-NR$, etc en las posiciones orto o para en la entidad del ácido benzóico, incrementan la densidad electrónica en el sistema conjugado, aumentando la carga negativa en el oxígeno del carbonilo. El efecto contrario se obtiene si se introducen en el anillo grupos que atraen electrones, tal como: $-NO_2$ (fig. 3).

Si el sistema conjugado de dobles enlaces entre el anillo y el carbonilo se interrumpe con la introducción de uno o dos átomos de carbono colocados entre éstos, la acumulación de carga disminuye (fig. 3d y 4f). La sustitución en el átomo de carbono del amino alcohol más cercano a la función éster incrementa la fuerza del dipolo en el carbonilo.

La interacción droga-receptor se lleva a cabo mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ellos (9), por lo que es deseable una alta densidad electrónica en el oxígeno del carbonilo. Esto explica la correlación encontrada experimentalmente entre el incremento de la actividad anestésica y un aumento en el dipolo del grupo carbonilo, como prueba de ello puede mencionarse el que compuestos como la urea, molécula que posee una alta tendencia a la formación de puentes de hidrógeno, actúa como un antagonista para muchos anestésicos locales (8).

La función amina también contribuye a las interacciones de éste tipo entre el anestésico local y su receptor. Si es eliminada de una molécula que posee actividad anestésica, se presenta una disminución drástica de su acción.

a) FAVORABLE



b) DESFAVORABLE

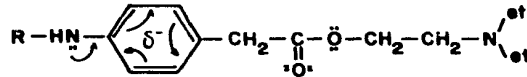
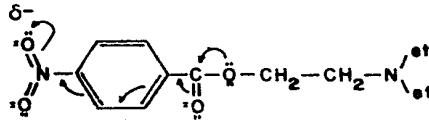
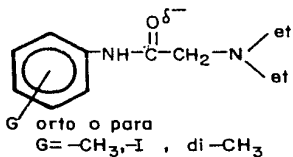
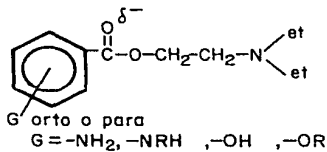
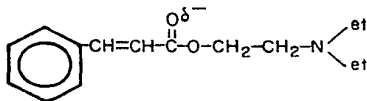
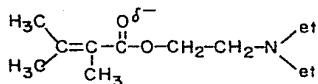


Fig. 3 - Efectos mesoméricos en moléculas con acción anestésica local. Las flechas indican las posibles contribuciones electrónicas para la formación de un dipolo mayor.

a) FORMAS ACTIVAS



b) FORMAS INACTIVAS

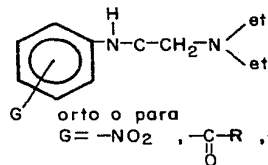
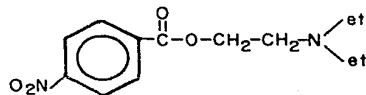
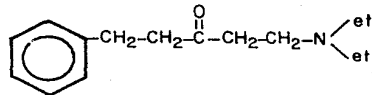
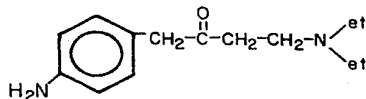


Fig 4 Influencia de los grupos acilo y anilido en la actividad anestésica local. Grupos donadores de electrones en las posiciones orto, para, o dobles enlaces alfa al carbonilo, contribuyen fuertemente a la formación de un dipolo en el carbonilo.

En la elección del tipo de sustituyentes sobre el grupo amino hay una mayor libertad; por ejemplo: dietilamino, piperidino, pirrolidino, etc. (fig. 5).

La cuaternización de este grupo funcional, como regla general produce una fuerte disminución en la acción anestésica, excepto cuando los sustituyentes son muy grandes, como bencilo por ejemplo, lo que se debe muy probablemente a la dificultad de transportar la especie iónica a través de la membrana mas que a una disminución real en su potencia anestésica (8).

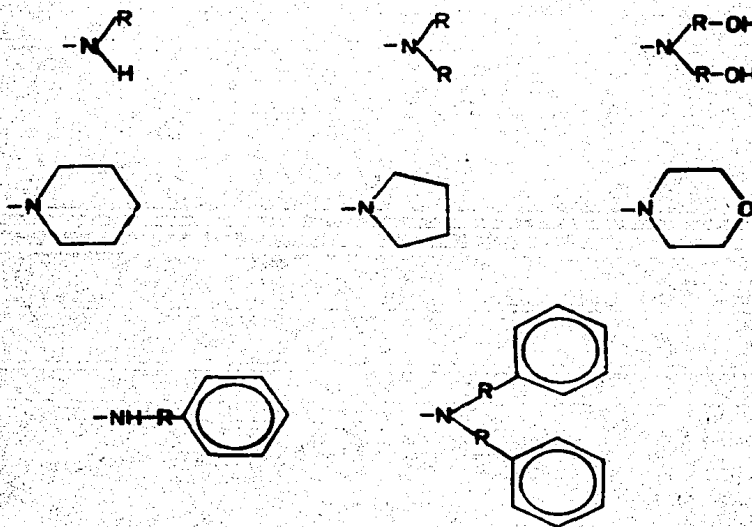


Fig 5 Diversos sustituyentes sobre el grupo amino en compuestos con acción anestésica local

3. INTERACCION ANESTESICO LOCAL- RECEPTOR

Para entender el mecanismo de acción de un anestésico local es importante conocer las fuerzas de interacción que lo enlazan con su receptor. Se asume que son las mismas que están involucradas en las interacciones simples entre moléculas.

El grupo amino presente en el fármaco se encuentra ionizado a pH fisiológico y mediante una interacción electrostática guía a la molécula hacia su receptor, para que a una distancia menor actúen otros tipos de fuerzas intermoleculares: ion-dipolo, dipolo-dipolo, de Van der Waals y puentes de hidrógeno que son los responsables de la formación del complejo anestésico local-receptor (2). Las dos primeras se manifiestan por la presencia de átomos de electronegatividad distinta a la del carbono, tales como nitrógeno y Oxígeno, causando una distribución asimétrica de la densidad electrónica.

Las fuerzas de Van der Waals son la forma más común de interacción intermolecular, que se derivan de la polarización inducida entre sí cuando se aproximan dos moléculas. Estas fuerzas son muy débiles, por lo cual la distancia a la que se manifiestan es relativamente corta y oscila entre 4 y 6 Å. Si la distancia intermolecular es mayor de dicho intervalo no hay interacción, y si es menor, la repulsión entre cargas iguales es mayor que la atracción entre cargas opuestas(10).

Este tipo de fuerzas tienen un tiempo de duración muy corto (10^{-6} seg.), y sin embargo es importante para la estabilidad de sistemas biológicos.

Un puente de Hidrógeno se forma cuando un átomo de Hidrógeno enlazado covalentemente a un heteroátomo (más electronegativo) se une a otra molécula (por medio de un grupo o de un heteroátomo más electronegativo), originando un enlace de tipo electrostático que tiene como característica ser muy débil y de longitud relativamente grande(10). Esta situación se representa de la siguiente manera: $X-H \cdots Y$.

De acuerdo con algunos autores(11) los anestésicos locales forman un complejo con la tiamina que se estabiliza con los enlaces antes descritos. Al interactuar con las macromoléculas de la membrana celular éste complejo provoca alteraciones en el transporte iónico a través de ésta, dando como resultado la pérdida temporal de la sensibilidad.

Un ejemplo de complejo anestésico local-receptor se muestra en la fig. 6.

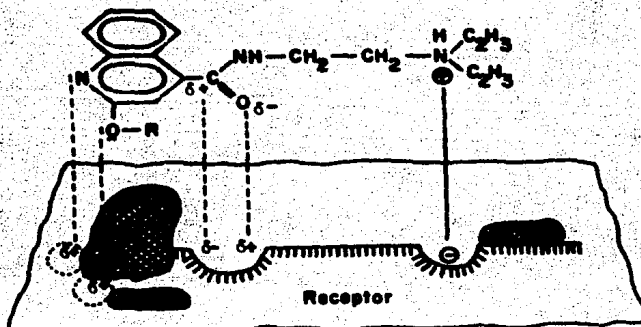


Fig.6 Interacción de dibucaina ($R=C_4H_9$) con su receptor

4. El pH Y LA ACCION ANESTESICA LOCAL

Para comprender el efecto del pH sobre la acción anestésica local es conveniente considerar algunos puntos importantes:

- Los anestésicos locales son ácidos o bases débiles de Brønsted.
- El pKa (grado de disociación) del grupo amino de los anestésicos derivados tanto de los ésteres del ácido benzóico como de la anilida (fig. 2) varía entre 7.5 y 9.0 (4).
- El pH en el fluido extracelular es de 7.2 y ligeramente inferior en el citoplasma (5).
- La correlación entre pH, pKa y la concentración de las especies está determinada por la ecuación de Henderson-Hasselbach.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left[\frac{B}{HB^+} \right]$$

- Una de las especies del par conjugado ácido-base es neutra y liposoluble. Para los anestésicos tratados en este trabajo la especie neutra es la base.
- La droga debe penetrar la membrana celular para llegar a su sitio de acción.
- La naturaleza lipídica de la membrana celular facilita el transporte de drogas liposolubles a través de ella.

Estando presentes la especie iónica y la no-ionizada a ambos lados de la membrana celular, surge la pregunta acerca de cuál de las dos especies es la que posee actividad biológica. Para responderla se han realizado numerosos experimentos en fibras nerviosas que intentan dilucidar la influencia del pH en la acción anestésica, sin que los resultados sean concluyentes acerca de cuál de las formas es la especie activa. De estos experimentos ha podido sustraerse lo siguiente: a pH fisiológico la especie iónica predomina casi en un 100% para drogas que poseen un valor alto de pKa siendo imposible para estas alcanzar la biofase; mientras que las drogas que poseen un valor pequeño de pKa se encuentran en forma no-iónica, pero son inactivas a pesar de que pueden llegar hasta la biofase. La permeación de la membrana se da con la droga neutra, mientras que la interacción con receptores específicos se da con la droga ionizada. Todo lo cual condiciona el rango de valores de pKa para que una sustancia sea biológicamente activa, dado que el pH intracelular no puede cambiarse sin lesionar gravemente las funciones intrínsecas de la célula (8).

La influencia del pH en la acción anestésica no se restringe exclusivamente a la interacción droga-receptor. El grado de ionización de la droga, la velocidad de permeación y la distribución del anestésico en los fluidos intercelular e intracelular son parámetros que también dependen del pH (7).

5. LA BUPIVACAÍNA

5.1. GENERALIDADES

La bupivacaína (1 butil-N-(2,6 dimetil fenil), 2-piperidincarboxamida), cuyas características estructurales cumplen con los requisitos mencionados para que un compuesto posea actividad anestésica, pertenece al tipo de las anilidas (fig. 2a), es usada frecuentemente en intervenciones quirúrgicas y partos. Las vías más comunmente usadas para suministrarla a parturientas son la epidural y la subaracnoidea. Por ser altamente liposoluble, atraviesa fácilmente la placenta (12,13) provocando en el feto las reacciones tóxicas típicas.

La dosis normalmente suministrada de clorhidrato de bupivacaína es de 3 mg/Kg de una disolución acuosa al 0.25%. Las concentraciones máximas sanguíneas debidas a la absorción sistémica del fármaco se alcanzan entre 15 y 20 min. después de su administración y son del orden de 1.6 ug/mL en sangre arterial y 1.5 ug/mL en sangre venosa (fig.8) (14). Al medir la concentración de la droga en el cordón umbilical y en la sangre venosa materna, se encontró que 40 min después de su aplicación se establece un equilibrio entre la circulación materna y fetal (15). El tiempo medio de eliminación es de 7.3 a 12 hr. (16). Los síntomas de toxicidad aparecen cuando las concentraciones sanguíneas alcanzadas son mayores a 4 ug/mL de sangre (14).

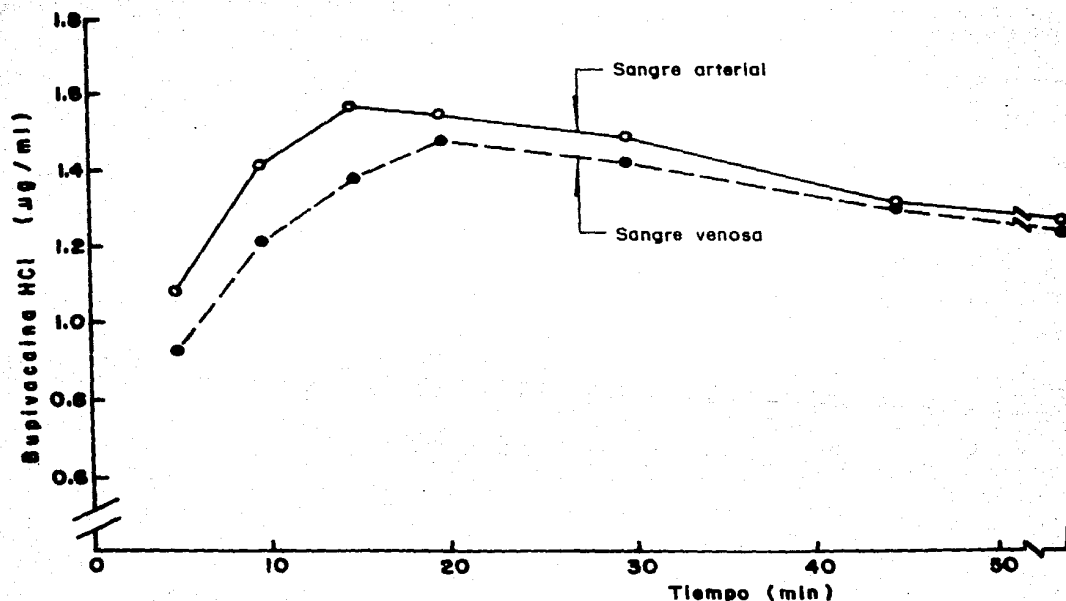


Fig 8 Niveles de Bupivacaina en sangre venosa y arterial de infantes. Reproducción hecha del artículo de Eyres et al.

5.2 METODOS DE PURIFICACION

En la determinación cuantitativa de bupivacaína se distinguen dos etapas fundamentales: a) el proceso de aislamiento a partir de la muestra sanguínea y b) el análisis propiamente dicho.

La mayoría de los procesos reportados para el aislamiento de la bupivacaína requieren extracciones líquido/líquido a diferente pH, por lo que el trabajo químico previo a la cuantificación es muy laborioso y consume mucho tiempo; el volumen de recuperación es entre 7 y 10 mL, exceptuando uno de los trabajos, la cantidad de muestra requerida es relativamente grande (2 mL aproximadamente).

La propiedad de éste compuesto que se aprovecha en el proceso de aislamiento es la dependencia de su solubilidad con el pH del medio acuoso. A valores de pH menores que su pK_a (8.1) (17) la especie está en forma iónica muy soluble en disoluciones acuosas, y a valores mayores, la especie que predomina es la base libre y por tanto soluble en disolventes orgánicos.

De forma general estos métodos consisten en:

1.- Precipitación de la proteína con ácido tricloroacético, separación del sobrenadante y alcalinización con sosa 1 M, y extracciones sucesivas con disolventes orgánicos tal como éter (18).

2.- Precipitación de la proteína con sosa, centrifugación, separación del sobrenadante y extracciones sucesivas con disolventes orgánicos como éter y cloroformo (19,20,21,22,23,24).

5.3 METODOS DE ANALISIS

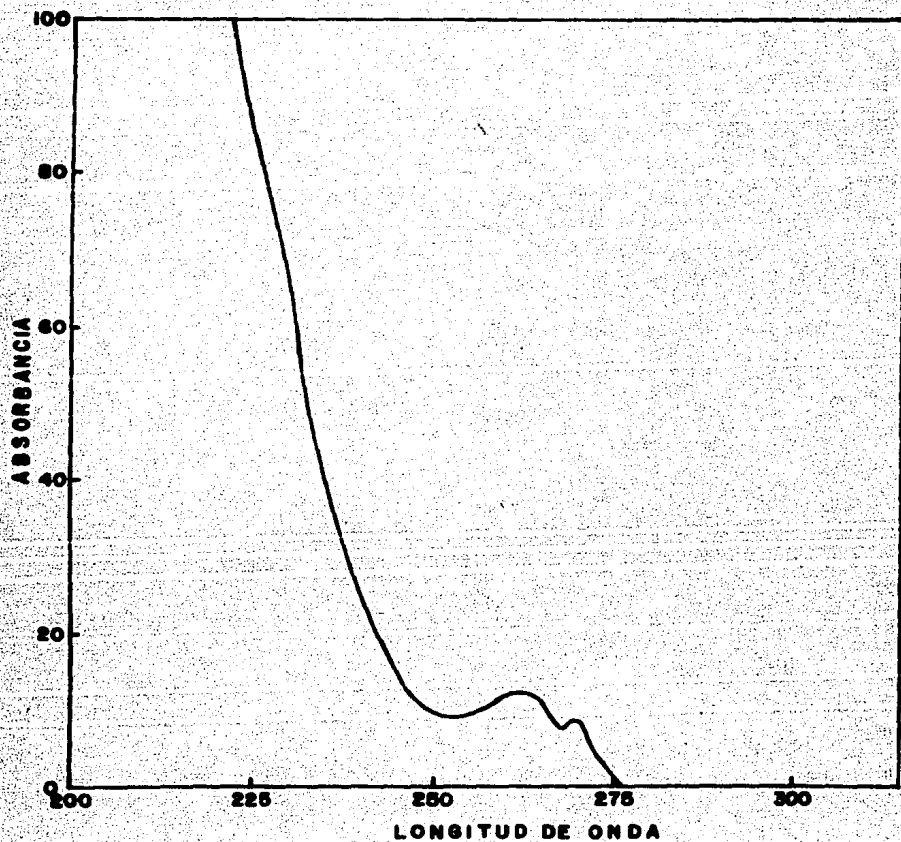
Los métodos de análisis reportados en la literatura son tres:

1.- El método colorimétrico es el más antiguo y consiste en la formación de un compuesto colorido con anaranjado de metilo(12,13), pero no es lo suficientemente sensible ni específico, por lo que en la actualidad no se utiliza.

2.- La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ha sido escasamente usada debido a la baja absorptividad de la bupivacaína en el ultravioleta arriba de los 220 nm; las longitudes de onda de máxima absorptividad son 271 nm y 262 nm con coeficientes de absorptividad molar muy pequeños para realizar un análisis cuantitativo (las absorptividades para una disolución del clorhidrato al 0.04% en metanol son 0.43-0.48 y 0.53-0.58 respectivamente) (Fig. 9)(26). Este problema fue resuelto parcialmente con un detector de longitud de onda variable y realizar la determinación a 205 nm (19,24,27), sin embargo, dada la alta absorptividad en esta región(28) de los disolventes más comúnmente usados (metanol y acetonitrilo), es difícil realizar análisis cuantitativos suficientemente precisos y confiables.

3.- La cromatografía en fase vapor es, de acuerdo a la literatura consultada, el método más adecuado para analizar no solamente bupivacaína, sino todos los anestésicos análogos a ella, utilizando soportes lavados con ácido y posteriormente silanizados para evitar al máximo la adsorción y descomposición de la muestra (tabla I) (29).

Las fases reportadas para realizar la separación cromatográfica son todas del tipo sílica y sus diferencias son principalmente su estabilidad térmica y polaridad (tabla II) (29).



*Fig 9 Espectro de absorción en el UV de Clorhidrato de Bupivacaína.
262 y 271 son las longitudes de onda de máxima absorbancia
Metanol fué el disolvente empleado.*

Soporte	categoria	tratamiento		mall	Ref.
Chromosorb WHP	celita	lavada con ácido	DMCS	80/100,100/120	20 21 25
Chromosorb G	celita	"	"	80/100	23 24
Diatoport S	celita	"	"	80/100	18
Gas Chrom Q	celatom	" lavada con Base	"	100/120	19 22

Tabla I Soportes utilizados para la determinación de anestésicos locales del tipo anilida por C.G.

Fase	R	R'	Tipo	viscosidad cs a 25°C	Temp. límite °C Mín. / Max.	Ref.
OV-17 [50% fenilo]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	fluido	1300	0 / 375	19 20 21 22 25
SE-30	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	goma		50 / 300	18 23 24
OV-101	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	fluido	1200	0 / 350	
E-301	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	goma		0 / 125	23

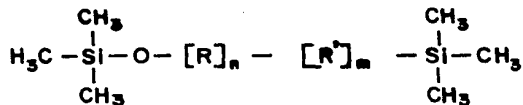


Tabla X Fases utilizadas en la determinación de anestésicos locales del tipo anilida por C.G

6. DETECTORES

En la cromatografía en fase vapor los detectores juegan un papel preponderante, puesto que son dispositivos que nos dan una señal eléctrica proporcional a la cantidad de muestra de cada uno de los componentes.

En la detección de compuestos que contienen átomos de nitrógeno pueden emplearse dos tipos diferentes: ionización de llama (DIL) e ionización de llama alcalina (DILA).

6.1 DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA.

Es el más comunmente usado en la cromatografía en fase vapor debido a que:

- Responde a todos los compuestos orgánicos, con una sensibilidad relativamente alta.
- No responde a compuestos comunmente presentes como : agua, bióxido de carbono y aire.
- Los cambios de presión, temperatura y flujos de los gases tienen un efecto mínimo en él.
- 400°C es la temperatura límite a la cual puede ser operado
- Es muy estable .
- El rango de concentraciones para el cual la respuesta es lineal es muy amplio.
- No requiere de gases costosos.
- Es simple de operar.

Su principio de funcionamiento se basa en la correlación que guardan la concentración de las partículas cargadas dentro de un gas y la conductividad eléctrica de éste. A partir de la columna, los compuestos orgánicos son introducidos en la llama, donde se queman produciendo las especies iónicas. Estas originan una corriente eléctrica directamente proporcional a su concentración cuando se aplica una diferencia de potencial entre el colector y el vástago del detector (fig 10). La corriente generada es muy pequeña (10^{-8} a 10^{-12} amp), por lo que requiere amplificación en un electrómetro (30).

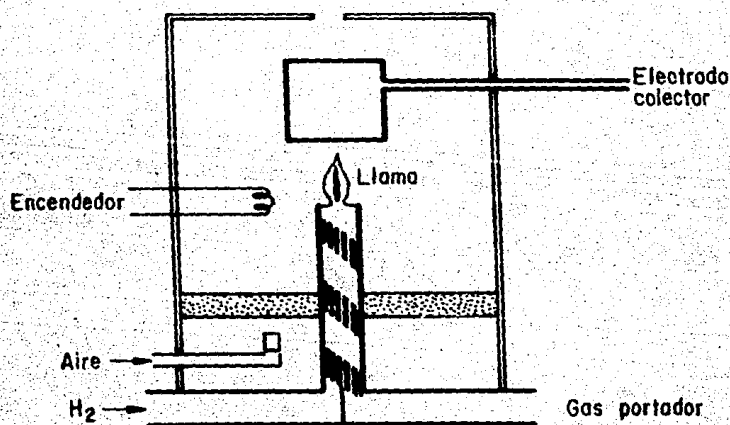


Fig 10 Esquema del detector de ionización de llama

6.2 DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA ALCALINA.

El detector de ionización de llama alcalina (DILA) es selectivo y se usa principalmente en el análisis de trazas de compuestos que poseen heteroátomos como nitrógeno y fósforo. Cuando está presente la sal de un metal alcalino (31) el detector de llama convencional incrementa su respuesta hacia compuestos que tienen ese tipo de átomos.

La sal volatilizada por calentamiento, llega a la llama en donde se ioniza produciendo una corriente constante. La presencia de compuestos que contienen los átomos ya mencionados induce un aumento considerable en la cantidad de los iones de la sal. Se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar éste fenómeno sin que ninguno lo haga de forma satisfactoria (32). Uno de ellos sugiere que el incremento de los iones en la llama se debe a una tasa mayor en la volatilización de la sal durante la elución de la muestra.

El otro propone un incremento en la eficiencia de la formación de iones en la llama durante la elución de la muestra sin un incremento en la velocidad de volatilización de la sal.

Se ha encontrado experimentalmente que cuando se analizan tipos distintos de compuestos la sal con la que se obtienen las mejores sensibilidades no es la misma. De forma general se ha podido inferir que la sensibilidad aumenta con el número atómico del metal, la reproducibilidad en la respuesta del detector es: $K > Rb > Cs$ y la sensibilidad al flujo de nitrógeno crece en el orden siguiente: $Rb > K > Cs > Na$.

Entre los factores que afectan la eficiencia de la ionización se pueden mencionar la pureza de la sal (33), la homogeneidad de la superficie salina (32), la temperatura del detector y la relación de los flujos de Hidrógeno/aire/Nitrógeno (31, 32, 33, 34). La relación y el flujo total de estos gases influyen a su vez en la temperatura, tamaño y forma de la llama (32). La geometría del detector es también un factor importante en su operación (34).

Para garantizar la presencia constante de los iones salinos el DIL se ha modificado de tal manera que contara con un depósito para la sal obteniéndose así un DILA (fig 11).

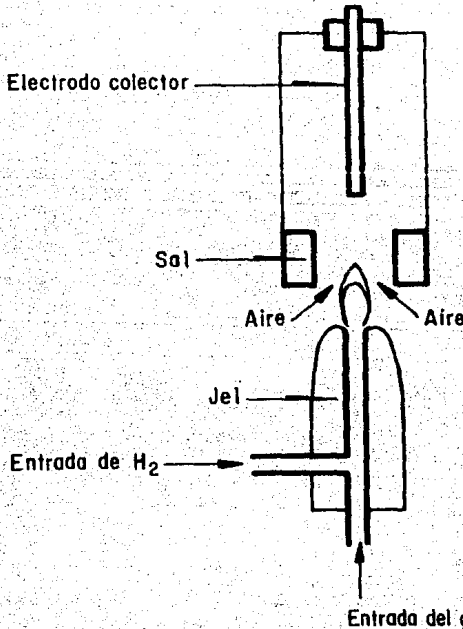


Fig 11 Detector de ionización de llama alcalina

La relación de flujo de los gases es un parámetro operacional que debe seleccionarse adecuadamente para obtener la sensibilidad óptima, y tiene que evaluarse experimentalmente, ya que es distinto para cada detector, incluso para los comerciales.

En la literatura (34,35,36) están descritas dos formas diferentes de encontrar las condiciones de máxima sensibilidad de los OILA, que de forma sucinta consisten en:

a) Fijar los flujos de los gases como si se tratara de un DIL (aire = 300 mL/min, hidrógeno = 30 mL/min, nitrógeno = 30 mL/min), ajustar el flujo del segundo hasta obtener una corriente residual de fondo que oscile entre $0.2-0.8 \times 10^{-8}$ amp; después de seleccionar la máxima sensibilidad, reajustar la concentración de hidrógeno de tal manera que la altura del pico obtenido sea de 40 a 50% de la escala para 2 ng del compuesto (35,36).

b) Fijar el flujo de los gases igual que en el caso anterior, ajustar el flujo del aire hasta obtener una corriente residual de fondo de 32×10^{-12} amp, incrementar el flujo de hidrógeno hasta que la línea base obtenida se encuentre entre el 80 y el 100% de la escala, disminuir el flujo de hidrógeno aproximadamente a la mitad (34).

IMPLEMENTACION DEL METODO

1. REACTIVOS UTILIZADOS

10 cm de alambre de platino

1 g de clorhidrato de bupivacaína proporcionado por la Dra. Melman del Hospital Infantil

50 g de cloruro de potasio R.A.

12 g de Chromosorb WHP 100/120 J. Mansville

3 g de Chromosorb WAW 100/120 J. Mansville

240 mg de OV-101 Supelco

96 mg de Apiezon L (Varian Aerograph)

50 g de malla molecular 4 Å

2 L de etanol (Merck)

60 mL de ácido clorhídrico conc. (Productos químicos Monterrey)

250 mL de tolueno Merck

120 mL de acetona J. T. Baker

180 mL de cloroformo J. T. Baker

20 mL de éter etílico J. T. Baker

500 mL de agua desionizada

3 mL de trimetilclorosilano destilado proporcionado por el Ing. J. M. Valencia de Pacsa.

12 mL de hexametildisilazano destilado proporcionado por el Ing. J. M. Valencia de Pacsa.

2. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO

- 1 equipo de destilación de vidrio con Juntas 24/40
- 10 matraces aforados de 10 mL
- 2 matraces aforados de 25 mL
- 1 matraz aforado de 500 mL
- 1 embudo büchner con alargadera
- 1 embudo de separación de 30 mL
- 20 tubos eppendorf
- 1 centrífuga clínica
- 1 agitador vortex
- 1 mechero Bunsen
- 1 mechero Fischer
- 1 crisol de platino
- 1 válvula micrométrica
- 20 columnas de extracción en fase sólida (Sep-pak C18, Waters
S190)
- 1 potenciómetro Tacussel
- 1 electrodo combinado
- 1 cromatógrafo Varian Aerograph 2100 equipado con un detector
de ionización de llama
- 1 microcomputador Integrante Spectraphisic SP 4100
- 1 jeringa de 10 ul Hamilton
- 1 microbalanza Perkin Elmer D-27
- 1 mufa
- 1 espectrofotómetro de U.V.

3. DISCUSION DE LA METODOLOGIA

El objetivo de este trabajo fué encontrar una nueva metodología de aislamiento de bupivacaína en la cual el trabajo químico fuera el menor posible, es decir, evitar las extracciones líquido/líquido (L/L), por lo que se pensó en el uso de pequeñas columnas empacadas con materiales adsorbentes en fases apolares químicamente unidas, cuya función es retener el compuesto de interés, separándolo del resto de la muestra y eluirlo con un volumen pequeño de disolvente para su posterior análisis cromatográfico.

El éxito de la operación retención-elución cuantitativos depende de las condiciones experimentales como el pH al cual se efectúa la retención, la naturaleza del disolvente usado para la elución y la concentración del ácido tricloroacético; por lo que se decidió estudiar la influencia de cada uno de estos parámetros por separado para determinar las condiciones óptimas de trabajo.

Conocer el comportamiento de las especies iónica y neutra de la bupivacaína en la cromatografía en fase vapor es importante, dado que si bajo las mismas condiciones se obtienen señales idénticas, la libertad que se tiene para desarrollar el método de aislamiento será mucho mayor, pues éste no estará condicionado a obtener la especie neutra (en todos los métodos reportados en la bibliografía consultada, la bupivacaína se inyecta en forma de amina libre); de no obtenerse la misma señal, tendría que tomarse en cuenta en el proceso de aislamiento que el compuesto debe extraerse en forma no-iónica, o bien, el método de análisis deberá cambiarse para realizar la determinación cuantitativa.

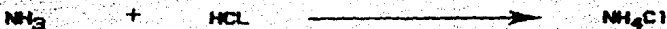
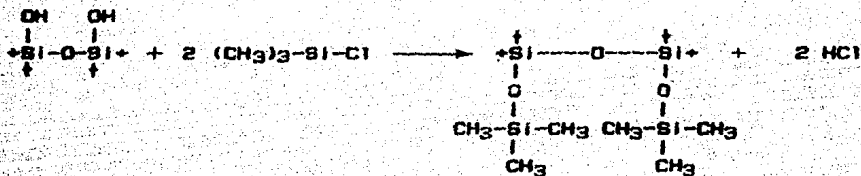
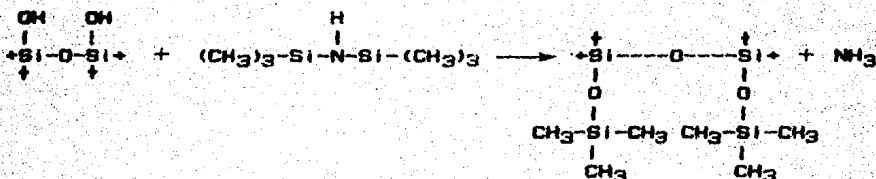
El estudio experimental de las variables que intervienen en el proceso de aislamiento se realizó utilizando un DIL. A pesar de que su sensibilidad es menor que la del DILA, su estabilidad y la facilidad al trabajar con él son mayores, lo que representa grandes ventajas cuando se efectúa un gran número de determinaciones al día.

4. PREPARACION DE LA COLUMNA

Se preparó una columna cromatográfica con un tubo de vidrio de 1.8 m de largo y 0.2 mm de d.i. que, para eliminar la grasa y las impurezas metálicas de su superficie fué tratado con 50 mL de una disolución de ácido clorhídrico al 10%, 100 mL de agua destilada y 30 mL de cada uno de los siguientes disolventes: etanol, acetona, cloroformo y tolueno en el orden dado. Se secó a 300°C con una corriente de nitrógeno seco durante aproximadamente cuatro hrs.

Posteriormente y con el fin de evitar la interacción de la muestra con los grupos silanol libres presentes en la estructura del vidrio, éste fué tratado con una disolución preparada en el momento de usarse y compuesta de cuatro partes de hexametildisilazano (HMDS), una de trimetilclorosilano (TMCS) (previamente destilados) y cinco de tolueno anhidro (deshidratado sobre malla molecular de 5 Å). Al momento de llenar el tubo con la disolución es conveniente evitar la formación de burbujas de aire. Esto se dejó reposar quince min, se vació y se lavó con 40 mL de tolueno y metanol anhidros, en ese orden.

Las reacciones que se llevan a cabo entre la superficie del vidrio y los agentes silanizantes son:



El soporte se preparó por el método de evaporación y la columna se empacó aplicando presión; ambas técnicas han sido descritas detalladamente por Supina (29). La columna se acondicionó a 325°C durante una noche.

5. COMPORTAMIENTO DE LA BUPIVACAÍNA EN CROMATOGRAFÍA EN FASE VAPOR

Con el fin de comparar los parámetros cromatográficos (tiempo de retención, área y forma del pico) de las dos especies de bupivacaína, se realizó un ensayo sobre el comportamiento de la misma en cromatografía en fase vapor. Esto nos permitió saber si alguna de las dos formas es más adecuada para realizar la cuantificación.

En una microbalanza se pesaron dos porciones de clorhidrato de bupivacaína. Una de ellas de 5.8324 mg se disolvió en agua y se transfirió a un embudo de separación de 50 mL. El vaso de precipitados se lavó dos veces para arrastrar todo el compuesto. La disolución acuosa se alcalinizó con 10 mL de sosa 0.5 N, observando la formación de un precipitado blanco (bupivacaína como amina libre). Se extrajo dos veces con 3 mL de éter etílico y los extractos se mezclaron.

La otra muestra de 5.3123 mg se transfirió directamente a un matraz aforado de 10 mL y se aforó con etanol. Posteriormente se inyectó 1 μ L de cada una de las disoluciones en el cromatógrafo equipado con una columna de las dimensiones ya descritas y empacada con 3% de OV-101 en Chromosorb WHP 100/120.

Con el objeto de comparar los parámetros cromatográficos de bupivacaína y sus productos de descomposición se inyectó 1 μ L de cada una de las disoluciones en el cromatógrafo equipado con una columna de dimensiones idénticas empacada con 3% de Apiezon L y 1% de potasa en Chromosorb WAW 100/120.

6. CURVA DE CALIBRACION PARA EL DIL

En una microbalanza se pesaron exactamente 18.2257 mg de clorhidrato de bupivacaína, se disolvió y se aforó con etanol a un volumen de 25 mL. A partir de esta disolución se hicieron diluciones y se obtuvieron las siguientes concentraciones: 729, 583, 364, 146, 73 y 36 ug/mL. De cada una de ellas se inyectaron tres muestras en el cromatógrafo de 1 uL cada vez.

Se trabajó en un rango de 10^{-10} amp/mv y la atenuación fué de 1 o 2 mV para obtener las señales dentro de la escala.

7. DESARROLLO METODOLOGICO DEL AISLAMIENTO DE BUPIVACAINA

7.1 INFLUENCIA DEL pH EN LA RETENCION DE BUPIVACAINA EN COLUMNAS DE FASE INVERSA QUIMICAMENTE UNIDAS

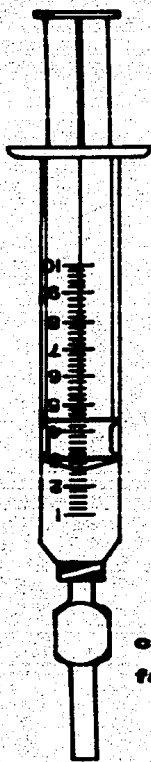
Se realizaron ensayos con el propósito de conocer la dependencia de la retención con respecto al pH en un intervalo de 3 a 8 usando cinco disoluciones amortiguadoras de fosfatos (25 mL de cada una) a una concentración de 0.5 M de tal manera que cada disolución se ajustó a la ecuación de Henderson-Hasselbach.

Los pH registrados para cada disolución fueron: 3.50, 5.50, 6.35, 7.15 y 8.0 cuyo valor exacto fué obtenido con un potenciómetro.

Las columnas de extracción se acondicionaron por medio de una jeringa hipodérmica (Fig.12) pasando 5 mL de cada uno de los siguientes disolventes: acetona, etanol, agua destilada y

disolución amortiguadora, en el orden dado. En la jeringa hipodérmica se mezclaron 0.2 mL de una disolución de clorhidrato de bupivacaína de concentración 583 ug/mL y 3 mL de la disolución amortiguadora. Posteriormente ésta mezcla se pasó a través del cartucho y se lavó con 5 mL de agua destilada. La elución se realizó con etanol colectando fracciones de 0.5 mL; de cada una de estas disoluciones se tomó 1.0 uL y se inyectó en el cromatógrafo.

Se realizó una prueba adicional en la cual la disolución de clorhidrato de bupivacaína se pasó a través del cartucho sin fijar previamente el pH. Las fracciones obtenidas también fueron inyectadas en el cromatógrafo.



**columna de adsorción de
fase inversa C18**

***fig 12 Sistema utilizado en la purificación del
anestésico***

7.2 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACIDO TRICLOROACETICO

Durante el desarrollo experimental se observó la aparición de picos que interferían con la señal de bupivacaína, por lo que con el objeto de determinar el origen de estos picos y con el fin de saber como influye la concentración de ácido tricloroacético en la precipitación de proteínas, en la fase químicamente unida y la columna de cromatografía en fase vapor se realizaron los siguientes estudios.

a) EN LA PRECIPITACION DE PROTEINAS

La precipitación de proteínas se realizó con tres concentraciones de ácido tricloroacético (3%, 6% y 30%) para seleccionar aquella que produjera una precipitación eficiente.

Se tomaron 0.2 mL de sangre y 0.2 mL de la disolución de ácido tricloroacético, se agitaron en un vortex y se centrifugaron en una centrífuga clínica. El líquido sobrenadante se extrajo con una pipeta Pasteur y se trasladó directamente a la jeringa hipodérmica en la que se mezcló con 3 mL de la solución amortiguadora y la mezcla se pasó a través del cartucho, enseguida se lavó con 5 mL de agua destilada. El compuesto eluyó con etanol recolectándose en fracciones de 0.5 mL. De cada una de ellas se tomó 1 μ L y se inyectó en el cromatógrafo.

b) EN LA FASE INVERSA QUIMICAMENTE UNIDA

Se mezclaron 3 mL de la disolución amortiguadora y 0.2 mL de la disolución de ácido tricloroacético (al 6% ó al 30%) en la jeringa hipodérmica. La disolución se pasó a través del cartucho, el cual se lavó con 5 mL de agua destilada. Se eluyó con etanol colectando

fracciones de 0.5 mL; de cada una de ellas y se inyectó en el cromatógrafo 1 uL de cada una de ellas.

c) EN LA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA EN FASE VAPOR

1 uL de ácido tricloroacético disuelto en etanol (en los demás casos el disolvente fué agua) se inyectó directamente en el cromatógrafo.

7.3 PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA EXTRACCION

Una vez determinadas las condiciones experimentales adecuadas para aislar y purificar la bupivacaína se procedió a probar el método agregando a la muestra sanguínea una cantidad conocida de clorhidrato de bupivacaína.

A un tubo eppendorf se transfirieron 0.2 mL de sangre y 0.2 mL de la solución de clorhidrato de bupivacaína, se agitó en un vortex, se agregaron 0.2 mL de ácido tricloroacético al 6%, se agitó nuevamente y se centrifugó a velocidad máxima durante 3 min. en una centrífuga clínica. El sobrenadante se separó mediante una pipeta Pasteur (la operación se realizó dos veces para obtener una extracción completa, tal y como lo recomiendan algunos autores (18,20)) y se trasladó a la jeringa hipodérmica que ya contenía 3 mL de la disolución amortiguadora de pH 6.35. La disolución se pasó a través del cartucho, se lavó con agua destilada y la bupivacaína se eluyó con etanol, desechando el primer medio mililitro que básicamente es agua y se recolectó el siguiente mililitro; se concentró con vacío, agitación y calentamiento (50°C) hasta un volumen aproximado de 20 uL.

8. CONSTRUCCION DE UN DETECTOR DE LLAMA ALCALINA

La sensibilidad de un detector de ionización de llama a pesar de ser bastante buena, no es suficiente para detectar las concentraciones que se requieren en éste trabajo, por lo que se planteó la necesidad de hacerlo con un detector de ionización de llama alcalina, que se construyó en el laboratorio por tres diferentes métodos.

Los detectores contruidos por los dos primeros métodos se realizaron según está descrito en la literatura (35,36), introduciendo algunas variaciones. Para la construcción del tercer tipo de detector se utilizó la base de uno comercial.

B.1 CON UNA ESPIRAL DE DOS VUELTAS

Se formó una bobina de dos vueltas (cuidando que estas hicieran contacto) en una varilla de 7 mm de diámetro con alambre de platino (calibre 26 B&S), cinco milímetros abajo del embobinado se formó otra espiral de tres vueltas sobre una varilla del mismo diámetro que el vástago del detector (aproximadamente 3 mm); cortandose de tal manera que la bobina de 7 mm quede 4 mm arriba del borde superior del vástago del detector cuando se colocó sobre éste (fig. 13).

Tanto el embobinado como el crisol de platino se limpiaron por inmersión durante media hora en ácido fluorhídrico concentrado, enjuague con agua desionizada, secado con acetona y calcinación durante dos horas en una mufla a 1100°C.

El crisol se llenó hasta la cuarta parte con cloruro de potasio (recristalizado cuatro veces de agua), y se calentó con un mechero Fischer al rojo vivo; con un mechero Bunsen el embobinado se calentó y se sumergió en cloruro de potasio fundido durante aproximadamente cinco segundos, se sacó y se mantuvo a escasos milímetros sobre el fundido (cuidando de no traspasar el borde del crisol) de tal manera que el exceso escurriera y el cloruro de potasio cristalizara formando una capa delgada, homogénea y cristalina alrededor de la bobina.

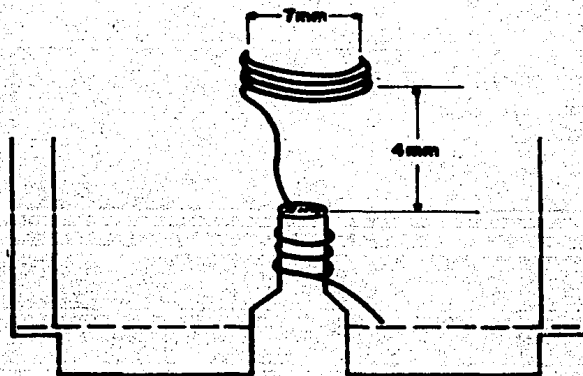


Fig 13 Bobina de 2 vueltas construida con alambre de platino para obtener un DILA

8.2 CON UNA ESPIRAL DE CINCO VUELTAS

Utilizando un alambre de platino (calibre 24 B&S) y sobre una varilla se formó una bobina de cinco vueltas de manera similar a la descrita en el párrafo anterior. El diámetro externo fué de 5 mm y tres milímetros abajo se continuó formando la otra espiral de 3 mm de diámetro interno. El alambre se cortó de tal manera que la bobina de 5 mm quedo 2 mm arriba del borde superior del vástago del detector cuando la espiral se colocó sobre éste (fig. 14). El embobinado se limpió como en el caso anterior.

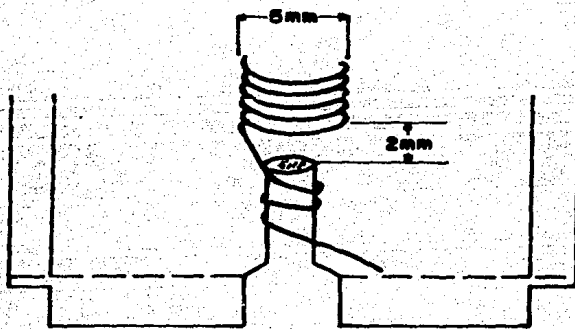


Fig 14 Bobina de 5 vueltas construida con alambre de platino para obtener un DILA

Exclusivamente la bobina de 5 mm se sumergió en una disolución saturada de cloruro de potasio (recristalizado cuatro veces de agua). Se sacó de la disolución, se rompió la gota formada en el interior de la bobina y el agua se evaporó calentando directamente en la parte fría de la llama de un mechero Bunsen. Una vez evaporada toda el agua, el cloruro de potasio se fundió calentando la bobina en la interfase de la llama caliente y la fría con movimientos giratorios, obteniéndose un recubrimiento cristalino. La aplicación se repite dos o cuando mucho tres veces cuidando que la capa depositada de cloruro de potasio sea homogénea y no muy gruesa.

B.3 SOBRE UNA BASE

Una base de un detector comercial (fig. 15) se llenó al tope con cloruro de potasio (recristalizado de agua cuatro veces), la sal se fundió calentandola directamente con un soplete de acetileno, hasta que el fundido quedó al ras de los bordes y con una apariencia cristalina.

fig 15 Modelo de un
DILA comercial



9. CALIBRACION DE LA VALVULA MICROMETRICA

Para obtener un funcionamiento óptimo del detector de llama alcalina fue necesario controlar pequeñas variaciones en el flujo de hidrógeno con una válvula micrométrica. La calibración de esta se efectuó midiendo el tiempo que tarda en desplazar un volumen de 10 mL la cantidad de hidrógeno que sale por el vástago del detector en la posición escogida para la válvula.

10. EVALUACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE FUNCIONAMIENTO DE CADA DETECTOR

Las presiones de entrada de los gases se ajustaron con un regulador de presión con manómetro de 25 psi, de tal manera que los valores iniciales del flujo de estos coincidieran con la mitad de la escala de las válvulas micrométricas y de aguja.

Se observó el valor de la corriente residual de fondo del detector en un rango de 10^{-10} amp/mv y 10^{-11} amp/mv; y esta deberá ser mayor que la producida por el DIL correspondiente.

La respuesta del detector se evaluó en un rango de 10^{-10} amp/mv con una disolución etanólica de 9 ug/mL de clorhidrato de bupivacaína. La columna se mantuvo a una temperatura de 250°C.

El máximo de la relación señal/ruido (h/r) se encontró fijando el caudal de dos de los gases y variando el del tercero, se dejó estabilizar la corriente residual de fondo y se inyectó 1 uL de la disolución de 9 ug/mL, se midieron las alturas de la señal y el ruido, se obtuvo su relación, y en el máximo de ésta se fijó el flujo del gas. El proceso se repitió hasta obtener el caudal mas

adecuado para cada uno de los gases. Las condiciones iniciales se fijaron como si se tratara de un DIL.

11. CURVA DE CALIBRACION PARA EL DILA

En una microbalanza se pesaron exactamente 4.5506 mg de clorhidrato de bupivacaína, el cual se disolvió y se aforó con etanol absoluto a un volumen de 25 mL; a partir de esta disolución y por dilución se obtuvieron disoluciones a las concentraciones siguientes: 1.82, 1.45, 1.21, 0.91, 0.60, 0.36 ug/mL. Cada una de estas disoluciones se inyectaron por triplicado 1 uL cada vez.

El rango en el cual se trabajo fué de 10^{-11} asp/mV a una atenuación de 1 mV.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las técnicas para la extracción propuestas en la literatura (18,19,20,21,22,23,24,25) la bupivacaína se obtiene en forma de amina libre y como tal es inyectada a la columna cromatográfica; consecuentemente las condiciones están reportadas para cuando el fármaco se analiza de esta manera.

Con base en el valor de pKa, el comportamiento químico del anestésico y la forma en que el proceso de purificación fue diseñado, se esperaba que el soluto se recuperase en forma iónica.

El clorhidrato de bupivacaína es un compuesto iónico y por tanto insuficientemente volátil como para poder realizar su análisis por cromatografía en fase vapor. Sin embargo se encontraron datos reportados acerca de las temperaturas de disociación para algunos anestésicos del tipo amida (37). La disociación se lleva a cabo en el inyector del cromatógrafo obteniéndose como productos la amina correspondiente y el ácido clorhídrico, el cual no provoca respuesta en el detector.

La eficiencia de la disociación es, por razones obvias, de vital importancia y se ve afectada por parámetros tales como el disolvente empleado y la temperatura del inyector.

En ese mismo trabajo se menciona que existe un intervalo de temperatura óptimo para el inyector (temperatura de disociación) el cual determinaron experimentalmente para cada uno de los anestésicos. En todos los casos el punto de fusión del clorhidrato se encuentra comprendido en éste rango. Si la temperatura del inyector es menor de la óptima, la disociación no es cuantitativa,

y si es mayor la molécula puede descomponerse. En la literatura consultada no se reporta ningún dato para clorhidrato de bupivacaína; sin embargo, si lo hacen para clorhidrato de mepivacaína (253-262°C)(37), compuesto homólogo cuya estructura difiere exclusivamente por una cadena de tres etilos (fig 2a), los cuales no contribuyen en este caso notablemente a una variación en la volatilidad. Se espera por tanto que los intervalos óptimos de trabajo en la temperatura del inyector sean aproximadamente los mismos. En cuanto al punto de fusión los autores no coinciden, ya que sugieren valores muy distintos (250°C (26) y 258.5°C (38)), sin embargo, ambos se encuentran comprendidos en el rango reportado para clorhidrato de mepivacaína.

La descomposición de la molécula puede verse favorecida si el disolvente empleado promueve la solvólisis en la función amida.

En la fig. 16 se muestran los cromatogramas obtenidos para ambas especies de bupivacaína, como puede observarse, la altura del pico, la forma de la señal y el tiempo de retención son idénticos. Tomando en cuenta estos resultados y lo antes expuesto se infiere que el clorhidrato de bupivacaína se disocia en la amina y el ácido clorhídrico a las condiciones experimentales sin que se alteren los resultados del análisis.

Como se mencionó antes, el disolvente juega también un papel importante en la cuantificación de los anestésicos locales. Debido a que la disolución era estándar, fue necesario conocer la estabilidad de la molécula en este medio a una temperatura de 205°C. Los productos de la solvólisis de la molécula son mas polares que la bupivacaína y por tanto su tiempo de retención es

a) Bupivacaina

b) Bupivacaina HCl

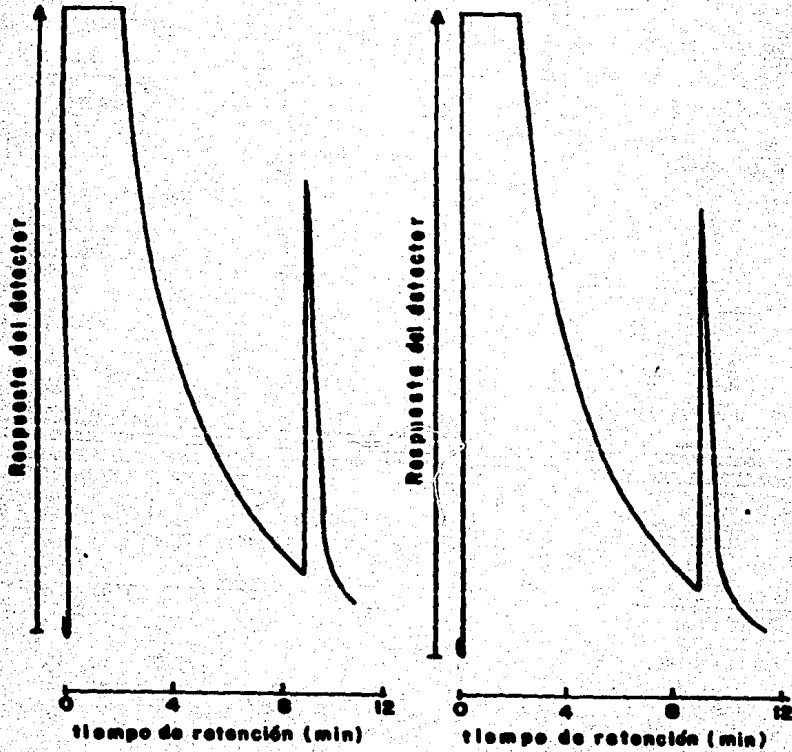


Fig 16 Cromatogramas obtenidos para ambas especies del anestésico

mayor, ello fué comprobado al inyectar ésta en una columna de Apiezon L con potasa al 1% sobre Chromosorb WAW 100/120 para catalizar su descomposición.

Al no observar en la fig. 16, picos con tiempos de retención que correspondan a los productos de descomposición, se concluye que las condiciones establecidas son adecuadas para la determinación cuantitativa de dicho anestésico.

Habiendo demostrado que en las condiciones cromatográficas utilizadas en el desarrollo de éste trabajo la molécula es estable y que ambas especies dan resultados idénticos, se trazó la curva de calibración empleando clorhidrato de bupivacaína. Los datos se encuentran resumidos en la tabla III y la fig. 17. Observando ésta última se deduce que el comportamiento no es lineal y se infiere que hay pérdida de bupivacaína, lo cual es apreciable solamente con cantidades muy pequeñas de la muestra. Este efecto se observa porque el intervalo de concentración empleado es relativamente grande y hay una zona en la que de hecho el comportamiento es lineal. Por otro lado la pérdida no es importante, ya que el coeficiente de correlación obtenido al efectuar un ajuste lineal bivariado fué de 0.995, e incluso puede ser un error de integración debido al "coleo" del pico. La ecuación que describe dicha curva es $A = 98m - 3745$ donde A es el área del pico en uV/seg y m es la cantidad de muestra en ng.

Tabla III Datos obtenidos al realizar la calibración de la respuesta del OIL utilizando distintas cantidades de clorhidrato de bupivacaína

CANTIDAD DE MUESTRA (ng)	AREA (uV/seg)	SENSIBILIDAD (amp/mV)	ATENUACION (mV)
36	1057	10^{-10}	1
	1842		
	1266		
72	3507	10^{-10}	1
	3712		
	3460		
145	8755	10^{-10}	1
	11136		
	9794		
364	30176	10^{-10}	1
	31078		
	32784		
583	45118	10^{-10}	2
	52686		
	54390		
729	70872	10^{-10}	2
	68160		
	71774		

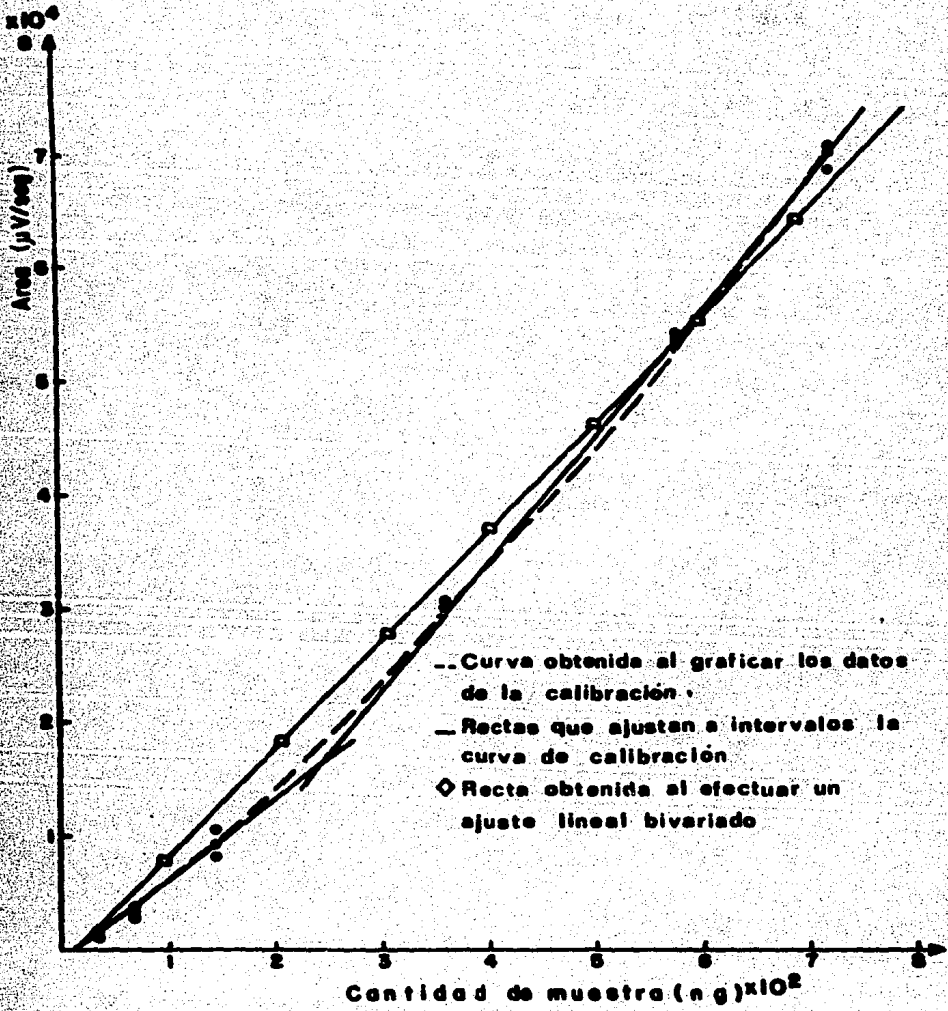


fig 17 Curva de calibración para BHC1 utilizando el DIL

En una curva de calibración se espera que el valor de la ordenada al origen sea cero (no hay muestra, no hay señal), lo que no se cumple en este caso y puede explicarse considerando que el detector de ionización de llama es no-selectivo, por tanto al ser el disolvente el componente mayoritario, la respuesta hacia él es muy grande. El pico que corresponde a bupivacaína se encuentra en la "cola" del disolvente tal y como se observa en la fig. 16. Por este motivo la detección de cantidades muy pequeñas del fármaco se encuentra limitada por la respuesta del detector al disolvente. La cantidad mínima detectable en éste caso fué de 38 ug/ml. Este valor se obtuvo al extrapolar la curva de calibración.

La cantidad mínima detectable es la cantidad de muestra que produce una señal de magnitud del doble del ruido y se expresa en unidades de concentración. Existen dos formas de calcularla, una ya mencionada y la otra preparando disoluciones muy diluidas e inyectándolas al cromatógrafo y observando la altura de la señal.

El evaluar este parámetro es importante cuando se desea hacer análisis de trazas ya que si la concentración de la muestra, una vez lista para ser inyectada, es menor que la cantidad mínima detectable el análisis tendría que realizarse con un detector más sensible.

Otro punto importante a tratar es el aislamiento del fármaco a partir de la muestra sanguínea. Como ya se mencionó antes, los métodos tradicionales de extracción líquido/líquido tienen en éste caso varias desventajas, por lo que se pensó en el uso de columnas de adsorción de fase inversa C18 como una posible alternativa.

El comportamiento cromatográfico de la bupivacaína frente a ésta fase determina en gran medida las condiciones de retención-elución a las cuales debe realizarse la purificación.

La bupivacaína en solución acuosa sufre el correspondiente equilibrio ácido-base.



La concentración de cada una de las especies queda determinada por la constante de acidez y el pH de la solución que puede controlarse mediante el uso de amortiguadores. La correlación entre estos parámetros se obtiene mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach (ec. 1)

De lo anterior se infiere que el pH de la fase móvil es uno de los parámetros que afecta la retención de compuestos que tienen propiedades ácido-base.

La retención de clorhidrato de bupivacaína en los cartuchos a diferentes condiciones empleadas, tanto en disoluciones amortiguadoras de pH como las no amortiguadas, es cuantitativa en la mayoría de los casos. A pH 8 la prueba no pudo realizarse ya que un alto porcentaje de la bupivacaína se encuentra en forma de amina libre e insoluble en disoluciones acuosas.

La recuperación se realiza también de forma cuantitativa cuando se eluye con etanol absoluto. Del análisis cromatográfico de las diferentes fracciones recolectadas, se deduce que el primer medio

mililitro recuperado es básicamente agua, y la elución de bupivacaína es prácticamente nula, en el siguiente mililitro se eluye más del 99% del fármaco.

Todas las disoluciones amortiguadoras empleadas tienen un pH menor que el pKa de la bupivacaína y la especie predominante es la iónica.

La interacción del fármaco con la fase estacionaria puede llevarse a cabo por medio de tres mecanismos distintos:

a) La molécula en forma iónica acompañada de su contraión interactúa en forma neutra con la fase estacionaria y puede representarse mediante el siguiente equilibrio:



b) La especie iónica queda retenida en la fase estacionaria, pero como ésta es hidrofóbica, solamente hace contacto con la parte menos polar de la bupivacaína y se representa con el correspondiente equilibrio y en la fig. 18



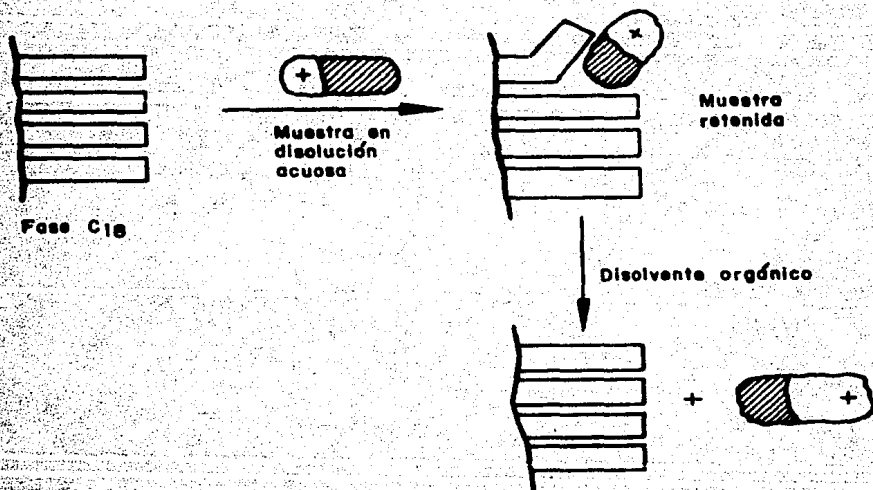
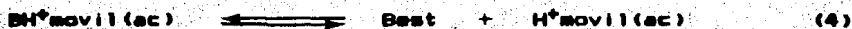
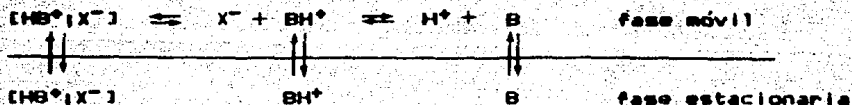


Fig 10 *Un posible mecanismo que explica la retención de los anestésicos locales en fase a polar químicamente unida*

c) Al interactuar el eluato y la fase estacionaria, el primero se disocia quedando retenido en forma neutra. Dicho equilibrio puede representarse de la siguiente forma



Todas las interacciones quedan resumidas en el siguiente diagrama



Al pasar agua por el cartucho se arrastra todo el exceso de iones potasio y fosfatos en la fase acuosa. Después al pasar etanol se provoca un desplazamiento de la bupivacaína hacia la fase móvil.

El disolvente empleado para la elución es prótico y el pH al que se encuentra es cercano al neutro. Por tanto coexisten las especies iónica y neutra aunque predomina la primera, y la bupivacaína es extraída del cartucho en ambas formas.

El primer paso en el aislamiento del anestésico de la muestra sanguínea fue precipitar la proteína con ácido tricloroacético. Se probaron disoluciones de tres distintas concentraciones 3%, 6% y 30%, solamente la primera no provocó precipitación completa.

Al utilizar la última disolución como agente precipitante y después de completar el proceso de purificación y cromatografiar las fracciones, se observó que en el cromatograma aparecían señales que no correspondían a la bupivacaína y una de ellas interfería con ésta (figs. 19 y 20).

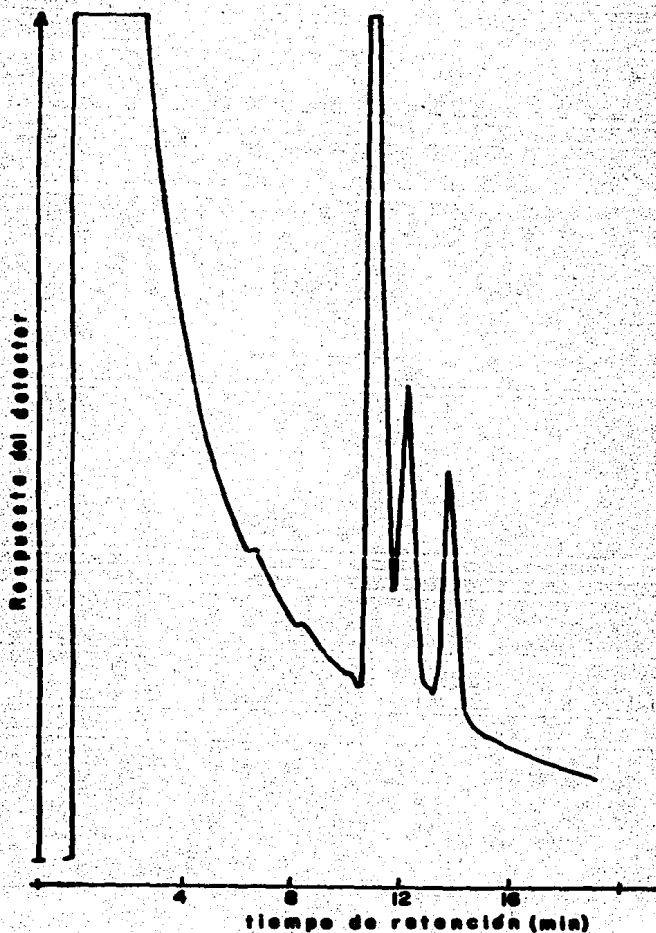


Fig 19 Cromatograma donde se muestra bupivacaina y las señales que interfieren en su cuantificación

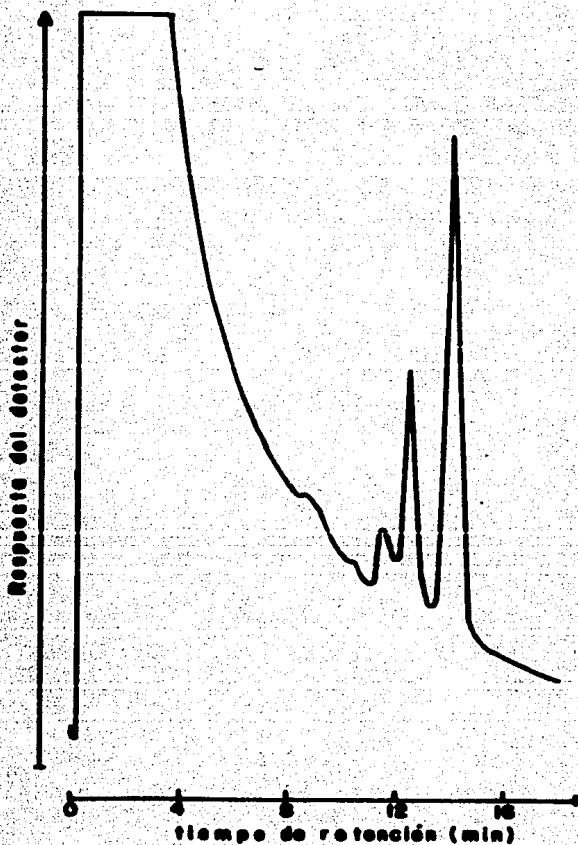


Fig 20 Cromatograma obtenido al cromatografiar las fracciones estándar obtenidas cuando se utilizó el "blanco" sangre +H₂O + +CA en el que se puede apreciar que una de las señales tiene el mismo t_R (11.4 min) que bupivacaína.

Para dilucidar el origen de dichas señales se decidió estudiar el efecto de ésta disolución en cada una de las etapas del proceso mediante el empleo de "biancos".

El primer blanco empleado fué: sangre, ácido tricloroacético y agua, el cual se sometió a todo el proceso de purificación del fármaco tal y como se ha descrito. El cromatograma obtenido se muestra en la fig. 20 y fué independiente de la disolución amortiguadora empleada. En él, se observa que las señales interferentes no han desaparecido, por tanto, se descarta la posibilidad de que éstas se deban a productos de hidrólisis de la bupivacaína.

A través del cartucho se pasaron las disoluciones de ácido tricloroacético y del amortiguador de pH. Los cromatogramas obtenidos de las fracciones etanólicas son iguales al mostrado en la figura del parrafo anterior. Se infiere que estas señales no corresponden a compuestos que provienen de la sangre y que pudieran extraerse junto con el anestésico.

Por último se inyectó una disolución etanólica de ácido tricloroacético directamente al cromatógrafo de gases. El resultado se muestra en la fig. 21, cuyas señales características no coincidieron con ninguna de las obtenidas en los dos cromatogramas anteriores. De estos resultados, aunados a un cambio de coloración en el soporte y datos reportados en la literatura acerca de la descomposición de la fase estacionaria C18, se pensó que los picos interferentes se deben a la hidrólisis de ésta por la presencia del exceso de ácido, los picos de la fig. 21 se deben a la descomposición térmica del ácido tricloroacético.

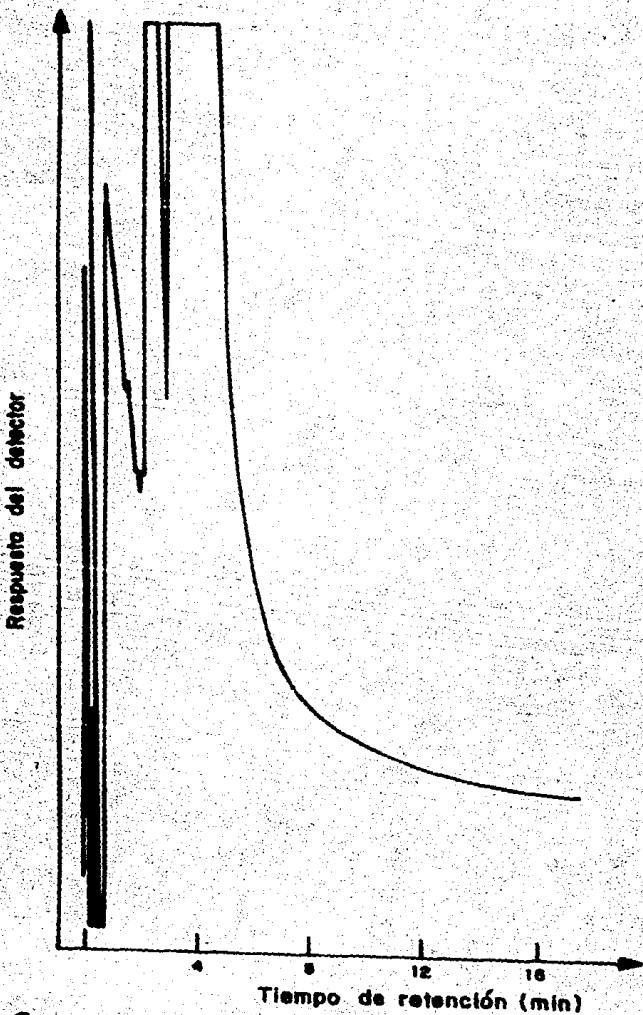


Fig 21 Cromatograma donde se muestra la descomposición de ácido tricloroacético

Se sabe(39) que los productos de descomposición son: cloroformo, ácido clorhídrico, ácido acético, bioxido de carbono, etc.

Al utilizar la disolución de ácido tricloroacético al 6% como agente precipitante, los resultados obtenidos fueron los mismos que para el caso anterior, excepto cuando el pH de las disoluciones amortiguadoras estaba comprendido entre 6.3 y 7.1. En cuyo caso, las señales que se deben a la hidrólisis de la fase estacionaria no aparecen.

Por todo lo anterior, las condiciones más adecuadas son las que se describen en el procedimiento propuesto en este trabajo. El cromatograma que se obtiene en una corrida típica en estas condiciones es idéntico a los que se muestran en la fig 16, en los cuales se observa claramente un pico característico y libre de interferencias.

Los niveles de detección requeridos es posible alcanzarlos con un detector como el DILA. Al no disponer en el laboratorio de uno comercial fué necesario modificar un DIL, según los procedimientos ya descritos.

La respuesta de éstos detectores depende significativamente de sus características de construcción. En su fabricación se observó que cuando el recubrimiento de la espiral se realiza por inmersión en cloruro de potasio fundido, el exceso de sal fundida no puede eliminarse pasando una varilla a través de la espiral tal y como se recomienda en la técnica (35,36) porque la sal cristaliza inmediatamente alrededor de ésta a pesar de calentarla previamente al rojo vivo.

Respecto al procedimiento que consiste en depositar la sal mediante una disolución, es importante que se realice tal cual se describe en este trabajo para obtener un recubrimiento uniforme. Las variaciones en la concentración de la sal en la disolución afectan sobre todo el espesor de la capa depositada, si es muy delgada la sal se volatiliza por completo al intentar fundirla en la espiral, y si es muy gruesa el contacto con la llama es directo, y en consecuencia la corriente residual de fondo y el ruido son muy grandes.

Con respecto al detector construido sobre una base, para lograr una superficie homogénea se fundió la sal sobre la misma base, ya que por compresión no se pudo fabricar una pastilla mecánicamente resistente.

El procedimiento empleado en este trabajo para obtener la relación óptima del flujo de los gases difiere en algunos puntos a los reportados en la literatura, ya que con el método propuesto por Horowitz (35,36) la corriente residual de fondo y el ruido obtenidos eran muy grandes debido a que la llama era también grande y tocaba directamente al cloruro de potasio; con el método recomendado por Varian (34) la sensibilidad a la cual se realiza el ajuste es la máxima que permite un cromatógrafo (10^{-12} amp/mV); la inestabilidad y lenta recuperación de la línea base con pequeñas variaciones en el flujo de los gases sobre todo el de hidrógeno fue lo que nos hizo decidimos para realizarlo de la forma ya descrita; que fue pensada en función de lo reportado y lo observado experimentalmente acerca del funcionamiento y comportamiento tanto del DILA como del OIL.

Por este método el máximo obtenido en la grafica flujo-vs- h/r corresponde al valor de flujo adecuado. Si se escoge el máximo para cada uno de los gases se dice que es éste el punto de mayor sensibilidad del detector. A valores menores el pico y el ruido son pequeños y a valores mayores crecen ambos, pero éste último lo hace de una forma desproporcionada con respecto a la señal.

En los experimentos realizados se encontró que la sensibilidad del detector depende efectivamente del flujo de los gases, pero es más drástica con respecto al hidrógeno y en segundo termino al aire, por lo que fué necesario utilizar la válvula micrométrica para obtener un control fino del gasto de hidrógeno. Los resultados de la calibración de esta válvula se encuentran en las tablas IV y la fig. 22.

Cuando se evaluó la dependencia de la sensibilidad con respecto al flujo del gas de arrastre, se encontró que para ninguno de los detectores la respuesta variaba en más de un 5% de la escala. Por lo que se decidió mantenerlo constante en 30 mL/min.

Con la bobina de dos vueltas se construyeron y se probaron dos detectores. La relación óptima h/r fué aproximadamente la misma a los mismos flujos para ambos y se muestra en la fig 23 y la tabla V. A partir de ella se infiere que el caudal óptimo de hidrógeno fué de 21 mL/min. La cantidad mínima detectable de 9.2 ug/mL. Estos detectores resultaron ser más sensibles que el de llama, sin que se alcanzaran los niveles requeridos.

De forma similar se evaluaron los flujos óptimos para el detector construido con la espiral de cinco vueltas, los valores fueron: 240 mL/min para aire y 35 mL/min para hidrógeno.

TABLA IV Curva de calibración para la válvula micrométrica.

GRADUACION DE LA VALVULA	FLUJO DE H ₂ (mL/min)
2.0	25.0
2.5	30.5
3.0	34.5
3.5	37.5
4.0	38.0
4.5	38.5

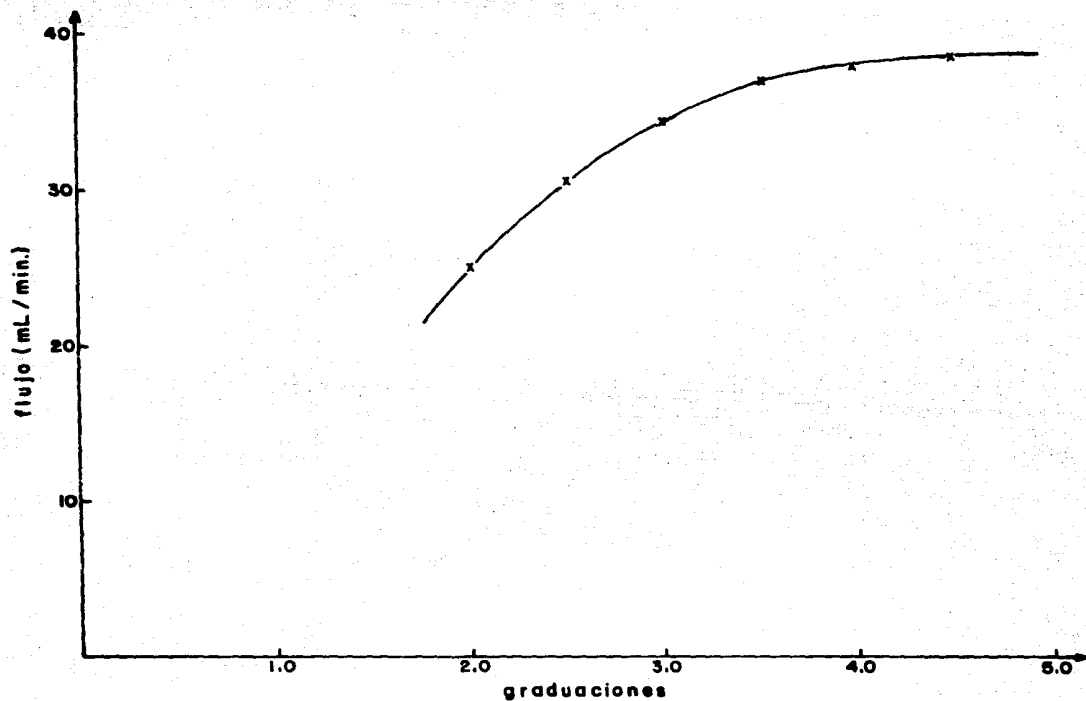


fig.22 Curva de calibración para la válvula micrométrica

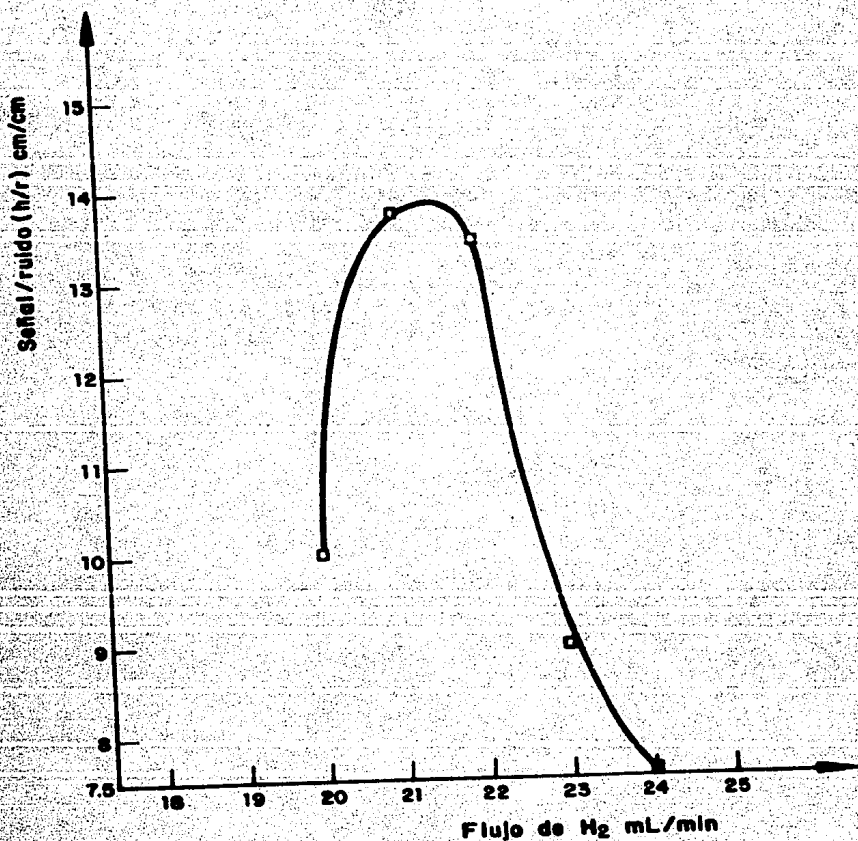


Fig 23 Curva de calibración para determinar el caudal de hidrógeno en el cual el DILA es más sensible.

TABLA V Datos obtenidos al evaluar la dependencia de la sensibilidad del DILA con respecto al flujo de Hidrógeno.

ALTURA DE LA SEÑAL (cm)	ALTURA DEL RUIDO (mm)	REL. SEÑAL/RUIDO	FLUJO DE H ₂ (mL/min)
2.00	2.0	10.00	20
3.30	2.4	13.75	21
4.45	3.3	13.48	22
7.32	8.3	8.82	23
6.69	8.7	7.68	24

De la tabla VI y la fig. 24 se infiere que la respuesta del detector es lineal en el intervalo requerido y que la cantidad mínima detectable fué de 0.1 ug/mL. La ecuación que define ésta recta es: $A = 2262m - 709$ donde A es el área del pico en uV/seg y m es la cantidad de muestra en ng.

La corriente residual de fondo obtenida con el detector construido sobre una base comercial fué muy grande, lo que probablemente se debe a la presencia de iones extraños en la llama y provenientes del soporte por oxidación parcial de éste, al exponerlo directamente a la llama de acetileno; suposición hecha al observar que la sal de cloruro de potasio tomó una coloración ligeramente amarilla y que la base está constituida por acero. Por lo cual no se continuó realizando pruebas con este detector.

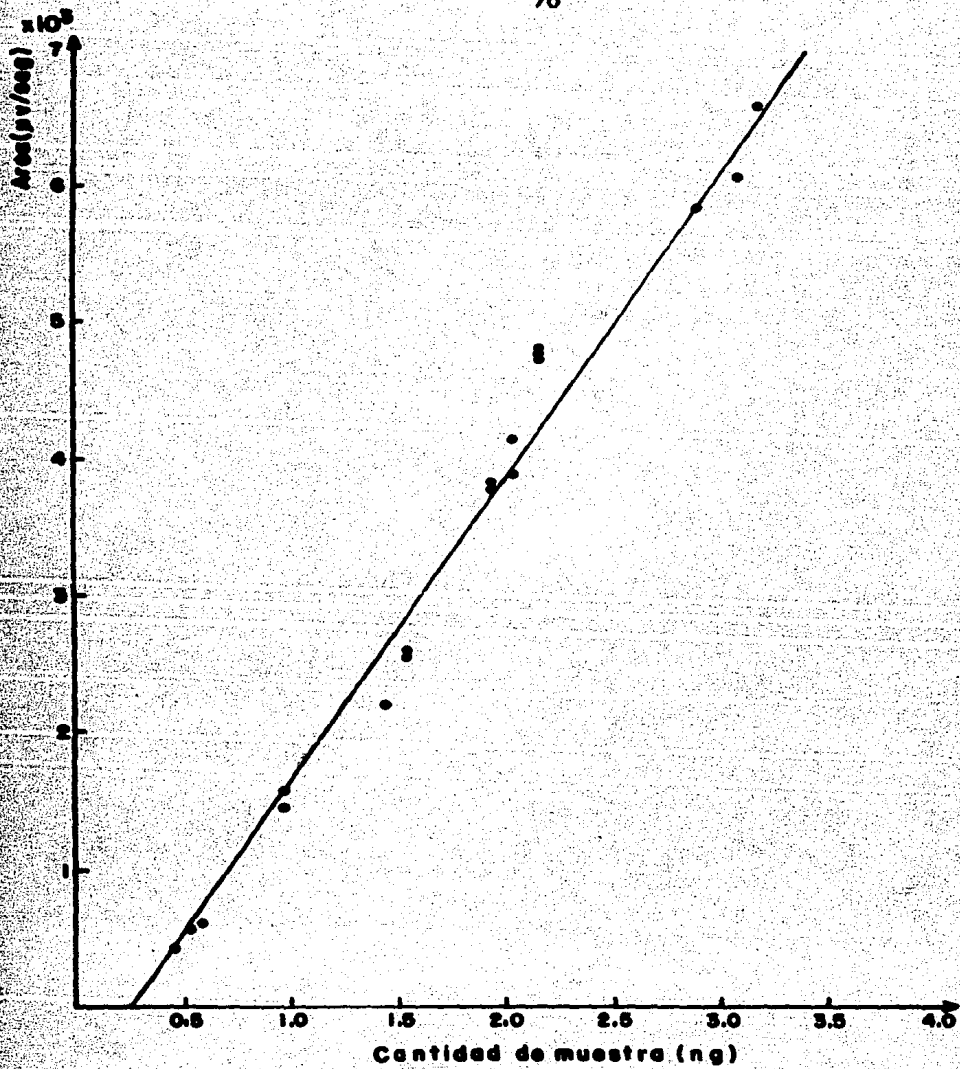


fig 24 Curva de calibracion para BHC1 utilizando el DILA

TABLA VI Datos obtenidos al realizar la calibración de la respuesta del DILA construido en el laboratorio, utilizando distintas cantidades de clorhidrato de bupivacaína

CANTIDAD DE MUESTRA (ng)	AREA ($\mu\text{V}/\text{seg}$)	SENSIBILIDAD (amp/mV)	ATENUACION (mV)
0.47	470		
0.62	640	10^{-11}	1
0.55	598		
0.97	1650		
0.97	1498	10^{-11}	1
1.55	2619		
1.55	2558	10^{-11}	1
1.46	2215		
2.05	4182		
2.05	3820	10^{-11}	1
1.93	3865		
1.93	3508		
2.32	4813		
2.32	4536	10^{-11}	1
2.32	4601		
2.90	5820		
3.09	6083	10^{-11}	1
3.20	6650		

CONCLUSIONES

Los objetivos primordiales de éste trabajo fueron alcanzados de forma satisfactoria, aunque no se cumplió con todos los originalmente planteados; ambos se resumen a continuación.

1.- El método descrito en éste trabajo es relativamente simple, rápido y fácilmente adaptable.

2.- Para realizar el análisis, se requieren únicamente 0.2 mL de sangre.

3.- No se obtuvieron datos acerca de la precisión del método.

4.- El análisis del anestésico se basa en el uso de un DILA, el cual posee una mayor selectividad y sensibilidad.

5.- Si quiere adaptarse éste procedimiento a un laboratorio clínico tendrá que realizarse forzosamente la validación del método por dos razones: a) La reproducibilidad de lote a lote de las fases estacionarias químicamente unidas, no siempre es la deseada, por tanto la retención y la recuperación pueden no ser las mismas para distintos lotes, a pesar de que la bupivacaina se retiene fuertemente a las condiciones dadas; b) Si bien es cierto que un DILA es más selectivo y sensible a este tipo de compuestos, su estabilidad es menor, su recuperación lenta y la respuesta no siempre permanece constante, ya que la sal se va consumiendo con el tiempo.

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

- 1.- C.A. 1981
95:35725d
- 2.- Korolkovas A.
Essentials of Molecular Pharmacology
Wiley & Sons
New York 1979
- 3.- Meyers F. H., Jawetz E., Goldfien A.
Review of Medical Pharmacology
Sixth edition
Lang Medical
California 1968
- 4.- Goodman G. A., Goodman L. S., y Gilman A.
Las bases farmacológicas de la terapéutica
Sexta edición
Panamericana
México 1982
- 5.- Bevan J. A.
Fundamentos de farmacología. Introducción a los principios
de acción de los fármacos.
Segunda edición
Harla
México 1982
- 6.- Wilson Ch. O., Gisvold O. and Doerge R. I.
Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry
Sixth edition

- Lippincott Philadelphia 1962
- 7.- Burger A.
Medicinal Chemistry
Third edition
Wiley-Interscience
New York 1970
- 8.- Ariens E. J.
Medicinal Chemistry. Molecular Pharmacology. The Mode of
Action of Biologically Active Compounds.
Vol. III part I
Academic Press
New York
- 9.- Sax M. and Pletcher J.
Local Anesthetics: Significance of Hydrogen Bonding in
Mechanism of Action
Science 166, 1546-8 (1969)
- 10.- Castellan
Fisicoquímica
Segunda edición
Fondo Educativo Interamericano
Mexico-Bogota 1971
- 11.- Thyrum P. T., Luchin R. J. and Thyrum E. M.
Nuclear Magnetic Resonance Evidence for Interactions
between Procaine and Thiamine Pyrophosphate
Nature 223, 747-8 (1969)

- 12.- Snider S. M. and Way E. L.
The Kinetics of Transfer of Lidocaine (Xilocaine) Across
the Human Placenta.
Anesthesiology 29, 944 (1968)
- 13.- Daniel S. S. and Morishima H. W.
Estimation of Mepivacaine HCl in Biological Fluids
Anesthesiology 28, 924 (1967)
- 14.- Eyres R. L., Bishop W., Oppenheim R. C. and Brown T. C. K.
Plasma Bupivacaine Concentrations in Children During
Caudal Epidural Analgesia
Anaesth. Intens. Care 11, 20 (1983)
- 15.- Morselli P. L.
Blood Level of Bupivacaine in Obstetric Analgesia
Acta Pharm. Suec. 11, [6], 646-7 (1974)
- 16.- Burn A. G., Vankleeff J. W., Gladines M. P., Splendijk J.,
and Greimer D. D.
Plasma Concentration of Lidocaine and Bupivacaine after
Subarachnoid Administration
Anesthesiology 59, 191-5 (1983)
- 17.- Johansson P. A.
Liquid-Liquid Distribution of Lidocaine and Some
Structurally Related Anti-Arrhythmic Drugs and Local
Anaesthetics.
Acta Pharm. Suec. 19, 137-42 (1982)
- 18.- Pratt E. L., Warrington H. P. and Grego J.
The gas Chromatographic Determination of Mepivacaine in
Blood with a Note on Other Local Anesthetics

Anesthesiology 28, [2], 432-7 (1967)

19.- Sadeé W. and Beelen G. C. M.

Drug Level Monitoring. Analytical Techniques. Metabolism
and Pharmacokinetics.

John Wiley & Sons

New York 1980

20.- Brauer H.

Gas-Liquid Chromatography Determination of Lidocaine in
Cat Plasma Using Mepivacaine as Internal Standard

Journal of Chromatography 231, 65-72 (1982)

21.- Lesko L. J. and Ericson J.

Simultaneous Determination of Bupivacaine and 2,6-
Pipercoloxylidide in Serum by Gas-Liquid Chromatography

Journal of Chromatography 182, 226-31 (1980)

22.- Asling J. H., Shnider S. M., Wilkinson G. R. and Way E. L.

Gas Chromatographic Determination of Mepivacaine in
Capillary Blood

Anesthesiology 31, [5], 458-61 (1969)

23.- Reynolds F. and Beckett A. H.

The Determination of Bupivacaine, Lignocaine and
Mepivacaine in Human Blood

Journal Pharm. Pharmac. 20, 704-8 (1968)

24.- Pekker Marcel

GLC and HPLC Determination of the Therapeutics Agents.
Chromatographic Science Series vol 9 part 3

New York 1979

- 25.- Sunshine I.
Methodology for Analytical Toxicology
CRC Press Inc
Rotari Florida 1975
- 26.- British Pharmacopoeia
vol I
London 1980
- 27.- Narang P. K. and Crouthamel W. G.
Lidocaine and its Active Metabolites by HPLC
Clin. Pharmacol. Ther. 24, 654-62 (1978)
- 28.- Shnyder
Introduction to Modern Liquid Chromatography
John Wiley & Sons
Second edition
New York 1979
- 29.- Supina W. R.
The Packed Column in Gas Chromatography
Supelco Inc.
Pennsylvania 1974
- 30.- Mc Nair H. M.
Cromatografia de Gases
OEA
Washington 1973
- 31.- Karmen A. and Giuffida L.
Enhancement of the Response of the Hydrogens Flame
Ionization Detector to Compounds Containing Halogens and
Phosphorus

Nature 201, 1204-5 (1964)

32.- Swan D. F. K.

Three Selective Detectors

Pye Unicam Ltd.

Cambridge

33.- Grob R. L.

Modern Practice of Gas Chromatography

John Wiley and Sons

New York 1977

34.- Varian Aerograph

Instruction Manual. Alkali Flame Ionization detector

Publication 85-001118-11

California 1970

35.- Horowitz W.

Official Methods of Analysis of the Association of
Official Analytical Chemists

29.008 pag. 520-22

Twelfth edition

Washington 1975

36.- Ibid

pag 468-9

Thirteenth edition 1980

37.- Judzinowicz B. J.

Gas Chromatographic. Analysis of Drugs and Pesticides
vol. 2

Marcell Dekker

New York 1967

38.- Clarke E. G.

Isolation and Identification of Drugs

The Pharmaceutical Press

Londres 1969

39.- Windholz M., Budavari J., Stroumstos L. Y. and Ferty M. N.

The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs

Nineth edition

Merck & Co.

Rahway, N.J., U.S.A. 1976