

300627
16



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

**"VALIDACION DE UN NUEVO METODO DE
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA CUANTIFICAR EL
ANTINEOPLASICO ETOPOSIDO (VP-16)
EN PLASMA HUMANO"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ NAVARRO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: JOSE LUIS IBARMEA AVILA

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.

Con sincero agradecimiento a la sección de Terapéutica Experimental del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, por permitirme realizar en sus instalaciones el presente trabajo, bajo la dirección del I.B.Q. José Pérez Urizar y por su valiosa aportación dentro de mi formación profesional.

**A DIOS por darme la vida, todo lo que ella
representa y una familia tan bella.**

**A mis padres por todo su amor y apoyo.
No existen palabras para expresar lo que
ustedes representan para mí. Esta meta
no sólo la alcancé yo, sino también
ustedes, esto es suyo.**

**A mi hermano Lalo por ser mi amigo
y por que sé que siempre podré contar
con él.**

**A todos aquellos maestros que
ayudaron a mi formación profesional.**

AGRADECIMIENTOS

Al I.B.Q. José Pérez Urizar por su valiosa colaboración como asesor externo, para la realización de esta tesis, sin él no hubiera sido posible. Mil gracias.

Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández, por hacerme ver que muchos de los obstáculos que se nos presentan uno mismo los crea, y que sólo creyendo en nuestra capacidad y cualidades podremos librarlos. Gracias por su apoyo, le estaré eternamente agradecida.

A la Q.F.B. Yolanda Flores Picazo por su colaboración durante el trabajo experimental.

Al director de esta tesis Q.F.B. José Luis Ibarnea Avila por su colaboración para la revisión de este trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo quedara terminado.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABLAS

	Pag.
1.- Justificación	1
2.- Objetivo	3
I CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Principios	6
1.3 Clasificación	7
1.4 Ventajas y aplicaciones	11
1.5 Instrumentación en CLAR	13
II VALIDACION	22
2.1 Definición y objetivos	22
2.2 Reglamentación	24
2.3 Validación de métodos bioanalíticos	25
2.4 Parámetros evaluados en la validación de métodos bioanalíticos	26
III ETOPOSIDO	31
3.1 Farmacología	31
3.2 Estabilidad	34
IV MATERIALES Y METODOS	35
4.1 Reactivos y soluciones	35
4.2 Obtención y preparación de las muestras plasmáticas	35
4.3 Sistema cromatográfico	36
4.4 Validación	38
4.4.1 Sistema	38
4.4.2 Método	38
4.5 Obtención de algunos parámetros farmacocinéticos del etopósido administrado por vía oral	39

V RESULTADOS Y DISCUSION	41
5.1 Resultados cromatográficos	41
5.2 Resultados de la validación	43
5.3 Parámetros farmacocinéticos	55
VI CONCLUSIONES	56
 BIBLIOGRAFIA	 58
 ANEXO A	 61

LISTA DE ABREVIATURAS

RPM:	Revoluciones por minuto.
C_{max} :	Concentración máxima alcanzada ($\mu\text{g/ml}$).
t_{max} :	Tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (horas).
$t_{1/2}$:	Vida media (horas).
AUC:	Area bajo la curva.
v/v:	Composición de una mezcla expresada volumen a volumen.
r:	Coefficiente de correlación.
r^2 :	Varianza explicada.
m:	Pendiente.
b:	Ordenada al origen o intercepto.
E.E.:	Error estándar.
C.V.:	Coefficiente de variación.
D.E.:	Desviación estándar.
X:	Media.
CLAR:	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
p.o.:	Vía de administración oral.
E.I.:	Estándar interno.

LISTA DE FIGURAS

No.		Pag.
1	Gula general de elección del tipo de CLAR	12
2	Partes principales de un sistema cromatográfico	14
3	Estructura molecular del VP-16	32
4	Diagrama de flujo del proceso de extracción del etopósido	37
5	Cromatogramas típicos de a) muestra plasmática con cantidades conocidas de estándar interno (1) y etopósido (2); c) muestra plasmática de un paciente 1 hr. después de la administración de 50 mg po de VP-16	42
6	Curva de calibración del sistema	45
7	Curva de calibración del método	48
8	Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etopósido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a temperatura ambiente	52
9	Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etopósido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a -4°C	53
10	Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etopósido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a -20°C	54
11	Curso temporal de los niveles plasmáticos del etopósido en un paciente después de la administración de una dosis oral única 50 mg	55

LISTA DE TABLAS

No.		Pag.
I	Valores de exactitud y precisión del sistema	44
II	Variabilidad del sistema	46
III	Valores de exactitud y precisión del método	49
IV	Variabilidad del método	50
V	Estabilidad de las soluciones de etopósido	51

JUSTIFICACION

El etopósido, que es un derivado semisintético de la podofilotoxina, tiene actividad terapéutica contra varias antineoplasias humanas. Más recientemente ha sido descrito como un fármaco prometedor para el tratamiento de cánceres de células pequeñas, en linfomas hodgkinianos y no hodgkinianos, en el linfoma histiocítico difuso y también ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer testicular (1).

Tradicionalmente, el VP-16 se administra en forma de infusión intravenosa rápida. Sin embargo, se ha reportado que con infusiones lentas o fraccionando la dosis, es decir, manteniendo concentraciones relativamente constantes y bajas, por periodos más largos se aumenta la efectividad, reduciéndose la incidencia de toxicidad (2).

La determinación de los niveles de VP-16 en fluidos biológicos se ha realizado comúnmente utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En distintos métodos descritos (1, 2, 3, 4) se emplean la absorción ultravioleta (UV), la fluorescencia y la oxidación electroquímica para detectar el VP-16. Sin embargo, la detección UV presenta como principal desventaja su limitada sensibilidad, mientras que el detector de fluorescencia requiere de una instrumentación muy compleja, así como tiempos de análisis muy largos. Ante estos inconvenientes, la detección electroquímica se ha considerado una solución, ya que este detector muestra una mayor sensibilidad y selectividad, aunque presenta la desventaja de tener la necesidad de ser limpiado frecuentemente para que no pierda su sensibilidad (4).

Ante la necesidad de cuantificar el etopósido en plasma humano cuando es administrado por vía oral en dosis bajas y de este modo conocer su farmacocinética y, eventualmente emplearlo en el monitoreo clínico del antineoplásico se pretende desarrollar y validar un método de CLAR con detección electroquímica sencillo, rápido y sensible que cumpla con tales propósitos (4).

OBJETIVO GENERAL

Validar un nuevo método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica para cuantificar el antineoplásico etopósido en plasma humano.

CAPITULO I

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

1.1 ANTECEDENTES

La palabra cromatografía es un término colectivo que se aplica a métodos que son diferentes en algunos aspectos, pero que comparten ciertas características. Básicamente, se entiende por cromatografía al método físico de separación. En el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases; una de estas fases constituye una capa estacionaria de gran área superficial, que puede ser un sólido o un líquido, y la otra es un fluido que eluye a través o a lo largo de la anterior, y puede ser un líquido o un gas. De este modo todos los tipos de cromatografía que se conocen pertenecen a una de las cuatro categorías siguientes: líquido-sólido, gas-sólido, líquido-líquido y gas-líquido (5)

Los precursores de esta técnica se pueden encontrar en el siglo XIX, pero se considera que un artículo publicado en 1906 por Michael Tswett, catedrático en botánica de la Universidad de Varsovia, dio la primera descripción de una separación cromatográfica en términos prácticamente modernos. Tswett describió la separación de las clorofilas y de otros pigmentos en un extracto vegetal (5).

La cromatografía quedó latente hasta 1931, cuando el prominente químico orgánico Kuhn dio a conocer las separaciones de los pigmentos carotenoides de algunas plantas. Esta investigación llamó más la atención y la cromatografía de adsorción se convirtió en una técnica muy utilizada en el campo de la química de productos naturales (5).

Son cuatro los desarrollos más importantes que se han realizado posteriormente: la cromatografía de intercambio iónico desarrollada por Adams y Holmes al final de la década de 1930, la cromatografía de partición desarrollada por Martin y Synge en 1941, la cromatografía de gases (CG) desarrollada por Martin y James en 1952 y la cromatografía de filtración en gel desarrollada por Porath y Flodin en 1959. Además de estos avances, también han aparecido modificaciones para la geometría del sistema cromatográfico, tanto en la cromatografía de papel como en la de capa fina (5).

Los desarrollos teóricos que permiten comprender en mejor forma el proceso cromatográfico, así como los factores que determinan el funcionamiento de la columna, aparecieron primeramente relacionados con la cromatografía de gases. Sin embargo, realizando los ajustes adecuados, son de igual utilidad para comprender la cromatografía en donde la fase móvil es un líquido (5).

De esta manera, se ha definido que en la CG, el comportamiento de retención de un soluto depende de su interacción con una sola fase (el líquido estacionario), además de los parámetros de operación que son la temperatura y la velocidad de flujo. Esto, debido a que el comportamiento de las moléculas de soluto en la fase vapor es independiente de la presencia de otros gases y el coeficiente de distribución (K), no depende de la naturaleza del gas acarreador. La fase móvil se selecciona en base a ciertos factores, que por lo general son la seguridad, el costo y las características del detector. En cambio, en la cromatografía de líquidos (CL) los solutos pueden interaccionar fuertemente con la fase móvil líquida y además, la interacción de ésta con la fase estacionaria puede tener un efecto pronunciado en la retención del soluto. Por esta razón, al manipular la composición de la fase móvil en la CL se tiene una manera de controlar la retención, lo cual no puede lograrse en la cromatografía de gases (5).

Por otro lado, una gran proporción de los compuestos químicos de interés no son lo suficientemente volátiles para ser analizados por CG, ya que ésta técnica requiere que la muestra se volatilice sin descomposición a fin de que pueda ser arrastrada por el gas transportador. En contraste, la cromatografía líquida requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil, y esto hace posible el análisis de compuestos de muy alto peso molecular, orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes. Así, aunque la cromatografía de gases suele ser el método que se elige cuando los compuestos son volátiles, la cromatografía de líquidos es potencialmente más útil (5).

1.2 PRINCIPIOS

Ante los inconvenientes que presentó la cromatografía de gases para analizar ciertas sustancias al principio de los años sesenta, algunos investigadores empezaron a examinar las posibilidades de mejorar la técnica de la cromatografía líquida. Su trabajo se benefició de los logros alcanzados en la teoría del proceso cromatográfico, lo cual permitió establecer el método para superar la lentitud de la difusión en la fase líquida, comparada con las fases gaseosas. Para ello fue preciso utilizar partículas de mucho menor tamaño, lo que requirió el uso de mayores presiones de entrada, y de nuevos detectores capaces de operar a bajo caudal y de detectar pequeñas cantidades de sustancias (5).

Inicialmente se eligió la presión como criterio fundamental de la moderna cromatografía líquida, que por ello se denominó cromatografía líquida de alta presión (del inglés HPLC: High Pressure Liquid Chromatography), sin embargo, este término sugería que la elevada presión mejoraba la eficiencia, siendo que la presión constituye un factor negativo que no contribuye a mejorar la separación. Debido a lo anterior se cambió el nombre de la técnica por "cromatografía líquida de alta eficiencia" (High Performance Liquid Chromatography) (6).

El principio en el que se basa la CL es la ley general de distribución, también conocida como ley del equilibrio heterogéneo, la cual puede enunciarse de la forma siguiente: "a una temperatura dada, la relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia distribuida entre dos disolventes (fases), no miscibles en contacto es constante". Esta constante es llamada de distribución, coeficiente de distribución o coeficiente de partición (K). La expresión matemática de esta ley es: $C_2/C_1 = K$, donde C_1 y C_2 son las concentraciones del soluto en equilibrio en los disolventes 1 y 2 (7).

Si una cantidad dada de un soluto en un disolvente se equilibra con un segundo disolvente no miscible en el primero, el soluto se distribuye entre los dos disolventes en la relación que exista entre su solubilidad en los mismos. La cantidad total de soluto encontrada en cada fase dependerá, por tanto, de su solubilidad en cada disolvente y del disolvente en cada fase (7).

Una descripción más detallada de los parámetros cromatográficos se presenta en el anexo A.

1.3 CLASIFICACION DE LA CLAR

En cromatografía líquida tradicionalmente existen cuatro modos diferentes de separación:

- Cromatografía líquido-sólido (adsorción)
- Cromatografía de exclusión
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía líquido-líquido (reparto)

Más recientemente la cromatografía de pares iónicos se ha establecido como otro modo importante. La aparición de las fases enlazadas simplificó de manera apreciable la cromatografía de partición (6).

A continuación se explican cada uno de los modos de la cromatografía líquida:

Cromatografía de Adsorción líquido-sólido (CLS)

En esta técnica la separación depende de la adsorción del soluto sobre adsorbentes polares, como la sílica gel o la alúmina. La CLS se utiliza preferentemente para la separación de solutos de diferente polaridad que son solubles en solventes orgánicos y que no son ionizables. La polaridad de las moléculas proviene de la presencia y de la posición de diversos grupos funcionales en ellas. Si una molécula tiene más de un grupo funcional, el más polar ejercerá un efecto mayor y determinará el tiempo de elución del compuesto. Por esta razón, la cromatografía de adsorción generalmente separa las mezclas en clases de compuestos, agrupándolos según el grupo o los grupos funcionales presentes (6).

La selección de la fase móvil en este tipo de cromatografía se efectúa convenientemente con la ayuda de la escala de Hildebrand, que clasifica los diferentes líquidos utilizados como fase móvil de acuerdo con un parámetro, llamado epsilon cero (ϵ_0) que indica su fuerza como disolvente. Los disolventes normalmente utilizados son: hexano, isooctano, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, metanol y agua. Mediante el mezclado de los disolventes mencionados pueden obtenerse fases móviles de cualquier polaridad (6).

Cromatografía de Intercambio Iónico

Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es una solución amortiguadora en la que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución (6).

Existen tres variables de la fase móvil que afectan a la retención de un soluto iónico: la fuerza iónica, el pH y la presencia de modificadores orgánicos. La más importante es el control de la fuerza iónica, que se efectúa con las sales del amortiguador (6).

Los rellenos para intercambio iónico pueden ser según su función intercambiadores de aniones o de cationes. Los rellenos usados comúnmente en cromatografía líquida están constituidos por polímeros de elevado peso molecular que contienen grupos iónicos covalentemente enlazados (6).

Cromatografía de Exclusión o Filtración en Gel

La separación en este modo de cromatografía se basa en el tamaño molecular del soluto. El empaque de la columna es un gel inerte con superficie porosa. Las moléculas pequeñas pueden entrar en esta superficie o red y ser retenidas durante más tiempo al paso de la fase móvil. Las moléculas grandes no pueden entrar en la red y pasan a través de la columna. El resultado de este proceso es un cromatograma en el cual las moléculas de mayor tamaño forman los picos iniciales y las de tamaño menor los finales (6).

Puesto que el tamaño de la molécula está relacionado con el peso molecular, el tiempo de elución de un determinado compuesto puede dar una idea bastante aproximada de su peso molecular. La forma de la molécula (lineal, globular, etc.) también ejercerá la correspondiente influencia. A esta técnica también se le conoce como "cromatografía sobre geles" (6).

La fase móvil en este tipo de cromatografía, solamente debe arrastrar a la muestra, sin interactuar con ella ni con el relleno de la columna. Idealmente la muestra debe ser muy soluble en la fase móvil, ya que si solo lo es ligeramente pueden tener lugar otros efectos, como la adsorción o el reparto, que falseen los valores de peso molecular (6).

Cromatografía de reparto (partición)

La separación depende de la distribución del soluto entre dos solventes prácticamente inmiscibles, uno de los cuales es la fase estacionaria y la otra es la fase móvil (8). Normalmente se utilizan combinaciones de una fase móvil no polar con una fase estacionaria muy polar o viceversa. Para evitar un gradual arrastre de la fase estacionaria al exterior de la columna por efecto de la solubilidad mutua que llegue a tener con la fase móvil, se procede a saturar la fase móvil con la fase estacionaria y de esta manera evitar la pérdida gradual del poder de separación (6).

Teniendo en cuenta la polaridad de la fase móvil, se pueden encontrar dos tipos de cromatografía de reparto: la cromatografía en fase normal, en la que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, y la cromatografía en fase inversa, en la que la fase móvil es más polar que la fase estacionaria, probablemente este segundo tipo es el más utilizado en la actualidad (6).

En la cromatografía de fase inversa se han desarrollado distintas clases de relleno de acuerdo a la polaridad de los compuestos a separar, siendo los más comúnmente usados las fases enlazadas de sílica con cadenas alquílicas de distinta longitud (C2, C8, C18, CN, etc.). De acuerdo a la polaridad de la muestra será la afinidad que tenga con la fase estacionaria. Si es apolar será soluble en la fase estacionaria y poco soluble en la fase móvil, formada por una mezcla agua-disolvente. Si se aumenta el contenido en disolvente de la fase móvil aumentará también la solubilidad de la muestra en esta fase, eluyéndose de la columna con mayor rapidez. Por el contrario, si la muestra se eluye con demasiada rapidez, hay que aumentar el contenido en agua, permitiendo así que la muestra se disuelva preferentemente en la fase estacionaria durante un período de tiempo mayor. La elección del componente menos polar de la fase móvil depende de diversos factores, principalmente de la solubilidad de la muestra, compatibilidad fase móvil-muestra-detector, viscosidad de la fase móvil y eficiencia del equipo utilizado. Entre los líquidos de uso general, el acetonitrilo y las mezclas acetonitrilo-agua, presentan

la menor viscosidad, por tanto estas mezclas suelen presentar la mejor eficiencia (6).

También se puede considerar la composición de la fase móvil: si se mantiene constante a lo largo de un cromatograma se habla de elución isocrática, en tanto que si varía se denomina elución por gradiente, con lo cual se varía la polaridad para los diversos picos (6).

Para poder seleccionar el modo adecuado de CLAR a emplear, se deben tomar en cuenta la solubilidad, grupos funcionales presentes y peso molecular de la muestra.

El diagrama de flujo de la figura 1 muestra un esquema general para la elección del tipo de CLAR, según las necesidades del análisis.

1.4 VENTAJAS Y APLICACIONES DE LA CLAR

Comúnmente el tiempo de análisis por CLAR es de menos de una hora. Incluso en análisis simples el tiempo necesario ha llegado a ser de menos de 5 minutos (8).

En contraste con la cromatografía de gases, en CLAR el soluto tiene la habilidad de interactuar selectivamente tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil dando parámetros adicionales para generar una mejor separación (8).

Los detectores utilizados en CLAR tienen diversos rangos de sensibilidad, por lo que pueden seleccionarse de acuerdo al tipo de análisis a efectuar, por ejemplo, los detectores de absorción UV pueden detectar hasta nanogramos en una amplia variedad de materiales y los detectores electroquímicos y de fluorescencia permiten detectar hasta picogramos (8).

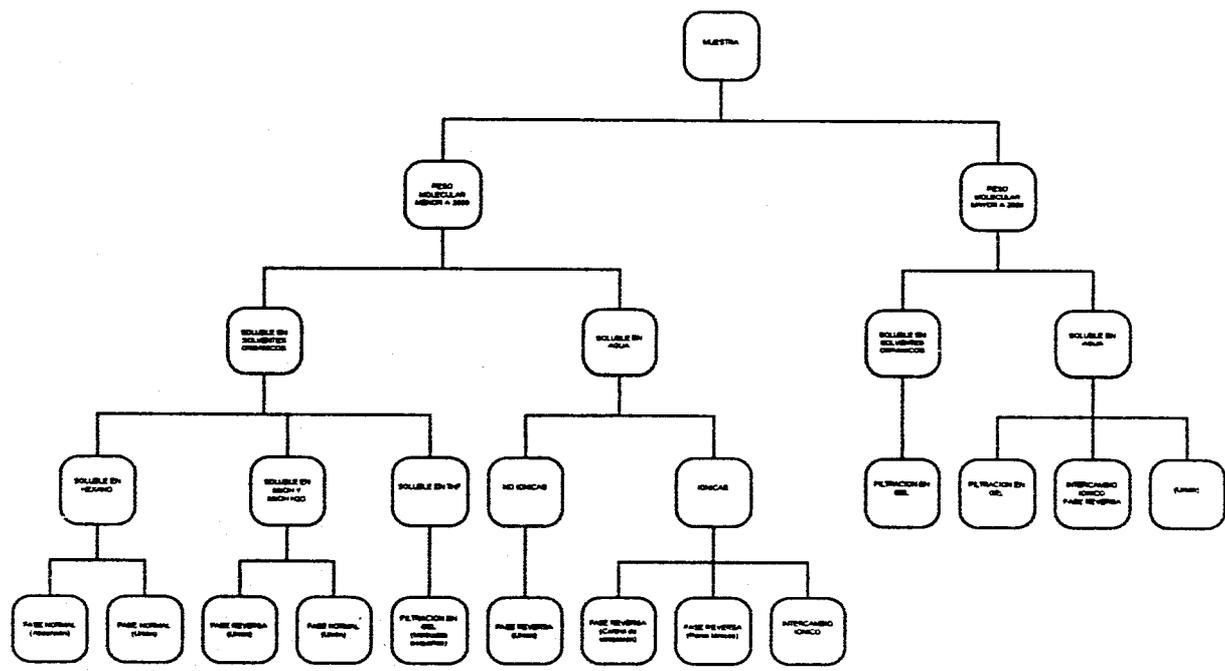


Figura 1. GUIA GENERAL DE ELECCION DEL TIPO DE CLAR

Las columnas son reutilizables, es decir, se pueden analizar un gran número de muestras con la misma columna, aunque esto también depende del tipo de muestras inyectadas y del tipo y pureza de solventes empleados (8).

Algunos de los detectores empleados en CLAR son no destructivos, por lo que la muestra puede ser colectada fácilmente después de su paso por el detector. (8).

Además, por CLAR se puede realizar el análisis de moléculas grandes y especies iónicas, lo que resultaría imposible por cromatografía de gases debido a que este tipo de moléculas son poco volátiles y/o termolábiles (8).

Por lo tanto la cromatografía líquida tiene muy diversas aplicaciones. En la mayoría de los casos éstas consisten en determinaciones de sustancias cuyos análisis son difíciles de realizar a través de otra técnica. Estas sustancias comprenden:

- a) Compuestos iónicos, como aminoácidos, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, etc.
- b) Compuestos de alto peso molecular, como polímeros, hidrocarburos polinucleares, productos naturales, etc.
- c) Compuestos termolábiles y no volátiles, como vitaminas, pesticidas, esteroides, plastificantes y un número muy grande de otros productos farmacéuticos (9).

1.5 INSTRUMENTACION EN CLAR

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son: un reservorio para la fase móvil; una bomba para impulsarla; un dispositivo para la introducción de la muestra (inyector); una columna que contenga la fase estacionaria; un detector para determinar la separación que tiene lugar, un equipo de captura y tratamiento

de datos y eventualmente un colector de fracciones (6). En la figura 2 se muestra el esquema típico de un sistema cromatográfico.

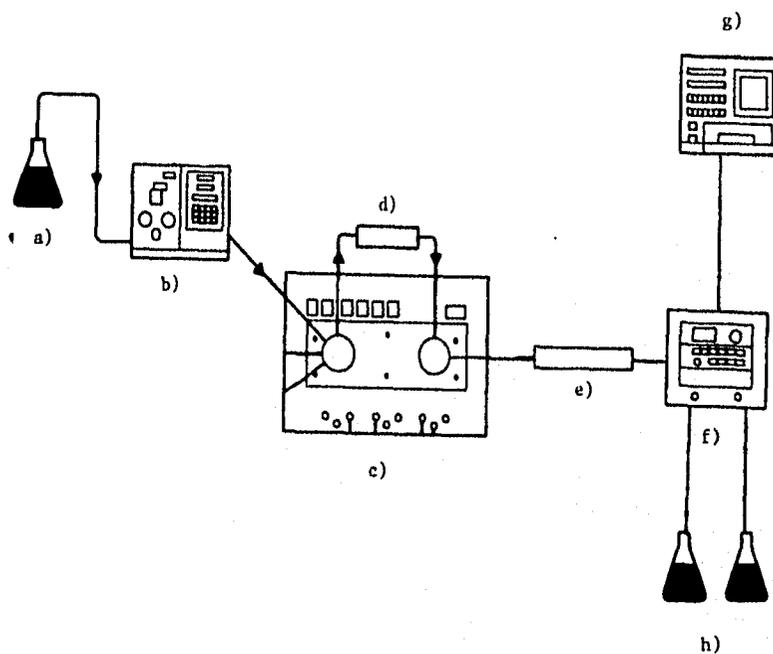


Figura 2. Partes principales de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución: a) depósito de fase móvil; b) bomba; c) inyector; d) precolumna e) columna; f) detector; g) registrador; h) colector de fracciones.

Fase móvil

Aunque la fase móvil no forma parte propiamente del instrumental, en cromatografía líquida la composición de la fase móvil es una de las variables que tienen una influencia directa sobre la separación. Existe una amplia variedad de solventes que pueden ser utilizados en CLAR, sin embargo, todos ellos deben compartir las siguientes propiedades en común deben: a) ser puros, libres de contaminantes; b) ser compatibles con el tipo de detector a utilizar; c) disolver la muestra; d) tener una baja viscosidad; e) permitir la fácil recuperación de la muestra, si se desea; f) ser disponibles comercialmente a un precio razonable; g) no deben reaccionar con el empaque de la columna (9).

Como reservorio de la fase móvil se utilizan recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros. La toma del disolvente generalmente se hace a través de un filtro, que tiene por objeto remover pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna (9).

La fase móvil debe ser desgasificada, ya que el aire disuelto origina que el detector genere oscilaciones en la línea de base -ruido- (8).

En ocasiones la fase móvil puede disolver la fase estacionaria, para evitarlo se satura la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su introducción al instrumento o mediante el uso de una precolumna que, por lo general, consiste en una sección corta de tubo, relleno de algún soporte sólido poroso, que contiene un alto porcentaje de fase estacionaria (9).

Los disolventes más comúnmente utilizados en cromatografía de líquidos de alta eficiencia son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua (9).

Bomba

Se utiliza para propulsar la fase móvil a través de la columna. Pueden ser de dos tipos: las que regulan la presión de entrada o bien, las que regulan el flujo de la fase móvil. Las primeras proporcionan una presión constante, mientras las segundas suministran un flujo constante durante la operación. La presión aumenta linealmente con el flujo, lo cual resulta de gran importancia al cambiar el caudal. En general, se utilizan caudales bajos, ya que la eficiencia aumenta a medida que el flujo disminuye, en columnas de 2-5 mm de diámetro interno suele utilizarse un caudal de 1-2 ml/min. A presiones elevadas se producen más fugas, la inyección resulta difícil y la eficiencia disminuye al volverse más denso el líquido y reducirse las velocidades de transferencia de masa (6).

Inyector

La introducción de la muestra debe realizarse sin provocar grandes disturbios en el empaque de la columna. Hay tres tipos básicos de inyectores:

a) **Inyector con paro de flujo:** El flujo es detenido, la inyección es realizada a la presión atmosférica, el sistema se cierra y el flujo se reinicia. Este método se utiliza con frecuencia, en especial cuando se trabaja en aparatos con presión muy alta (8).

b) **Inyectores con septum:** Estos inyectores son similares a los comúnmente usados en cromatografía de gases. Se utilizan cuando se tienen presiones arriba de 60 o 70 atmósferas (8).

c) **Válvulas loop:** Este tipo de inyectores son empleados comúnmente para inyectar volúmenes mayores a 10 microlitros y se utilizan corrientemente en sistemas automatizados. En la posición de llenado, la muestra se introduce a la presión atmosférica. Cuando la válvula es activada, la muestra en el *loop* es arrastrada al interior de la columna (8).

Columnas

La columna es el corazón del cromatógrafo. Se encuentran divididas en dos grupos: analíticas, en las que el diámetro interno típico es de 2-6 mm, la longitud de la columna depende del tipo de empaque; y preparativas que generalmente tienen diámetros de 6 mm y la longitud varía entre 25 y 100 cm (8).

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas más eficientes son de diámetro pequeño y efectúan análisis muy rápidos, su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido (9).

De acuerdo con la teoría cromatográfica al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria aumenta la velocidad de intercambio entre las fases móvil y estacionaria de manera que se pueden conseguir eficiencias suficientemente buenas a velocidades lineales de flujo relativamente altas. Por tal motivo, siempre se busca tener partículas pequeñas, de diámetro relativamente uniforme y de una forma regular (6).

Detectores

El detector es un dispositivo que suministra una señal exterior como respuesta a la presencia de una muestra en la columna. Suele ser el más sofisticado y uno de los más caros componentes del sistema cromatográfico (8).

Un detector se clasifica como selectivo si su respuesta difiere grandemente con la estructura molecular de la muestra, y como universal si su respuesta es similar para muchos compuestos. Los detectores selectivos más utilizados son los de absorción y fluorescencia. El detector universal más comúnmente utilizado es el de índice de refracción. Los detectores selectivos pueden ser utilizados para minimizar la interferencia de otros componentes presentes, y se consideran más sensibles que los detectores universales (8).

Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez que ser compatible con programaciones de fase móvil (6).

Otra característica de los detectores es la sensibilidad, la cual consiste en la mínima cantidad de sustancia que el detector puede medir. A mayor sensibilidad del detector se ofrece una mejor precisión en la cuantificación de los datos obtenidos (9).

Los detectores pueden ser caracterizados por ser destructivos o no destructivos de la muestra. Los detectores ópticos (UV, IR) comúnmente utilizados son no destructivos. Los detectores destructivos (electroquímico, ionización de flama, espectrómetro de masas) generan una alteración en alguna parte de la muestra. Otras características importantes que debe tener un detector son su facilidad de manejo y de mantenimiento (8).

A continuación se mencionan los tipos de detección más usuales en la CLAR:

Absorción óptica

Los detectores de absorción óptica utilizados en CLAR incluyen la región ultravioleta (190-400 nm), la región visible (400-700 nm) y el infrarrojo (2-25 μm). Este tipo de detectores son selectivos y tienen la suficiente versatilidad para poder utilizarse en la mayoría de aplicaciones de la CLAR (8).

Los detectores de absorción UV se utilizan para detectar compuestos que tienen una estructura química relativamente compleja que puede contener enlaces conjugados o grupos funcionales, ya que estos grupos son los responsables de la absorción en el UV o en la región visible. Son compatibles si se utiliza gradiente de elución y son no destructivos, además de ser fáciles de operar y limpiar. Los detectores de absorción IR tienen una limitada sensibilidad y una significativa interferencia del solvente, por lo que no son muy utilizados en CLAR (6).

Fluorescencia

Representa el tercer tipo de detectores más comúnmente utilizados en CLAR. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como los que pueden convertirse en fluorescentes por simple derivatización, es el tipo de detección más sensible que existe. Al aumentar la sensibilidad también aumenta la especificidad. Las ventajas de la gran sensibilidad y especificidad se utilizan para determinar especies con fluorescencia específica en muestras complejas (6).

Ionización de flama

Se considera un detector de tipo universal. Puede utilizarse en los trabajos con elución por gradiente. Las desventajas que presenta son: pérdidas de la muestra en la cámara de vaporización, gran ruido de fondo debido a la contaminación del filamento o de la cinta transportadora, límites de detección bajos, alto grado de complejidad en el establecimiento de los parámetros de trabajo. Su utilización se restringe a compuestos con alto punto de ebullición (6).

Conductividad electrolítica

Se mide de manera continua la conductividad específica del efluente, indicándose la presencia de una muestra por medio de cambios de conductividad. La operación con gradientes de fase móvil dan lugar a una deriva proporcional en la línea de base. La inestabilidad de la cubeta es uno de los inconvenientes de este tipo de detección (6).

Índice de refracción

El índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. Puesto que la detección se basa en equilibrar el sistema a caudal constante de fase móvil pura y medir el cambio del índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil, cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil mayor será el desequilibrio, obteniéndose la máxima sensibilidad. Un inconveniente de este tipo de

detector es la necesidad de reequilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil, por tal motivo resulta inutilizable cuando se está trabajando con elución por gradiente (6).

Electroquímica

Este detector se basa en la aplicación de un potencial (oxidación o reducción) sobre el compuesto eluido en un electrodo adecuado, midiéndose la corriente de difusión resultante. Puesto que la cantidad de corriente es una medida directa de la concentración, el proceso es cuantitativo. La corriente de electrones en el electrodo es monitoreada como una función del tiempo para dar la señal, la cual es amplificada y mostrada en un registrador de manera convencional (6, 8).

Para poder aplicar esta técnica, se han desarrollado nuevos materiales para los electrodos y se han diseñado cubetas de pequeño volumen con geometrías muy eficaces. Se utiliza pasta de carbón, carbón pulimentado y amalgama de oro-mercurio, normalmente con un contraelectrodo de plata-cloruro de plata (6).

No todos los compuestos son electroactivos. Los detectores electroquímicos son usados en casos en que las propiedades de la muestra y el solvente lo permitan. Los compuestos a los que puede aplicarse este tipo de detección son algunos de los medicamentos más importantes, compuestos contaminantes y productos naturales. Su gran especificidad y sensibilidad convierten a esta técnica en un medio útil para el análisis en mezclas complejas. Su sensibilidad llega a ser del orden del picomol (6).

Una de las consideraciones a tomar en cuenta para la selección del detector electroquímico son: que el electrodo sea compatible con la fase móvil y que la fase móvil sea conductora de la corriente eléctrica, lo cual normalmente se consigue por adición de la sal adecuada. La cromatografía de intercambio iónico y de fase inversa resultan los mejores campos de aplicación (6, 8).

La mayor desventaja que presenta este tipo de detector es que se "ensucia" y por lo tanto pierde sensibilidad de respuesta, por lo que es necesario limpiarlo periódicamente (8).

Registadores

Su función es representar en un registro gráfico, la señal generada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 mV. Otras características deseables de los registradores son una respuesta rápida de la pluma y velocidades variables del papel (9).

CAPITULO II

VALIDACION

2.1 DEFINICION Y OBJETIVOS

La validación es una parte integral del aseguramiento de calidad. Un proceso validado es aquel que ha sido probado y formalmente aprobado, para ser utilizado con la seguridad de que cumple con las especificaciones requeridas. Existen varios tipos de validación (10).

Los objetivos por los cuales se debe desarrollar la validación de un método o proceso son (10):

- 1) Cumplir con las normas legales y reglamentaciones oficiales.
- 2) Asegurar la funcionalidad del método y calidad del producto analizado.
- 3) Reducir los gastos rutinarios.
- 4) Permite que el conocimiento del proceso sea más profundo.
- 5) Un proceso completamente validado puede requerir de un menor control durante su realización y evita la realización de todas las pruebas de calidad que se realizan al producto terminado.

La validación analítica es una medida de la funcionalidad de un sistema analítico total, se utiliza para demostrar que los métodos analíticos proveen resultados que permiten evaluar objetivamente la calidad de un producto farmacéutico. Es necesaria cuando el método intenta ser aplicado en una compañía de manufactura, dentro de un laboratorio de control oficial o cuando quiere ser incluido en la farmacopea. Cada procedimiento nuevo debe ser validado (10).

En la validación de los métodos analíticos están involucrados los siguientes factores:

- 1.- La documentación de materiales, equipo y procedimiento debe estar completa y entendible.
- 2.- Las muestras deben ser representativas y compararlas con sustancias de referencia certificadas (estándares).
- 3.- La calidad de los reactivos y la capacidad de los materiales utilizados debe conocerse.
- 4.- El equipo e instrumentos deberán estar calibrados.
- 5.- La validación deberá realizarla personal capacitado y responsable.

La validación analítica se usa para determinar el contenido de principio activo, los niveles de impurezas o productos de degradación, etc.. La forma de validar un método analítico dependerá de la aplicación que se le va a dar: en control de calidad, estudios de estabilidad, análisis de materia prima, análisis del producto en proceso, análisis de producto terminado, además de que también incluyen a los métodos analíticos empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en especímenes biológicos y para evaluar e interpretar datos farmacocinéticos, cuando se realizan estudios biofarmacéuticos *in vivo*.

De acuerdo a lo anterior los métodos pueden clasificarse en cuatro clases:

CLASE A

Incluye los métodos diseñados para establecer la identidad de una sustancia, o para establecer la presencia de otros ingredientes en una forma dosificada (10).

CLASE B

Incluye los métodos que se utilizan para detectar y cuantificar impurezas en una sustancia o forma dosificada (10).

CLASE C

Son los métodos utilizados para cuantificar la cantidad de sustancia presente en una forma dosificada (10).

CLASE D

Son los métodos utilizados para cuantificar las características de las formas dosificadas terminadas, como perfiles de disolución, uniformidad de contenido, etc. (10).

Cuando el ensayo de un fármaco es desarrollado y validado, las muestras desconocidas pueden ser analizadas y medidas junto con una adecuada curva estándar y controles independientes preparados de la muestra. La importancia de que una metodología analítica sea adecuada y validada es el hecho de que se obtienen datos confiables.

2.2 REGLAMENTACION

En los Estados Unidos de America, el gobierno exige que todos los procesos farmacéuticos sean validados. Un requisito legal similar existe en muchos otros países. También el concepto de validación está claramente implícito a lo largo de todas las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los E.U.A.

La Food Drug Administration (FDA) ha publicado recientemente el segundo borrador de una "Gula sobre principios generales de validación de procesos" (13).

El propósito declarado de la gula es describir los principios generales que la FDA considera como partes importantes de la validación de procesos para la preparación de productos farmacéuticos para uso humano, veterinario e implementos médicos.

La reglamentación en México es relativamente reciente e inició con la exigencia de las validaciones de los métodos analíticos, la cual es la primera en hacerse oficial y se dió a conocer en el Diario Oficial del Lunes 18 de Enero de 1988 en la primera sección (11).

2.3 VALIDACION DE METODOS BIOANALITICOS

La validación de métodos bioanalíticos se utiliza para proporcionar datos confiables en estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad, puede estar sujeta a diferentes métodos de interpretación (14).

Los procedimientos de control de calidad en análisis biofarmacéuticos no ha sido bien establecida. Las diversas formas de interpretación de la evaluación de la calidad de los métodos analíticos y los resultados obtenidos dificultan la determinación de si un método analítico cumple o no con los requerimientos necesarios en un proyecto determinado (14).

Desarrollo de métodos analíticos

La primera función del método es determinar la calidad del método en sí. Los dos factores más importantes para determinar la calidad del método son la selectividad de recuperación y la estandarización (14).

La recuperación analítica de un método nos indica si el método analítico en cuestión nos proporciona una respuesta adecuada a la cantidad total de muestra introducida. La recuperación generalmente se define como el porcentaje de material de referencia que es medido con respecto al que ha sido adicionado (14).

En la validación de métodos analíticos en fluidos biológicos muchas veces se utiliza la técnica del estándar Interno, especialmente en procedimientos cromatográficos. La recuperación del estándar interno se determina en forma independiente. Los valores de recuperación no menores al 50, 80 o 90% se

consideran aceptables, sin embargo es deseable obtener una recuperación lo más cercana posible al 100%, aunque esto no necesariamente indica una buena precisión y exactitud (14).

El otro factor importante en el desarrollo de un método es la estandarización, la cual se puede realizar tanto interna como externamente. En la estandarización externa, se construyen gráficas de concentración contra respuesta medida para obtener la curva de calibración. En la estandarización interna se requiere de un análogo isotópico o funcional del analito el cual se adiciona a las muestras antes del tratamiento, de este modo, la respuesta generada es una relación del analito con respecto al estándar utilizado (14).

2.4 PARAMETROS EVALUADOS EN LA VALIDACION DE METODOS BIOANALITICOS

Los criterios de aceptación en los métodos bioanalíticos a menudo son mas flexibles que los correspondientes a los ensayos realizados en la industria farmacéutica debido a la complejidad de la matriz biológica en la cual se encuentran inmersos los compuestos de interés. Los principales parámetros evaluados en la validación se mencionan a continuación:

Selectividad y especificidad

La especificidad, se refiere al método que genera respuesta solamente para un analito determinado. Sin embargo son pocos los métodos que generan este tipo de respuesta, por lo que es poco apropiado el término de específico. La selectividad indica si el método provee una respuesta para un limitado número de sustancias las cuales pueden o no ser distinguidas. Si la respuesta en cuestión se distingue de otras respuestas, se dice que el método es selectivo (14).

Hay varias maneras de probar la selectividad, una de las más comunes es demostrar que no existen interferencias debidas a otros compuestos presentes en

la matriz biológica (sangre, plasma, orina, etc.) a los tiempos en que deben eluir los compuestos analizados (14).

Linealidad del sistema

La curva de calibración se debe construir utilizando de cinco a siete valores dentro del rango de concentraciones esperadas. Es convencional utilizar el modelo lineal y de regresión univariada para ajustar los datos experimentales. En este modelo la variable independiente (x) es la concentración y la variable dependiente (y) es la respuesta medida (14).

La linealidad puede ser demostrada por simple observación de la curva de calibración, un criterio de aceptación es que la pendiente entre dos puntos de la curva no debe desviarse más de un 5% de la pendiente general. Por otra parte la ordenada al origen no debe ser estadísticamente distinta a cero, con un coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99 y una varianza explicada (r^2) mayor o igual a 0.98 (14).

Precisión del sistema

Esta prueba determina el error atribuible solamente al sistema operativo en sí y no al error debido a la manipulación de la muestra.

La precisión del sistema es una parte de la precisión del método por lo que su desviación estándar relativa - error estándar (E.E.) - debe ser menor. Por la misma razón, se puede considerar que aproximadamente la mitad de la varianza total del método es atribuible a la varianza del sistema. A menudo la precisión del sistema es medida a través del coeficiente de variación, el cual está definido como:

$$CV = 100 * DE / X$$

Donde: CV: Coeficiente de variación

DE: Desviación estándar

X: Media

Eficiencia del sistema

Es una medida del funcionamiento del sistema en un determinado día, entendiendo como sistema a todos los componentes del equipo, solventes y dispositivos electrónicos. Los parámetros tomados en consideración para esta verificación son: el número de platos teóricos, el factor de resolución entre dos picos y el factor de simetría.

Linealidad del método

Se refiere a la capacidad del método para producir resultados que son directa o indirectamente proporcionales a la concentración de la sustancia analizada (10).

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad, estabilidad, bioensayos, etc.), y preferentemente deberán llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación (10). Los criterios de aceptación son similares a los correspondientes a la linealidad del sistema.

Exactitud

La exactitud nos dice que tan cercano se encuentra el valor promedio de las observaciones para un valor específico, con respecto al valor verdadero de una muestra. La exactitud se define en términos de selectividad y especificidad. También es llamada como error sistemático o "bias" (10).

La medida de la exactitud se hace en base a la presencia o ausencia del sesgo. Para establecer si el sesgo es significativo, se construye un intervalo de confianza para la media, el cual debe incluir el 100% .

Precisión del método

Nos indica el patrón de variación que tiene el método para realizar mediciones repetidas. Es llamada también error al azar. La precisión es medida a través del coeficiente de variación intraensayo ($CV= 100 * DE/X$). Permite verificar la variación tanto del instrumento, como la del procedimiento (10). Para bioensayos cromatográficos el coeficiente de variación debe ser menor al 15%.

Reproducibilidad

Indica la precisión del método cuando son realizadas las determinaciones por diferentes analistas, diferente día, diferente laboratorio y equipos (10). También es medido a través del coeficiente de variación, en este caso denominado interensayo. Los resultados deberán estar dentro de los mismos criterios que se establecieron para la precisión del método. Los resultados de las dos pruebas deberán concordar a un nivel de confianza del 95%.

Estabilidad de la muestra

Esta prueba nos permite conocer si ha habido cambios en la composición de los ingredientes activos y soluciones utilizados durante el análisis, ya que estos puede ser causa de la falta de exactitud y/o precisión de la técnica.

Las muestras se analizan bajo distintas condiciones (por ejemplo, temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz) durante un tiempo preestablecido dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia (10).

Sensibilidad y límite de cuantificación

Se dice que un método es sensible si los pequeños cambios en concentración causan grandes cambios en la respuesta analítica. Aunque la sensibilidad (definida por la pendiente de la curva de calibración) está muy relacionada con la habilidad del método para medir pequeñas concentraciones no se puede considerar como criterio para medir la reproducibilidad (14).

Se define como límite de cuantificación a la mínima concentración de sustancia que puede ser determinada con una exactitud y precisión aceptable. Se expresa en términos de concentración (10).

CAPITULO III

ETOPOSIDO

3.1 FARMACOLOGIA

El etopósido (4'-demetilepípodofilotoxina-9-tenilideno-D-glucopiranosido) o VP-16, cuya estructura se muestra en la figura 3, es un antineoplásico derivado de la podofilotoxina, que bloquea el ciclo celular a nivel de la interfase S-G2, y en altas concentraciones provoca una detención a nivel de G2. La actividad antitumoral *in vitro* es dependiente de la dosis y del plan de administración. El perfil clínico del etopósido está bien caracterizado en carcinomas pulmonares de células pequeñas y no pequeñas, y en cáncer testicular. La combinación del etopósido y cisplatino ha mostrado mayor actividad antineoplásica en el tratamiento de carcinomas pulmonares de células pequeñas y cancer testicular. Esta combinación es particularmente benéfica como quimioterapia de salvación en el tratamiento de una variedad de tumores resistentes a otras combinaciones de antineoplásicos. La manifestación tóxica que limita la dosis del etopósido es la leucopenia (12).

Tradicionalmente, el etopósido ha sido administrado en forma de infusión intravenosa rápida pero se ha reportado que con infusiones lentas o fraccionando la dosis, es decir, manteniendo concentraciones relativamente constantes por periodos más largos se aumenta la eficacia, reduciéndose la incidencia de toxicidad (2).

Se han utilizado varios métodos para caracterizar la farmacocinética del etopósido incluyendo el radioinmunoensayo y la cromatografía de líquidos de alta resolución. Los estudios han sido realizados administrando el etopósido por vía oral, intravenosa, intra-arterial e intraperitoneal. Hay estudios que reportan que la

biodisponibilidad absoluta del etopósido administrado por vía oral pero utilizando distintas formas farmacéuticas varía. De esta manera se ha reportado que cuando se proporciona en cápsulas, la biodisponibilidad es de 32, 50 y 57% (21, 22), mientras que cuando se da en solución es del 53 y 91% (21, 22). Estudios hechos por Harvey et al. en 1986 (24) reportan que cuando se duplica la dosis de etopósido administrado por vía oral de 200 a 400 mg el área bajo la curva se incrementa en un 50%, sin embargo cuando se aumenta a 600 mg el incremento es de sólo un 2.2%, es decir, la farmacocinética del VP-16 no es lineal a dosis superiores a 200 mg (12). Existe una considerable variación de los valores farmacocinéticos obtenidos de pacientes tratados con etopósido administrado por vía oral y de pacientes a los que se les ha administrado por vía intravenosa (12).

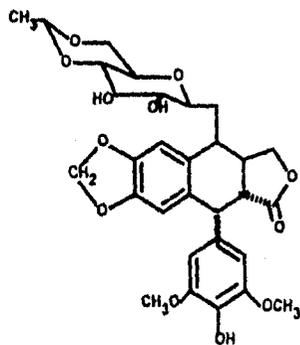


Figura 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VP-16

En 17 estudios realizados en el periodo de 1980-1988 en que el etopósido se administró por vía intravenosa los datos obtenidos para el volumen de distribución aparente oscilaron entre 3 a 36 L/m² con una mediana de 9.7 L/m², y los datos del volumen de distribución del estado estacionario oscilaron entre 4.7 y 25.2 L/m² con una media de 8.3 L/m². Mientras que en un estudio realizado por D'Incalci et al., en 1982 (22), en que el etopósido se administró por vía oral en forma de capsulas, el volumen de distribución reportado en 8 pacientes fué de 13.9 L/m² y de 15.2 L/m² en los 10 pacientes restantes (12).

La eliminación del etopósido es principalmente a través de la orina, y la recuperación del fármaco sin cambio es de un 30 a 40%. Se han detectado varios metabolitos del etopósido principalmente como glucurónidos (12).

En pacientes a los que se administraron 400 mg de etopósido por vía oral, la excreción en orina fue de un 25% después de 24 horas, y este porcentaje no disminuyó durante los tres días que estuvieron bajo tratamiento (12).

El tiempo de vida media de eliminación del fármaco varía de acuerdo al ensayo utilizado. Los ensayos más sensibles derivan en modelos compartamentales más complejos para el análisis farmacocinético, consecuentemente la vida media del etopósido se incrementa de acuerdo al número de compartimentos utilizados en el modelo. La mayoría de los estudios utilizan el modelo de dos compartimentos, y la vida media obtenida oscila entre 3.4 y 8.1 horas con una media de 5.6 horas. Sin embargo, en los estudios en que se utiliza el modelo de tres compartimentos, la vida media de eliminación se incrementa considerablemente, obteniéndose hasta de 23.2-43.2 horas (23; 25) (12).

3.2 ESTABILIDAD

El etopósido tiene una limitada estabilidad en forma de solución inyectable, y se han realizado varios trabajos sobre esta característica, sin embargo, muestran una amplia variación en los resultados reportados. Floor y colaboradores reportaron en 1985 (20) las principales vías de degradación del etopósido, siendo la transformación al isómero picro-etopósido la principal responsable de la precipitación que indica la pérdida de estabilidad (20). Debido a esto, Joel y colaboradores (13) realizaron dos nuevos estudios para determinar la estabilidad del etopósido. El primer estudio consistió en inspeccionar visualmente soluciones de etopósido a las concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml para observar la formación de precipitado y analizar esas mismas soluciones utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar el tiempo al cual la concentración disminuía a menos del 10%, valor que se consideró como límite de la estabilidad. Los resultados demostraron que mientras la concentración del etopósido disminuía la estabilidad aumentaba, observándose que soluciones de 0.25 mg/ml de etopósido se mantenían estables por más de 8 días. Por lo tanto, este estudio demostró que la estabilidad del etopósido es dependiente de la concentración y que la detección visual de precipitado es tan sensible como la utilización de la CLAR para determinar la pérdida de estabilidad. En el segundo estudio Joel y colaboradores describieron que a 20-23°C el etopósido contenido en bolsas de infusión (Viaflex) es más estable mientras menos muestreo es requerido.

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

4.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES

El etopósido puro fue gentilmente donado por Laboratorios Bristol-Myers Squibb de México, S.A. de C.V.; el 2-Acetamidofenol usado como estándar interno se compró a Sigma (St. Louis, MO, USA); el metanol grado cromatográfico, para la fase móvil, se compró a Merck (Darmstadt, Alemania); el agua desionizada se obtuvo a través de un Sistema Milli-Q (Continental Water Systems, El Paso, TX, USA). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Se prepararon soluciones stock de etopósido y del estándar interno a una concentración de 1 mg/ml. Ambas se disolvieron en metanol. Para la realización de las curvas de calibración se realizaron diluciones metanólicas secuenciales a partir de las soluciones anteriores para obtener soluciones de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 µg/ml para el etopósido y una solución acuosa de 500 ng/ml para el estándar interno. Estas soluciones fueron conservadas a -20°C.

4.2 OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS PLASMATICAS

Para realizar la validación del método se utilizó plasma humano el cual fue amablemente donado por el Banco de Sangre del Hospital del Instituto Nacional de Cancerología. Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron a partir del análisis de muestras plasmáticas de un paciente del mismo hospital. A 1 ml de plasma colocado en un tubo cónico (muestras conteniendo cantidades conocidas de etopósido, o muestras del paciente con concentraciones de etopósido desconocida) se adicionaron 200 µl de estándar interno, 2-acetamidofenol, a una concentración

de 500 ng/ml y 4 ml de NaH_2PO_4 0.5 M a pH 7.2. Los tubos se agitaron a la máxima velocidad en un vortex Genius-Supremixer 2 (Scientific Industries, N.Y., U.S.A.) durante 20 segundos. La extracción se realizó por adición de 6 ml de una mezcla eter etílico-diclorometano 2:1 (v/v), agitándose nuevamente durante 1 minuto. Las dos fases se separaron por centrifugación a 4500 rpm por 5 minutos en una centrífuga modelo K (International Equipment Company, Boston, MA, USA). La fase orgánica superior fué transferida a un tubo cónico y evaporada a sequedad a 45°C en un baño de agua bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco fué reconstituido con 200 μl de fase móvil. Se tomaron alícuotas de 100 μl para ser inyectadas al sistema cromatográfico. La figura 4 muestra el diagrama de flujo de operaciones durante la extracción del etoposido en muestras plasmáticas.

4.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución constituido por una bomba modelo M-45 (Waters Associates, Milford, MA, USA) para impulsar la fase móvil la cual estuvo constituida por una mezcla de metanol-buffer de acetatos 0.075M a pH 3.8 en una proporción de 45:55 (v/v) a un flujo constante de 1 ml/min; un inyector Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA) equipado con un asa de inyección de 100 μl . La separación de los compuestos se realizó sobre una columna Waters Nova-pak con un tamaño de partícula de 4 μm y 150 mm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno. Para prolongar la vida de la columna analítica se utilizó una precolumna empacada con Corasil C18 con un tamaño de partícula entre 37-50 μm y 40 mm de longitud x 4 mm de diámetro interno.

Los compuestos se detectaron utilizando un detector amperométrico LC-45 acoplado a un transductor electroquímico (BAS, West, Lafayette, IN, USA) en modo de oxidación a +800 mV, utilizando un electrodo de trabajo de carbón vidriado contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl, registrándose la respuesta generada.

1 ml de plasma humano

Añadir 200 µl de estándar interno (500 ng/ml)
200 µl de etopósido a diversas concentraciones
y 4 ml de NaH_2PO_4 0.5M

Agitar 20 segundos en vortex

Agregar 6 ml de una mezcla eter etílico-diclorometano 2:1
y agitar en vortex durante 1 minuto

Separar las fases por centrifugación a 4500 rpm
durante 5 minutos

Transferir la fase orgánica a un tubo cónico y
evaporar en baño de agua a 45°C bajo corriente de nitrógeno

Reconstituir con 200 µl de fase móvil

inyectar 100 µl de la reconstitución al sistema
cromatográfico

**Figura 4. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE EXTRACCION DEL
ETOPOSIDO.**

4.4 VALIDACION

4.4.1 VALIDACION DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se determinó construyendo curvas de calibración (concentración vs. respuesta medida). Para la elaboración de las curvas se utilizó un volumen de inyección de 30 μ l de los estándares a las siguientes concentraciones 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 μ g/ml, correspondientes a los puntos de calibración del etopósido en plasma, el análisis se hizo por sextuplicado. Con los datos generados y realizando un análisis por regresión lineal se obtuvieron el promedio y el error estándar en cada punto, el coeficiente de correlación y la pendiente de la curva.

La precisión y la exactitud del sistema se determinaron a través del coeficiente de variación intraensayo. Por otra parte se determinó la variabilidad en el sistema utilizando el coeficiente de variación interensayo, calculado después de inyectar 30 μ l de las soluciones de etopósido a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 μ g/ml, en varias ocasiones durante un periodo de 2 semanas. La eficiencia del sistema se obtuvo a través del factor de resolución.

4.4.2 VALIDACION DEL METODO

La linealidad del método se obtuvo preparando curvas de calibración adicionando cantidades conocidas de etopósido a muestras de plasma libres de fármaco para llegar a las siguientes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 y 4.0 μ g por mililitro de plasma. Las muestras fueron procesadas como se describió anteriormente y se determinaron las alturas de los picos cromatográficos producidos por el etopósido y el estándar interno. Se calculó la relación entre la altura del pico del etopósido y del pico del estándar interno y este valor fue graficado en función de la concentración de etopósido adicionado en la muestra. Para ajustar los datos se empleó un análisis de regresión lineal.

La sensibilidad se midió a través de la obtención de la pendiente de la curva de calibración y del límite de cuantificación. Este último correspondió a la menor concentración de etopósido que registró un pico igual a tres veces la señal generada por el ruido propio del detector.

La precisión y exactitud se determinaron a través del coeficiente de variación intraensayo y a partir del análisis sextuplicado de muestras obtenidas independientemente que contenían una misma cantidad conocida de etopósido y estándar interno. Por otra parte, la variabilidad se determinó a través del coeficiente de variación interensayo el cual fué obtenido inyectando muestras repetidas de plasma que contenían 0.2, 1 y 10 µg de etoposido por ml de plasma.

La estabilidad de las soluciones de trabajo fue determinada mediante la comparación de las alturas de los picos generados en los análisis iniciales de 3 muestras con las obtenidas de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. Los estándares utilizados fueron de 0.5, 5, 50 y µg/ml de etoposido, a -20°C, -4°C y a temperatura ambiente. Los estándares se analizaron a las 0 horas (control), 1, 3, 7 y 21 días. Simultáneamente, se realizó una inspección visual de los mismos estándares, incluyendo además el estándar de 500 µg/ml de etopósido para evaluar la presencia de precipitado, considerando a éste como indicador de pérdida de la estabilidad.

4.5 OBTENCIÓN DE ALGUNOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DEL ETOPOSIDO ADMINISTRADO POR VIA ORAL

El objetivo de validar el método por CLAR fue poder evaluar la farmacocinética del VP-16 cuando se administra oralmente. Por tal motivo, y para mostrar su aplicación se administró por vía oral una dosis de 50 mg de una solución de etopósido a un paciente del Hospital del Instituto Nacional de Cancerología y se obtuvieron muestras a diversos tiempos. Se construyó la gráfica del curso temporal

de los niveles plasmáticos y se obtuvieron los siguientes parámetros: concentración máxima alcanzada (C_{max}) y tiempo requerido para llegar a ésta (t_{max}), calculándose la vida media ($t_{1/2}$) por regresión log-lineal de la fase terminal de la curva y el área bajo la curva (AUC) al tiempo final de muestreo por el método trapezoidal.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 RESULTADOS CROMATOGRAFICOS

Se revisó la información existente acerca de los métodos de análisis de etopósido (VP-16), para determinar las condiciones tanto de extracción como cromatográficas que permitieran la adaptación de un método rápido y económicamente accesible para el monitoreo clínico de este fármaco.

El etopósido es un compuesto con estructura química muy compleja con características neutras. En diversos estudios (15, 16, 17, 18, 19, 20), se ha utilizado, para la fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos a pH 7 y metanol. Sin embargo, realizamos ensayos cambiando el buffer de fosfatos por uno de acetato de sodio variando progresivamente el pH hasta obtener la mejor resolución, la cual se logró a un valor de 3.8. La proporción final fase acuosa-solvente fue de 45:55 (v/v).

Se realizaron varios ensayos para elegir el estándar interno apropiado. Primeramente se probó una sustancia emparentada con el etopósido, el tenipósido o VM-26. Sin embargo, fue descartado debido a que presentaba un tiempo de retención muy largo y, sobre todo porque su costo es tan alto como el del VP-16 lo cual encarecería el ensayo.

Generalmente el estándar interno debe presentar características fisicoquímicas semejantes al compuesto que se está analizando, aunque cuando el estándar sólo se requiere para monitorear la estabilidad o corregir errores de

dilución o pipeteo se puede elegir cualquier otra sustancia (14). Debido a lo anterior, se comenzó a ensayar con sustancias estructuralmente distintas al compuesto de interés, pero que mantuvieran las características cromatográficas y electroquímicas semejantes al VP-16 y que presentaran un tiempo de retención adecuado. De las sustancias ensayadas el 2-para-acetamidofenol resultó ser la más propicia, pues, bajo las características cromatográficas óptimas anteriormente descritas, se obtuvo un tiempo de corrida total menor a los 6 minutos; esto es, 3 min. para el estándar interno y 5.6 min. para el VP-16. Además, cuando se evaluaron muestras plasmáticas libres de fármaco -blancos- no se encontraron picos de sustancias endógenas que interfirieran con los tiempos de elución de nuestros compuestos de interés. La figura 5 muestra los cromatogramas típicos.

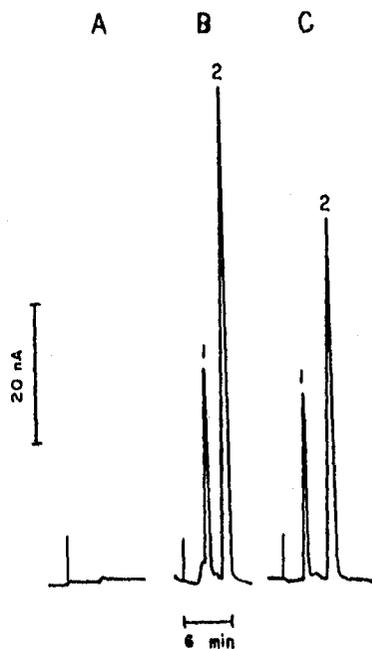


Figura 5. Cromatogramas típicos de a) muestra plasmática libre de fármacos (blanco); b) muestra plasmática con cantidades conocidas de estándar interno (1) y elopósido (2); c) muestra plasmática de un paciente 1 hora después de la administración de 50 mg po de VP-16.

En cuanto a la extracción, en varios de los métodos consultados (16, 17, 18, 19, 20) se utilizaron éter isopropílico o mezclas de dicloroetano y un segundo solvente para extraer el etopósido, estos solventes tienen una elevada apolaridad. Sin embargo, la disponibilidad y el costo de estos solventes hicieron imposible su uso en nuestro estudio. Debido a ello se buscaron otros que presentaran características semejantes a los mencionados anteriormente, pero con menor costo. El sistema de solventes más eficiente resultó ser éter dietílico:diclorometano. Al realizar ensayos para determinar la proporción óptima se encontró que utilizando un volumen de 6 ml de una mezcla 2:1 éter:diclorometano (v/v) la extracción tenía el mejor rendimiento. En el método desarrollado por Harvey y S.P. Joel (15) se utilizó un buffer de fosfatos a pH 7.3 para favorecer la extracción del compuesto desde el plasma. Simultáneamente en este trabajo, y con el sistema de solventes arriba mencionado, la recuperación es máxima cuando se emplean 4 ml de tal regulador.

Al medir las alturas de los picos generados por los estándares del etopósido con respecto a las obtenidas después de realizar la extracción en muestras plasmáticas, conteniendo una concentración de etopósido equivalente, se obtuvo una recuperación prácticamente total (99.2 +/- 0.6%).

5.2 RESULTADOS DE LA VALIDACION

Validación del sistema

La linealidad del sistema se evaluó a través del análisis de regresión lineal efectuado sobre los puntos de concentración de la curva de calibración. Las determinaciones se repitieron al menos seis veces. La ecuación que mejor describe la curva es:

$$Y = 1.1166 X - 0.0338$$

donde Y corresponde a la altura del pico y X a la concentración de etopósido en $\mu\text{g/ml}$, con un coeficiente de correlación igual a 0.9999 y un r^2 igual a 0.9998. La gráfica de la curva se muestra en la figura 6 y nos indica que el método es lineal ya que los extremos de la curva no muestran desviación y la pendiente generada entre puntos de la curva tampoco se desvía más de un 5%.

La exactitud y la precisión -medida por el coeficiente de variación intraensayo-del sistema (Tabla I), se encontraron dentro de los rangos de aceptación, con excepción de la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Posiblemente esto se debe a que la cantidad inyectada, correspondiente a esta concentración, esta muy cercana al límite de detección y eso aumenta la incertidumbre de la determinación.

TABLA I

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	CONC. MEDIDA ($\mu\text{g/ ml} \pm \text{E.E.}$)	PRECISION (%)
0.1	0.1211 \pm 0.004	121.1
0.2	0.1973 \pm 0.003	98.65
0.5	0.5515 \pm 0.009	110.32
1.0	0.9121 \pm 0.008	91.21
2.0	2.1830 \pm 0.020	109.15
5.0	5.6630 \pm 0.034	113.26
10.0	11.1700 \pm 0.088	111.70
20.0	22.3760 \pm 0.216	111.88

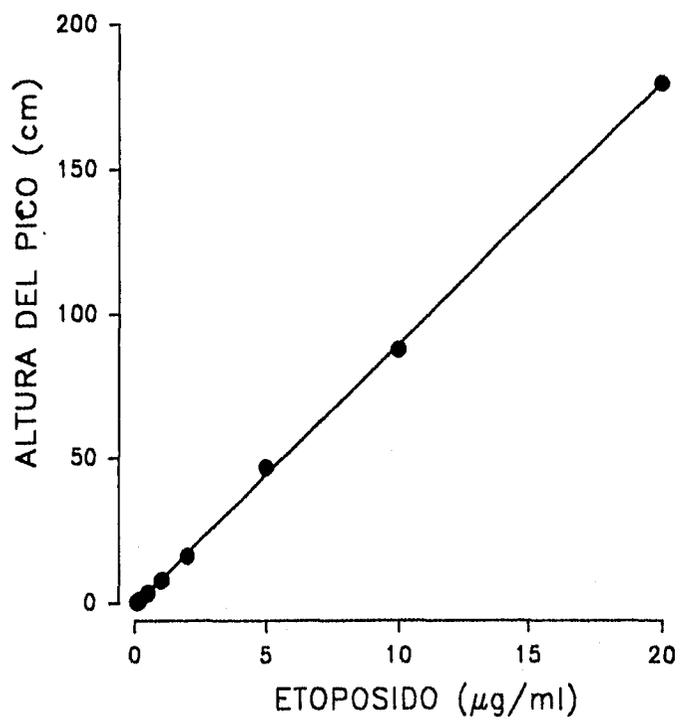


Figura 6. CURVA DE CALIBRACION DEL SISTEMA

Los resultados obtenidos para la variabilidad del sistema (Tabla II), determinada a través del coeficiente de variación interensayo, son igualmente aceptables, ya que se encuentran dentro del rango menor al 15%, comúnmente considerado como adecuado para bioensayos.

TABLA II

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
0.1	9.1287
0.2	3.7330
0.5	4.0834
1.0	2.2589
2.0	2.3095
5.0	1.4838
10.0	1.9400
20.0	2.1631

La eficiencia del sistema se obtuvo a través del factor de resolución:

$$R_s = 2 \Delta t / (W_{b_1} + W_{b_2})$$

$$R_s = 0.7142$$

Donde:

R_s es el factor de resolución

Δt es la diferencia de tiempos de elución de los picos

W_b es la anchura de la base del pico

De acuerdo con Johnson y Stevenson (8), cuando el factor de resolución es mayor a 0.5 el sistema tiene una buena eficiencia, ya que puede identificar claramente a los compuestos analizados sin que exista algún traslape.

Validación del método

La evaluación de la linealidad del método se realizó a través del análisis repetido (n = 6) de las concentraciones en la curva de calibración utilizando la rutina de regresión lineal (figura 7). La ecuación que describe a este modelo es:

$$Y = 1.1405 X + 0.016$$

Donde: Y es la relación de altura de picos de etopósido al estándar interno (E.I.).

X es la concentración de etopósido en plasma.

m es la pendiente de la recta con un intervalo de confianza (95%).

b es la ordenada al origen con un intervalo de confianza (95%).

Se obtuvo un coeficiente de correlación igual a 0.9999 y un r^2 de 0.9998. Estos datos nos indican que el método es lineal.

La sensibilidad del método fue evaluada de dos maneras. La primera determinando la mínima concentración de etopósido en plasma que podía ser detectada confiablemente. Esto es, donde la señal del pico de interés es al menos tres veces mayor que la señal del ruido del sistema. Este valor también es llamado límite de cuantificación y fue de 5 ng/ml. La segunda forma de evaluar la sensibilidad fue considerando la pendiente de la curva de calibración, así pues, se encontró que el cambio de concentración en una unidad generó una respuesta de 1.1405 veces la relación de altura de picos VP-16/E.I.

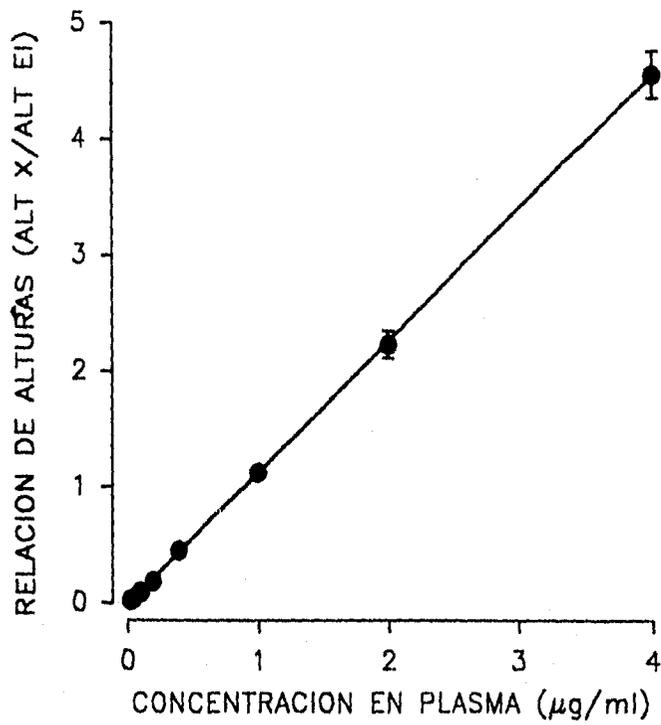


Figura 7. CURVA DE CALIBRACION DEL METODO

La exactitud y la precisión -medida por el coeficiente de variación intraensayo- del método (Tabla III), se encontraron dentro de los rangos de aceptación.

TABLA III

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACION MEDIDA ($\mu\text{g/ml} \pm \text{E.E.}$)	PRECISION (%)
0.02	0.022 ± 0.002	106.40
0.04	0.043 ± 0.001	107.62
0.1	0.100 ± 0.003	100.40
0.2	0.194 ± 0.004	97.02
0.4	0.408 ± 0.016	101.98
1.0	1.009 ± 0.027	100.87
2.0	1.984 ± 0.078	99.20
4.0	4.064 ± 0.128	101.61

Los resultados obtenidos para la variabilidad del método (Tabla IV), determinada a través del coeficiente de variación interensayo, son igualmente aceptables, ya que se encuentran dentro del rango menor al 15%, comúnmente considerado como adecuado para bioensayos.

La estabilidad de las soluciones de trabajo del etopósido a distintas concentraciones se evaluó tanto visualmente -por la aparición de precipitados- como por comparación de los picos de la altura de picos generados por las muestras al inicio del estudio y después de transcurrido cierto tiempo bajo diversas condiciones de almacenamiento, simulando los distintos ambientes que pueden hallarse en una

unidad clínica. El intervalo de confianza fue establecido a un nivel del 90%.

TABLA IV

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
0.02	5.21
0.04	5.90
0.10	8.12
0.20	6.78
0.40	9.59
1.00	7.01
2.00	9.61
4.00	7.04

Se observó que los picos generados por las muestras no mostraron cambio alguno en el tiempo de retención, y que no se generaron picos adicionales a los inicialmente observados. Sin embargo, se vió que los picos aumentaron de tamaño con respecto a las muestras iniciales y a los estándares preparados el día del análisis, suponemos que esto se debió a que como los estándares estaban disueltos en metanol y este es un solvente volátil, la muestra probablemente se concentró. Las muestras de 500 μg que no pudieron analizarse a través de CLAR y que sólo se evaluaron visualmente no presentaron precipitado alguno el cual indicaría la presencia del isómero picro. La tabla V muestra los resultados de la estabilidad de la muestra, y las figuras 8, 9 y 10 muestran las gráficas de intervalos de confianza al 90% de las soluciones de etopósido a 0.5, 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ mantenidos a temperatura ambiente, -4°C y -20°C .

A partir de estas gráficas se observa que la condición óptima para mantener las soluciones de etopósido es a una temperatura de -20°C, ya que los resultados obtenidos fluctúan más cerca de la media.

TABLA V

CONDICION	CONC. (µg/ml)	ALT. DE PICO (cm) 0 HORAS	ALT. DE PICO (cm) 24 HORAS	ALT. DE PICO (cm) 72 HORAS	ALT. DE PICO (cm) 7 DIAS
TEMP. AMBIENTE	50	9.9225±0.9922	10.9130	10.1450	10.0925
	5	3.7400±0.3740	4.1030	4.0450	3.9225
	0.5	1.6225±0.1622	1.5506	1.7600	1.7580
- 4°C	50	9.9225±0.9922	10.6625	10.4875	10.2050
	5	3.7400±0.3740	4.1100	4.45505	4.2725
	0.5	1.6225±0.1622	- *	1.7709	1.7803
- 20°C	50	9.9225±0.9922	10.2075	10.0900	9.7050
	5	3.7400±0.3740	3.9075	3.96500	3.9800
	0.5	1.6225±0.1622	1.6530	1.7566	- *

*Muestras perdidas durante el análisis

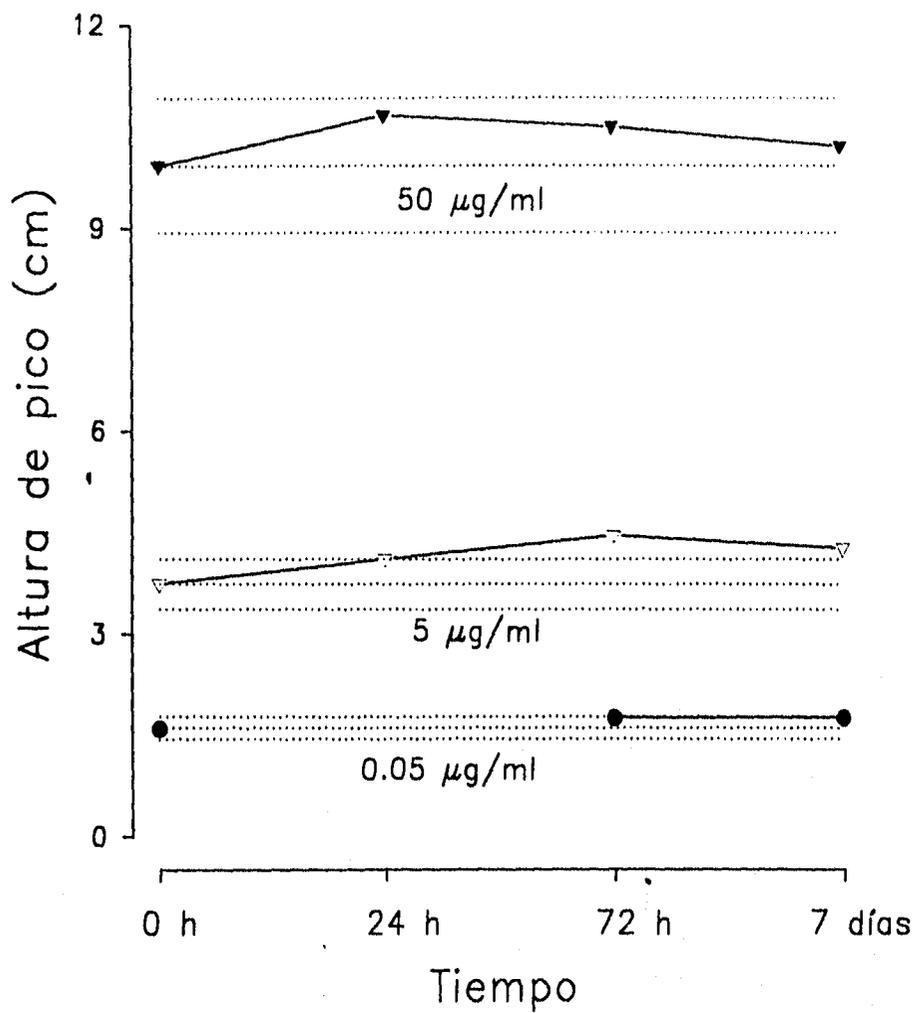


Figura 8. Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etoposido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a temperatura ambiente.

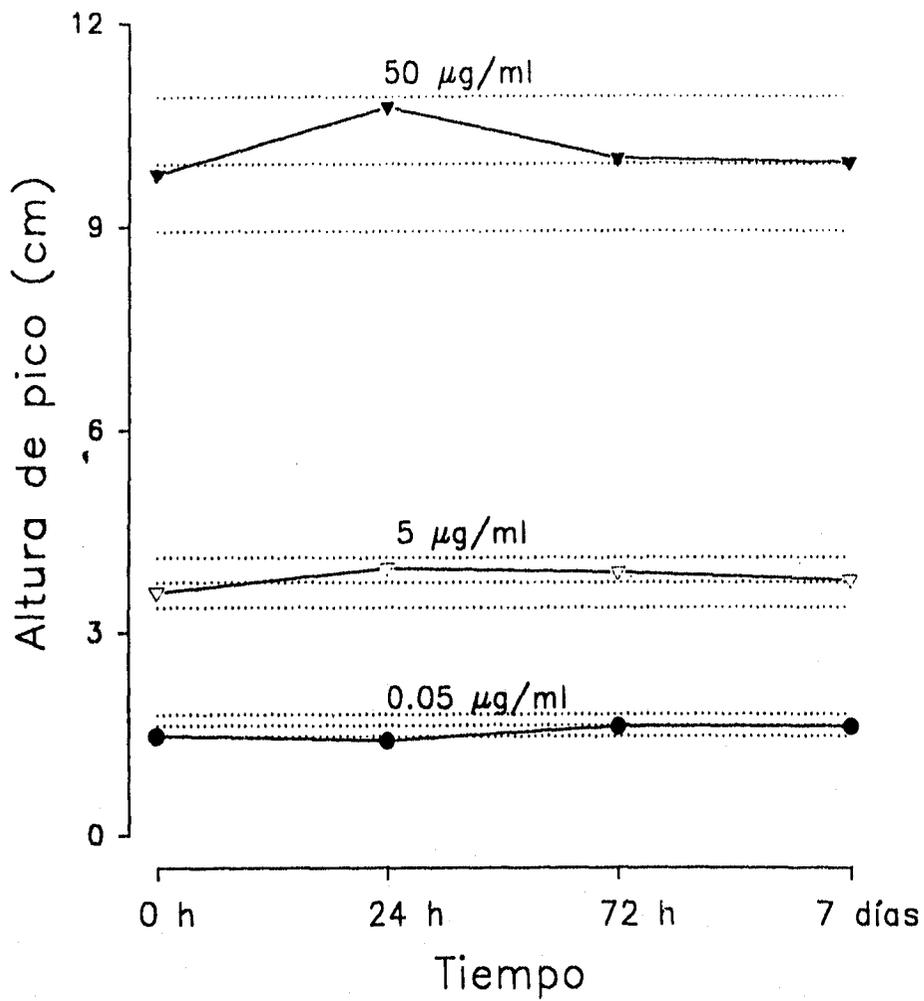


Figura 9. Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etopósido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a -4°C.

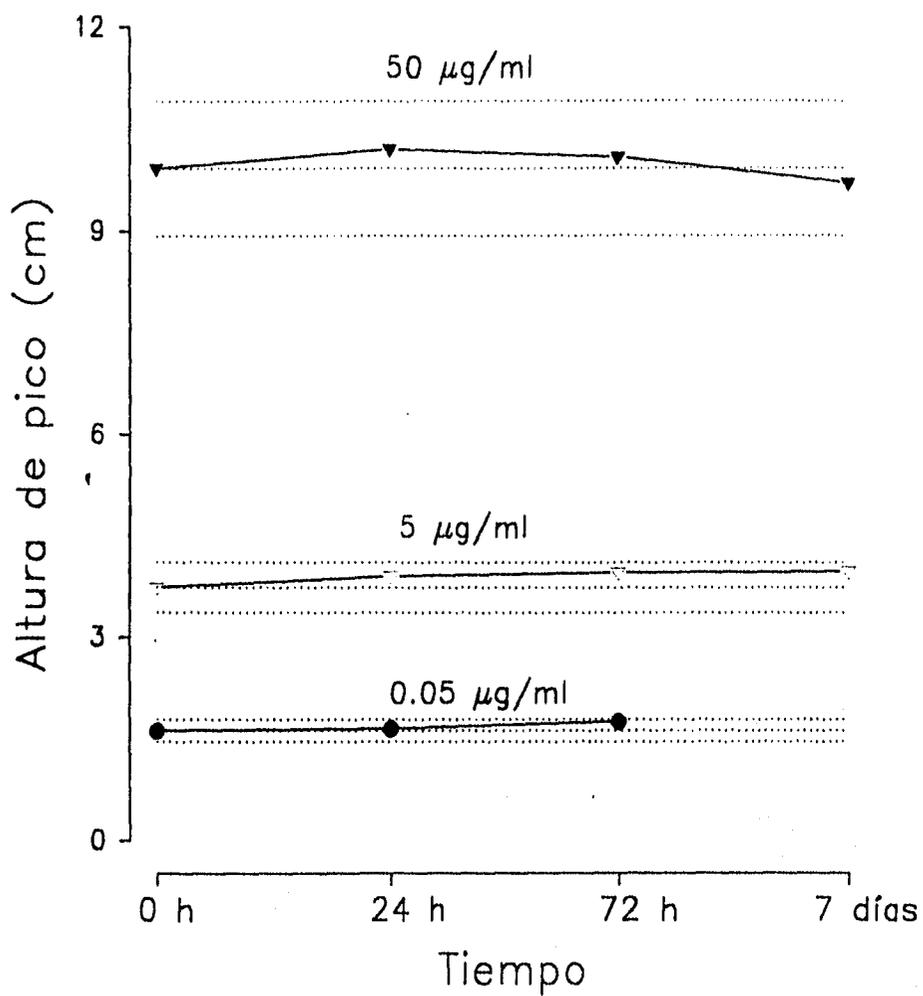


Figura 10. Intervalos de confianza al 90% para la estabilidad de las soluciones de etopósido a una concentración de 0.5, 5 y 50 µg/ml mantenidas a -20°C.

5.3 PARAMETROS FARMACOCINETICOS

La aplicación del método para estudios farmacocinéticos fue evaluada. De un paciente del Instituto Nacional de Cancerología al que le fueron administrados 50 mg de etopósido por vía oral se tomaron muestras de sangre a diversos tiempos durante un periodo de 24 horas. El plasma fué obtenido por centrifugación y la concentración de etopósido fue determinada empleando el método descrito anteriormente. Se construyó la gráfica del curso temporal de los niveles plasmáticos de etopósido, la figura 11 muestra la curva obtenida. La concentración máxima observada del etopósido en plasma fue de 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a un tiempo (t_{max}) de 1.5 hrs. La vida media del fármaco fue de 6.1 hrs y el área bajo la curva fue de 23.2 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ de etopósidos;

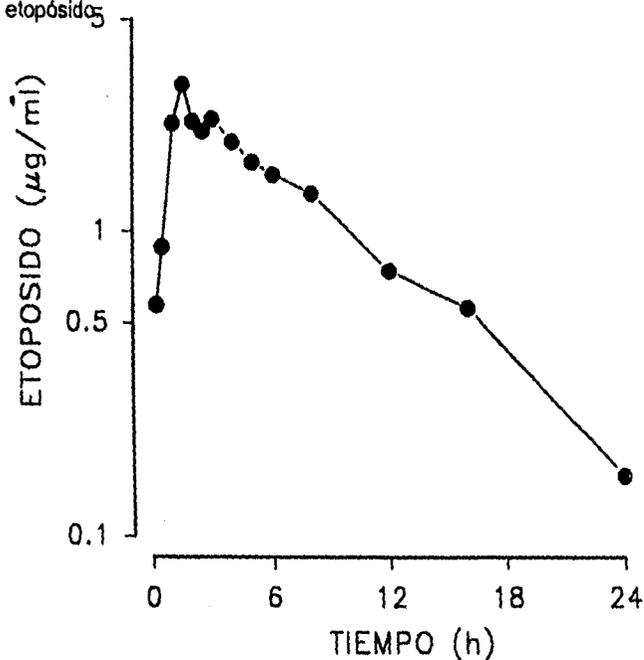


Figura 11. Curso temporal de los niveles plasmáticos del etopósido en un paciente después de la administración de una dosis única de 50 mg p.o.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En resumen, se han desarrollado varios métodos para determinar el antineoplásico etopósido en plasma utilizando la cromatografía de líquidos con detección electroquímica.

Aunque estos métodos han mostrado ser muy sensibles, no se consideran adecuados para realizar monitoreos clínicos de rutina. El procedimiento descrito por Duncan y colaboradores, incluye una extracción que requiere de un periodo de tiempo largo, además de que este método no utiliza un estándar interno. Otros métodos requieren de un tiempo de corrida de 9 minutos o más por lo que tampoco son de utilidad para análisis farmacocinéticos de rutina.

Por otra parte, el costo que representa realizar un monitoreo farmacocinético es de gran relevancia, ya que esto implica el incremento del costo de los tratamientos con estos fármacos.

Por lo tanto haciendo una comparación de los métodos ya desarrollados con respecto al aquí propuesto, se puede observar que este último presenta ventajas que permiten su aplicabilidad en estudios farmacocinéticos.

El tiempo de corrida del método es de seis minutos lo cual permite el análisis de un número considerable de muestras por día, y utiliza éter etílico y diclorometano para realizar la extracción, siendo éstos solventes relativamente baratos. Otra ventaja que presenta es la utilización de 2-acetamidofenol como estándar interno, el cual, en comparación con otras sustancias como el tenipósido que se utiliza con el mismo fin, resulta mucho más económico.

Este método cumple con los parámetros que se evalúan en la validación de métodos bioanalíticos. La precisión, la exactitud y la sensibilidad requerida para la determinación del etopósido en estudios farmacocinéticos después de su administración oral a bajas dosis están dentro de los rangos de aceptación.

Por lo antes mencionado se concluye que el objetivo de este trabajo queda cumplido ya que se desarrolló y validó un método por CLAR con detección electroquímica, sencillo, rápido y económico para cuantificar el antineoplásico etopósido en plasma humano, pudiendo utilizarse para realizar monitoreos clínicos de pacientes tratados con este fármaco.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Eugene J. Eisenberg y W. Mark Eickhoff, *Journal of Chromatography* , 621 (1993) 110-114.
- 2.- B.J. Floor, A.K. Klein, N. Muhammad, y D. Ross, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 74, No. 2, February 1985.
- 3.- Dwight D. Stiff, Terry L. Schinghammer y Sharon E. Corey, *Journal of Liquid Chromatography* , 15(5), 863-873 (1992).
- 4.- Pérez- Urizar J., Flores-Picazo Y., Navarro-González B., y Castañeda-Hernández G. A NEW RAPID AND ECONOMICAL HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION FOR THE DETERMINATION OF ETOPOSIDE (VP-16) IN HUMAN PLASMA SAMPLES. *Journal of Liquid Chromatography*, 19 (3), XX-YY (1996). En prensa.
- 5.- Underwood, A.L., Day R.A., *QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA*, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., Quinta Edición, México, D.F., 1989. p.p.586-589.
- 6.- Yost,R.W., Ettre, L.S., Conlon, R.D., *INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA PRACTICA*, Perkin Elmer, E.U.A., 1981.
- 7.- Ayres, Gilbert H., *ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO*, Ed. Harla, Segunda Edición, México, D.F., 1991.
- 8.- Johnson, Edward L., Stevenson, Robert, *BASIC LIQUID CHROMATOGRAPHY*, Varian, U.S.A., 1978.
- 9.- McNair, Harold, Esquivel H., Benjamín, *CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION*, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Segunda Edición, Washington, D.C., 1980.

- 10.- World Health Organization. THE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES USED IN THE EXAMINATION OF PHARMACEUTICAL MATERIALS. Pharm. 89.541. Rev. 2, 1989.
- 11.- Diario Oficial de la Federación. Primera Sección. Enero 18, 1988.
- 12.- Douglas J. Black and Robert B. Livingston. ANTINEOPLASIC DRUGS IN 1990. A REVIEW (PART I). Drug 39 (4): 489-501. 1990.
- 13.- CDER 05/01/87 GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION, Food and Drug Administration, Division of Manufacturing and Product Quality (HFD-320) May, 1987.
- 14.- Karnes, Thomas; Shi, Gerald; Shah, Vinod P. VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHODS. Pharmaceutical Research, Vol. 8, No. 4, 1991.
- 15.- Harvey, V.J., Joel, S.P. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF ETOPOSIDE IN PLASMA AND URINE. Journal of Chromatography, 393:419-423, 1995.
- 16.- Eisenberg, Eugene J., Eickhoff, Mark. DETERMINATION OF ETOPOSIDE IN BLOOD BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION. Journal of Chromatography, 621:110-114, 1993.
- 17.- Opsal, Van; Horst, VanDer; AUTOMATED REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ETOPOSIDE AND TENIPOSIDE IN PLASMA BY USING ON-LINE SURFACTANT-MEDIATED SAMPLE CLEAN-UP AND COLUMN SWITCHING. Journal of Chromatography, 495 139-151, 1989 .
- 18.- Farina, Pierluigi, Marzillo Giovanni; D'Incaci, D'Maurizio; HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF VP 16-213 IN HUMAN PLASMA. Journal of Chromatography, 222: 141-145. 1981.
- 19.- Stiff, Dwight D.; Schwinghammer, Terry L; Corey, Sharon E.; HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ETOPOSIDE IN PLASMA USING FLUORESCENCE DETECTION. Journal of Liquid Chromatography, 15 (5), 863-873 (1992).
- 20.- Floor, B.J.; Muhammad, Klein N. STABILITY-INDICATING LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ETOPOSIDE AND BENZYL ALCOHOL IN INJECTABLE FORMULATIONS. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 74, No. 2, February 1985.

- 21.- Cunningham D, McTaggart L, Soukop M, Cummings J, Forrest GJ, et al. ETOPOSIDE: A PHARMACOKINETIC PROFILE INCLUDING AN ASSESMENT OF BIOAVAILABILITY. *Medical Oncology and Tumour Pharmacotherapy* 33: 95-99, 1986.
- 22.- D'Incalci M, Erba E, Vaghi M, Morasca L. IN VITRO CYTOTOXICITY OF VP-16 ON PRIMARY TUMOR AND METASTASIS OF LEWIS LUNG CARCINOMA. *European Journal of Cáncer and Clinical Oncology* 18: 377-380, 1982a.
- 23.- Arnold AM, Dodson M, Renwick A, Whitehouse JMA. PHARMACOKINETICS OF VP-16-213 USING A NEW HPLC ASSAY. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 5 (Suppl.): 2, 1980.
- 24.- Harvey, V.J., Slevin, M.L., Joel, S.P., Wrigley, P.F. THE EFFECT OF DOSE ON THE BIOAVAILABILITY OF ORAL ETOPOSIDE. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 16(2) 178-181, 1986.
- 25.- Holthius, J.J., Postmus, P.E., Van-Oort, W.J., Verleun, H. PHARMACOKINETICS OF HIGH DOSE ETOPOSIDE (VP-16-213). *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 22(10): 1149-55, 1986.

ANEXO A

ANEXO A

FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia al igual que los otros tipos de cromatografía se basa en la ley de distribución, la cual fue explicada anteriormente, sin embargo, hay otros términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental que deben tenerse en consideración y que a continuación se definen.

TIEMPO DE RETENCION (t_r): Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico (9).

TIEMPO MUERTO (t_0 o t_m): Es el tiempo que se necesita para eluir una muestra no retenida en la columna y es determinada midiendo el tiempo de retención de la fase móvil o bien, de una muestra similar (9).

TIEMPO DE RETENCION AJUSTADO (t'_r): Es la diferencia entre t_r y t_m , es decir es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_m$$

En el análisis de una muestra de varios componentes, cada uno de ellos invertirá el mismo tiempo en la fase móvil, pero en el supuesto de que se separen todos ellos permanecerán tiempos distintos en la fase estacionaria, lo cual constituye el origen de la separación (9).

ANCHURA DE LA BASE DE LAS SEÑALES (W_b): Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal o pico cromatográfico; asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de sigma, o sea la dispersión de una distribución gaussiana de valores. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos (9).

NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N): Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. N se mide de acuerdo con la fórmula:

$$N = 16 (t_r / W_b)^2$$

Donde t_r y W_b se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.)

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente es la columna (9).

ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT): Se representa por:

$$AEPT = L / N$$

donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros. AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos por unidad de longitud y, por tanto, la columna será más eficiente(6, 9).

VELOCIDAD LINEAL PROMEDIO DE LA FASE MOVIL (V): Se expresa por:

$$V = L / t_m$$

la velocidad puede establecerse fácilmente midiendo el tiempo de elución (t_m) de un soluto no retenido y dividiendo la longitud de la columna (L) por ese valor. Este parámetro de operación se usa cuando se representa esquemáticamente AEPT en función de V (gráficas de Van Deemter).

La ecuación que describe la gráfica de van Deemter relaciona la eficacia de la columna (AETP) no solamente con la velocidad, sino también con otros parámetros como la relación de capacidad, diámetros de partícula y los coeficientes de difusión del soluto en las fases móvil y estacionaria. Su estudio proporciona información importante acerca del sentido en que deben orientarse los cambios para mejorar la eficacia de la cromatografía líquida (8, 9).

COEFICIENTE DE DISTRIBUCION O DE REPARTO (K): Se representa por:

$$K = (\text{Cant. de muestra/ml de F.E.}) / (\text{Cant. muestra/ml F.M.})$$

Donde: F.E. Fase estacionaria

F.M. Fase móvil

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura (9).

RELACION DE FASES (β): Se representa por:

$$\beta = \text{ml de F.M.} / \text{ml de F.E.}$$

Expresado de esta manera, indica que cada sección de columna, equivale a la proporción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase

estacionaria (9).

RELACION DE CAPACIDAD (k'): Nos indica cuántas veces mayor es el tiempo de retención corregido del soluto, en relación con el tiempo que invierte en la fase móvil. Nos indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna (9).

En la práctica hay que esforzarse por conseguir un valor de la relación de capacidad por lo menos igual a uno para el primer pico de interés, con el fin de asegurar su separación del disolvente y sus posibles impurezas, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual o muy próximo a t_m . La anchura del pico aumenta al aumentar la relación de capacidad haciendo más difícil la resolución y la detección (9).

$$K = k' \times \beta$$

RESOLUCION (R_s): Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos. Se expresa como el cociente entre la distancia de los máximos de los dos picos (Δt) y el valor medio de la anchura del pico en la base:

$$R_s = 2 \Delta t / (W_{b1} + W_{b2})$$

Donde: W_b es la anchura de la base del pico

FACTOR DE SEPARACION (RETENCION RELATIVA): Este factor denominado con la letra griega alfa, describe la posición relativa de dos picos adyacentes. Para su cálculo se utilizan los tiempos de retención corregidos, ya que la separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria (9).

$$\alpha = t'_r (B) / t'_r (A)$$

AREA Y ALTURA DE UN PICO CROMATOGRAFICO: El área de un pico es proporcional a la cantidad de soluto (o a su concentración) y por tanto se utiliza para

la cuantificación del análisis cromatográfico. La altura del pico se mide en su punto máximo y corresponde a la máxima concentración de la zona (9).