

Desarrollo de un método analítico para la determinación de atenolol y propranolol en orina por CG-EM con tratamiento de la muestra en línea en un sistema en flujo multijeringa

María del Rosario Brunetto, Sabrina Clavijo, Yelitza Delgado, Wendy Orozco,
Máximo Gallignani y Carlos Ayala*

*Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes, Edificio A, Núcleo Universitario La Hechicera,
Mérida 5101-A, Venezuela*

Recibido: 12-05-2013 Aceptado: 16-03-2014

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método analítico automatizado por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de atenolol (ATN) y propranolol (PRO) en muestras de orina humana. La extracción de los analitos se realizó en una columna Oasis HLB (20 mm × 3,9 mm d.i, 25 μm d.p; Waters), en un sistema de inyección en flujo multijeringa (Multisyringe Flow Injection Analysis; MSFIA por sus siglas en inglés), que fue empleado para el tratamiento de la muestra. La volatilidad de los analitos se logró a través de una reacción de derivatización con N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) asistida por microondas. La optimización de las condiciones de trabajo se realizó a través del análisis multivariado. El método validado se empleó para la determinación de ATN y PRO en muestras de orina de pacientes sometidos a tratamiento con estos medicamentos.

Palabras clave: atenolol, propranolol, cromatografía de gases, sistemas de inyección en flujo multijeringa, orina.

Development of an analytical method for the determination of atenolol and propranolol in urine by GC-MS with on-line sample treatment in a multisyringe flow injection system

Abstract

The present work describes an automated method for the determination of atenolol (ATN) and propranolol (PRO) in human urine by gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS). The extraction of the analytes was performed on Oasis HLB[®] column (Waters) using a multisyringe flow injection system (MSFIA) for the sample treatment. The volatility of

* Autor para la correspondencia: brunetto@ula.ve

the analytes was improved by a microwave assisted derivatization reaction with N-methyl-N (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS). The optimization was performed using multivariate analysis. The validated method was successfully applied to the determination of ATN and PRO in urine samples of patients under betablockers therapy.

Key words: Atenolol, Propranolol, Gas Chromatography, MSFIA, Urine.

Introducción

Los beta-bloqueadores (BB), también denominados antagonistas beta-adrenérgicos o antagonistas beta, son fármacos indicados comúnmente para el tratamiento de los trastornos del ritmo cardíaco, angina de pecho, hipertensión, taquicardia o infarto de miocardio agudo [1, 2]. Durante mucho tiempo han sido considerados como de primera línea en el tratamiento de la hipertensión, y entre los más utilizados se encuentran el ATN y el PRO. Debido a su amplio rango terapéutico, estos fármacos requieren de una evaluación periódica para el ajuste de la dosis correspondiente [3]. Por esta razón, es necesario contar con metodologías analíticas sensibles y veraces que permitan su cuantificación en fluidos biológicos con el fin de profundizar en los estudios de su farmacocinética y farmacodinamia y al mismo tiempo evaluar su efectividad y dar seguimiento al tratamiento de pacientes.

En la literatura se han descrito varios métodos para la determinación de estos fármacos particularmente de forma individual y en diversas matrices utilizando diferentes técnicas, tales como: inmunoensayos [4], espectrofotométricas [5-7] y electroquímicas [8]. No obstante, debido a la complejidad de las matrices biológicas, la técnica más empleada ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) que ha demostrado ser selectiva y sensible para determinar simultáneamente ATN y PRO en fluidos biológicos [9-15].

La CG es una técnica sensible y selectiva que en los últimos tiempos también se ha utilizado exitosamente en el análisis de ATN y PRO en diferentes matrices [16-21]. Sin embargo, está restringida al análisis de

compuestos volátiles, por lo que, cuando se estudian analitos polares como los BB, es necesario involucrar en la etapa de tratamiento de la muestra la derivatización para mejorar su volatilidad. En la determinación de BB en fluidos biológicos por CG-EM se han utilizado diferentes reactivos derivatizantes [16], entre ellos MSTFA que a través de una reacción de silanización produce derivados volátiles y térmicamente estables [17-20].

En la mayoría de los trabajos, las condiciones estándar para esta reacción están representadas por el uso de temperaturas entre 60 y 80°C con calentamiento convencional y tiempos de reacción en un intervalo de 30 y 60 min [16, 17, 19]. Es por ello que con el fin de disminuir el tiempo de la etapa de derivatización, en este trabajo se decidió utilizar el calentamiento por microondas como energía auxiliar.

Por otra parte, siendo la orina una matriz compleja, la etapa de tratamiento de la muestra que elimine el material endógeno no se puede omitir. En la literatura se han reportado diferentes procedimientos de extracción y limpieza con el fin de minimizar los efectos de la matriz durante el análisis de BB por CG-EM. La mayoría de los métodos revisados involucran procedimientos manuales tediosos de extracción líquido líquido (ELL) [16, 17, 19, 20] o extracción en fase sólida (EFS) utilizando cartuchos [12].

En la actualidad, el desarrollo de soportes especiales de extracción selectiva [22] empacados en columnas ha permitido la automatización de la EFS y es una alternativa muy atractiva para reducir el número de etapas de manipulación de la muestra, el riesgo de pérdida de los analitos así como

minimizar la cantidad y el manejo de reactivos tóxicos.

Para la automatización de la EFS, el uso de la técnica de flujo MSFIA simplificaría de forma considerable el procesamiento analítico con un importante ahorro de reactivos y tiempo y permitiría una mayor frecuencia de análisis. La técnica MSFIA ha sido utilizada con mucho éxito en el desarrollo de métodos analíticos que persiguen entre sus objetivos automatizar la etapa de tratamiento de la muestra. Esto es posible por las múltiples ventajas que ofrece como simplicidad en el manejo, bajo coste, versatilidad y, generalmente, buenas prestaciones analíticas [23, 24]. Otra ventaja es que el MSFIA cuenta con un software que permite controlar todos los componentes del sistema [24]. Adicionalmente, el sistema permite automatizar dispositivos de energías auxiliares para acelerar reacciones de derivatización necesaria para mejorar la volatilidad de los BB para su determinación por CG-EM.

En virtud de todo lo expuesto en este trabajo se desarrolló y validó un método analítico automatizado, selectivo y sensible para la cuantificación de ATN y PRO en orina por CG-EM. La principal ventaja del método consiste en la utilización de un sistema MSFIA que simplifica el tratamiento de la muestra y reduce significativamente el tiempo de esta etapa. Adicionalmente, el sistema utilizado constituye una alternativa cuidadosa con el medioambiente porque garantizó bajo consumo de solventes orgánicos y baja generación de residuos tóxicos.

Experimental

Reactivos y solventes

Se emplearon reactivos grado analítico y solventes grado HPLC. Acetonitrilo (MeCN) y metanol (MeOH) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Estándar certificado USP de clorhidrato de PRO (Inversiones Dayamar, Caracas, Venezuela). Se empleó como agente deriva-

tizante N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) y ATN (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se utilizó agua purificada en un sistema Milli-Q SP TOC (Waters, Millipore, Milliford, MA).

Preparación de las soluciones

Las soluciones concentradas de ATN y PRO ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) se prepararon en MeCN a partir de los estándares correspondientes y se almacenaron en frascos ámbar con refrigeración a 4°C hasta su uso. Las soluciones de trabajo, a diferentes niveles de concentración, se prepararon diariamente por dilución en la fase móvil de extracción o lavado.

Preparación y almacenamiento de las muestras de orina

Para la optimización y validación del método se utilizó una solución concentrada de orina de 30 adultos voluntarios sanos quienes no estaban bajo tratamiento médico.

Se analizaron muestras de orina de 6 pacientes hipertensos que recibían tratamiento con ATN o PRO y que asistían regularmente a las consultas médicas del Departamento de Cardiología del Hospital Universitario de los Andes (HULA). Para el estudio se fijaron los siguientes criterios de inclusión: tener el diagnóstico de hipertensión, ser mayor de 18 años y firmar el consentimiento informado. Las muestras se tomaron en un intervalo de 0 a 6 horas después de la primera dosis diaria del fármaco antihipertensivo. Para su análisis, se prepararon según el procedimiento propuesto y se midieron al menos tres veces cada una.

Todas las muestras de orina (30-40 mL) se recogieron en envases de politetrafluoroetileno (PTFE) y se almacenaron a -12°C hasta el momento del análisis.

En el momento de su uso las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para remover cualquier material precipitado. Posteriormente, a 1 mL de la muestra en un tubo de centrífuga se le adicionó 1 mL

de la fase móvil de extracción, se agitó en un Vortex durante 20 segundos, y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 5 min. El sobrenadante se separó y se filtró con membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (support®-450 Membrana, Waters, USA) para evitar la presencia de cualquier tipo de material en suspensión que pudiera ocasionar una obstrucción de los poros del material de empaque de la precolumna o en las conexiones del sistema MSFIA.

Finalmente, un volumen de 0,200 mL del filtrado estaba listo para su tratamiento en la precolumna de extracción.

Sistema de inyección en flujo multijeringa

En la Figura 1 se muestra un diseño esquemático del sistema MSFIA utilizado que consistió de una bureta con velocidad programable (MicroBU2030; Cryson, Allela, Barcelona) equipada con cuatro jeringas bidireccionales de alta precisión (J_1 - J_4) (Hamilton, Switzerland), aunque para el sistema se utilizaron sólo tres de ellas J_1 (10,0 mL), J_2 (10,0 mL) y J_3 (5,0 mL). Además cada una de ellas en la parte superior tenía una válvula solenoide de 3 puertos (V_1 - V_3) (N-Research, Caldwell, NJ). Dependiendo de la posición de la válvula solenoide el líquido que contiene la jeringa era aspirado o dispensado hacia el sistema (posición *on*) o al reservorio (posición *off*). Adicionalmente se conectaron dos válvulas de conmutación (V_4 - V_5) y controlaron a través de la bureta (Takasago Electric, Nagoya, Japan). Todo el proceso estaba controlado a través de un computador conectado a una interfaz RS232C.

Para todo el sistema se utilizó tubería politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno (d.i.). Todas las conexiones se fijaron en 40 mm de longitud para evitar sobrepresión en el sistema, excepto el bucle de inyección, en el cual se emplearon $400 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$ d.i. con el fin de obtener un volumen de 0,200 mL para la toma de la muestra. Todos los conectores T se construyeron de PTFE, el cual resiste mejor el uso de solventes orgánicos. Para la extracción en

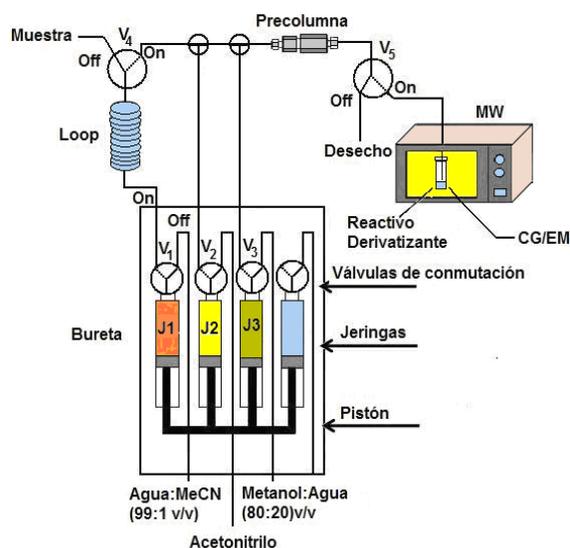


Figura 1. Esquema del MSFIA empleado para la extracción en fase sólida de ATN y PRO en orina humana.

fase sólida de ATN y PRO se utilizó una precolumna Oasis HLB ($20 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm}$ d.i., $25 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula) (Waters, USA) la cual se acopló directamente al sistema en flujo sin generar sobrepresión en el sistema. Para controlar las condiciones de la reacción de derivatización se empleó un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V). Todo el control de sistema y la adquisición de datos se realizaron empleando el paquete de Software Autoanalysis 5.0 (Sciware, Palma de Mallorca, España).

Los detalles sobre el funcionamiento del sistema MSFIA se enumeran en la Tabla 1. Todo el procedimiento constó de 10 pasos.

Inicialización del sistema: con todas las válvulas en posición *off*, las jeringas se llenaron con las soluciones contenidas en los depósitos respectivos a un flujo 5 mL min^{-1} ; S_1 fase móvil de extracción o lavado ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$; 99:1 v/v), S_2 fase de elución (MeCN); S_3 fase de acondicionamiento de la precolumna OASIS HLB ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 80:20 v/v).

Acondicionamiento: la precolumna OASIS HLB se acondiciona con 2 mL de la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20 v/v) suministra-

Tabla 1
Protocolo para la EFS de ATN y PRO en el MSFIA

| Paso | Tiempo (min) | Operación | Flujo (mL/min) | Posición Válvulas | | | | | Descripción |
|------|-------------------------------------|------------------|----------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------------|
| | | | | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | |
| 1 | 3,3 | Dispensar 2,0 mL | 0,6 | off | off | on | off | off | Acondicionamiento OASIS HLB |
| 2 | Inicio del ciclo | | | | | | | | |
| 3-4 | 1,4 | Aspirar 5,0 mL | 30 | off | off | off | off | off | Lavado de OASIS HLB |
| | | Dispensar 0,8 mL | 0,6 | on | off | off | on | off | |
| 5 | 1,6 | Aspirar 0,2mL | 1 | on | off | off | off | off | Toma de la muestra |
| 6 | 2,2 | Dispensar 0,4mL | 0,6 | on | off | off | on | off | Transferencia a OASIS HLB |
| 7 | 5,2 | Dispensar 1,8 mL | 0,6 | on | off | off | on | off | Limpieza y preconcentración de ATN y PRO |
| 8-9 | 6,2 | Dispensar 0,1 mL | 0,6 | off | on | off | off | off | Elución a desecho (volumen muerto) |
| | | Dispensar 0,5 mL | 0,6 | off | on | off | off | on | Elución al vial |
| 10 | Final del ciclo (Próxima inyección) | | | | | | | | |

dos por la jeringa 3 (J_3) con la finalidad de limpiar, solvatar y equilibrar el lecho cromatográfico [Paso 1]. A continuación, la jeringa 1 (J_1) suministra un volumen de 0,8 mL de fase de lavado a través del sistema para eliminar el residuo de metanol que está presente en el volumen muerto de la precolumna después de la etapa de acondicionamiento [Pasos 2-4].

Sorción de la muestra en la precolumna: la J_1 conectada a la V_4 en posición *off* aspiraba la muestra y llenaba el bucle (0,200 mL) [Paso 5]. Seguidamente, esta misma jeringa (J_1) pero con la válvula V_4 en posición *on* introduce la muestra en la precolumna OASIS HLB.

Limpieza: bajo las mismas condiciones anteriores, se lavó la precolumna con 2 mL de la fase de lavado con el fin de eliminar la mayor cantidad de compuestos endógenos

de la orina, mientras que los analitos quedan retenidos [Pasos 6-7].

Elución: la jeringa 2 (J_2) (MeCN) con la válvula V_5 en posición *off* suministró la fase de elución a la precolumna para eliminar toda el agua presente en el volumen muerto de la precolumna que podría interferir durante la reacción de derivatización. Igualmente, la jeringa 2 (J_2) pero con la válvula V_5 en posición *on* se encargó de introducir al sistema el solvente orgánico (MeCN) para eluir los analitos desde la precolumna hacia el vial que contenía el reactivo derivatizante (MSTFA + 1% TMCS) situado en el horno de microondas donde se llevaba a cabo la reacción de silanización [Pasos 8-9]. Finalmente la determinación de ATN y PRO se realizó por CG-EM.

La secuencia del procedimiento se repitió tres veces [Paso 2-10] para cada muestra.

Todo el procedimiento en general, tratamiento de cada muestra y la etapa de derivatización se realizó en 7,70 min.

Sistema cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturno 2000 (con un analizador de trampa de iones) y un automuestreador Varian modelo 8200 con un carrousel para 48 viales con capacidad de 2,0 y 0,1 mL respectivamente.

Para el procesamiento de los datos y control de los parámetros instrumentales del sistema se utilizó un computador Dell (OptiPlexGxa) equipado con el software correspondiente. La identificación de los analitos se realizó utilizando las librerías Wiley y Nist integradas al software del equipo.

Resultados y discusión

Optimización de la EFS en el MSFIA

Para la EFS de los analitos en el MSFIA se utilizó una precolumna OASIS HLB. El empaque de estas precolumnas ofrece una gran versatilidad en la extracción de compuestos de diversa polaridad, debido a su composición equilibrada de dos monómeros N-vinilpirrolidona (hidrofílico) y divinilbenzeno (lipofílico). El mecanismo de retención se realiza a través de interacciones dipolo-dipolo para los compuestos polares y por fuerzas de Van der Waals en el caso de los no polares. Por otra parte, tiene una capacidad de retención superior de analitos polares, debido a las interacciones con pares de electrones no compartidos, lo cual junto con el favorable término de cavidad/dispersión, hacen que su selectividad sea única [25]. Adicionalmente, el tamaño de los poros es de aproximadamente 25 μm , lo que permite conectarla directamente al sistema en flujo sin generar alta presión [26].

Para la realización de los estudios de optimización de los parámetros instrumen-

tales, se conectó la precolumna directamente al detector UV arreglo de diodos a la longitud de onda de 280 nm y se estudió el perfil de elución del ATN y PRO en la orina. Adicionalmente para todos los estudios, se recogieron los extractos a la salida del detector UV en los viales, se derivatizaron y se analizaron por CG-EM.

Se inyectaron en la precolumna 0,200 mL de las soluciones estándares de los analitos de concentración 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas en una solución $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (99:1 v/v), muestras de orina enriquecidas con los analitos a la misma concentración y un blanco de orina. Para obtener la máxima eficiencia en la extracción y el mejor rendimiento en la reacción de derivatización se optimizaron: el volumen (0,1-0,3 mL) y velocidad del flujo de introducción de la muestra en la precolumna (0,6-0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), el volumen, velocidad del flujo (0,5-0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y naturaleza de la fase móvil de extracción, el volumen (0,1-0,5 mL) y velocidad del flujo del solvente de elución (0,6-0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los resultados indican que los porcentajes de recuperación del ATN y PRO son veraces y precisos cuando se utilizó una fase móvil de extracción con $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (99:1, v/v) circulando a un flujo de 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y durante un tiempo de lavado de 3 min. Esta fase con un alto porcentaje acuoso, permitió disminuir el contenido de sales de la muestra que, en algunos casos, disminuyen la selectividad entre el reactivo derivatizante y los analitos en la reacción de derivatización [27]. Además la adición de 1% de MeCN como modificador orgánico y solvente aprótico, no permite la posible interacción de los fármacos con los componentes endógenos presentes en la orina [28].

Se utilizó el MeCN para la elución de los analitos de la precolumna circulando a un flujo de 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 0,8 minutos. Este solvente aprótico tiene un poder de elución que evita el ensanchamiento de los picos de los analitos durante la etapa de elución. Por otra parte tiene una constante dieléctrica adecuada y no contiene átomos

de hidrógeno activos que podrían interferir en el rendimiento de la reacción de derivación asistida por microondas [29]. Con estas condiciones, se utilizó un volumen de 0,200 mL de MeCN para eluir ATN y PRO desde la precolumna OASIS HLB al vial.

En la tabla 2 se presenta un resumen de las condiciones optimizadas del MSFIA.

Reacción de derivatización

La reacción de derivatización de ATN y PRO se realizó mediante sililación utilizando el reactivo MSTFA. El mecanismo de esta

reacción (figura 2) corresponde al de una reacción de sustitución nucleofílica SN2, sobre el átomo de silicio del trimetilsilil del agente derivatizante. El grupo saliente acetamida, más electronegativo, facilita la reacción de sustitución SN2, disminuyendo el tiempo de reacción [30]. Se utilizó la radiación de microondas como forma de calentamiento que contribuyó significativamente en la disminución del tiempo de reacción condición fundamental para lograr la automatización de esta etapa del tratamiento de la muestra.

Se establecieron las condiciones de trabajo incorporando un estudio de optimiza-

Tabla 2
Condiciones optimizadas del MSFIA

| Equipo | Parámetros | Valor |
|--------|--------------------------------------|----------------------------|
| MSFIA | Volumen de inyección | 0,200 mL |
| | Flujo de introducción de la muestra | 0,6 mL min ⁻¹ |
| | Fase móvil de lavado | Agua |
| | Flujo de la fase móvil de lavado | 0,6 mL min ⁻¹ |
| | Tiempo de lavado | 3 min |
| | Solvente de elución | Acetonitrilo |
| | Flujo de elución | 0,6 mL min ⁻¹ |
| | Volumen de elución | 0,500 mL |
| | Volumen de eluido en el vial | 0,200 mL |
| | Volumen del reactivo MSTFA + 1% TMCS | 0,200 mL |
| | Tiempo de irradiación por microondas | 90 s |
| | Potencia de irradiación | 140 W |
| | Frecuencia de muestreo | 8 muestras h ⁻¹ |

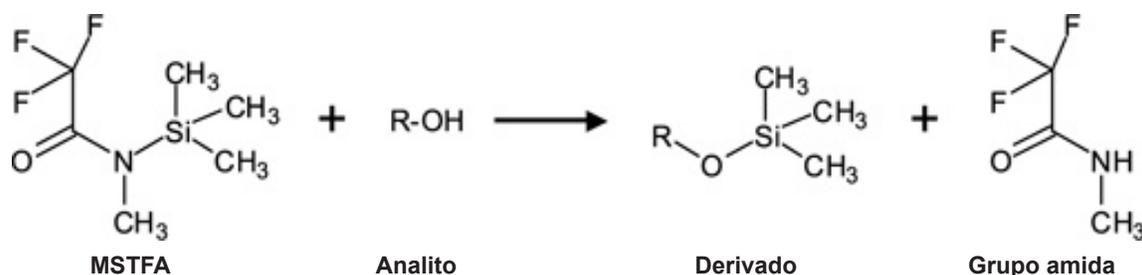


Figura 2. Reacción de sililación con MSTFA.

ción multivariante de la reacción de derivatización. Se evaluaron: tiempo de irradiación, potencia de irradiación y la relación molar reactivo:analito. Se utilizó un diseño experimental completo (DFC) de 3 factores a 3 niveles y 27 experimentos (DFC-3), con respuesta de área de pico de los analitos. Para ello, se emplearon soluciones estándares de ATN y PRO de concentración $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas en MeCN. Todas las combinaciones posibles se analizaron estadísticamente utilizando el programa Statgraphics Versión 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA) [31]. Los valores correspondientes a cada variable y nivel utilizados se pueden observar en la tabla 3 y en la tabla 4 se muestra la matriz de diseño y las respuestas obtenidas para cada combinación.

Para estimar los efectos de cada una de estas variables, se realizó un análisis de varianza ANOVA y los resultados se pueden observar en las tablas 5 y 6. Para un nivel de significancia $\alpha = 0,05$, las variables que tienen un efecto significativo en la respuesta son aquellas que muestran un valor de probabilidad (VP) por debajo de 5%. Los resultados obtenidos para los niveles estudiados indican que la potencia y el tiempo de irradiación en el microondas presentan efectos significativos sobre la respuesta analítica puesto que el valor de F es mayor que el tabulado ($F_{0,05,1,17} = 4,45$) para $p < 0,05$. Adicionalmente se puede observar que el modelo ajustado representa adecuadamente los datos ya que los valores del coeficiente de correlación ajustado son mayores a 85% para todos los casos. Por otra parte, el estadístico de Durbin-Watson tiene un valor cercano

a 2 ($p > 0,05$) para todos los casos (tabla 5 y 6) lo cual indica que no hay una correlación significativa entre los valores residuales, demostrando que el modelo utilizado es el adecuado para evaluar la variabilidad de los parámetros estudiados [32].

Para cotejar gráficamente los resultados obtenidos a través de ANOVA se construyeron gráficos de Pareto estandarizados. Los resultados se muestran en la figura 3 donde se puede observar que la potencia tiene una influencia negativa sobre las áreas de pico de ATN y PRO. Este resultado está en concordancia con los datos reportados en la literatura [33, 34], donde se indica que según el disolvente que se emplee, si la potencia es insuficiente no se alcanzará la temperatura de reacción. Sin embargo, si es muy superior, se podría producir el llamado efecto "bumping", que consiste en un calentamiento brusco con radiaciones muy energéticas y no homogéneo en el tiempo. En ese sentido, al ser el acetonitrilo un disolvente con una constante dieléctrica importante ($\epsilon = 37,1$) y una temperatura de ebullición cercana a los 80°C , es de esperar que ocurra un comportamiento brusco a potencias elevadas de irradiación [33, 34]. Por otro lado, el tiempo de irradiación tiene una influencia positiva en las respuestas analíticas. Sin embargo, al existir una interacción con la potencia se cumple una relación inversamente proporcional entre los valores óptimos, obteniéndose un compromiso entre las variables.

Una vez identificados los factores se procedió a determinar la combinación óptima de niveles por el método de superficie de

Tabla 3
Factores y niveles utilizados en la aplicación del diseño factorial

| Variable | Bajo (-1) | Medio (0) | Alto (+1) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Tiempo de irradiación (s) | 20 | 60 | 90 |
| Potencia de irradiación (%) | 20 | 50 | 90 |
| Relación (reactivo: analito) | 1:1 | 2:1 | 3:1 |

Tabla 4
Matriz correspondiente al DFC-3 y los resultados obtenidos para cada respuesta

| Potencia del microondas (%) | Tiempo de reacción (s) | Relación (analito: reactivo) | Área de pico ATN (U.A.) | Área de pico PRO (U.A.) |
|-----------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 50 | 60 | 1:2 | 342465 | 336815 |
| 90 | 60 | 1:1 | 225036 | 229303 |
| 50 | 90 | 1:3 | 341745 | 350484 |
| 50 | 20 | 1:2 | 339122 | 343832 |
| 20 | 90 | 1:1 | 396391 | 409207 |
| 90 | 60 | 1:3 | 223781 | 229392 |
| 90 | 20 | 1:3 | 238122 | 218392 |
| 90 | 20 | 1:1 | 223813 | 233822 |
| 20 | 60 | 1:1 | 364933 | 375184 |
| 20 | 20 | 1:2 | 222021 | 247382 |
| 50 | 90 | 1:1 | 343832 | 339393 |
| 20 | 60 | 1:2 | 359302 | 363822 |
| 20 | 60 | 1:3 | 354940 | 363628 |
| 20 | 20 | 1:3 | 213934 | 212922 |
| 20 | 90 | 1:3 | 387892 | 395272 |
| 90 | 90 | 1:1 | 214383 | 210393 |
| 50 | 20 | 1:1 | 335400 | 343394 |
| 50 | 60 | 1:3 | 338382 | 343932 |
| 90 | 90 | 1:2 | 210233 | 210033 |
| 90 | 90 | 1:3 | 222822 | 223839 |
| 50 | 60 | 1:1 | 323892 | 332902 |
| 50 | 20 | 1:3 | 341922 | 352022 |
| 90 | 60 | 1:2 | 223022 | 231233 |
| 90 | 20 | 1:2 | 213933 | 221292 |
| 50 | 90 | 1:2 | 334322 | 343322 |
| 20 | 20 | 1:1 | 253421 | 253202 |
| 20 | 90 | 1:2 | 378372 | 380182 |

respuesta (MSR). Las ecuaciones correspondientes al modelo utilizado se muestran en la tabla 7 y sus representaciones tridimensionales en la figura 4. Los resultados indican que un compromiso entre sensibilidad, tiempo de reacción y frecuencia de análisis se logra con una potencia de irradiación de

140 w (20% del valor nominal), una relación reactivo molar derivatizante:analito y un tiempo de irradiación de 90 s. Estos valores permiten la automatización de esta etapa con un menor gasto de reactivo y en un tiempo menor a los reportados en la literatura [19, 20, 35].

Tabla 5
Análisis de varianza para los efectos principales de la reacción de derivatización asistida por microondas en el área de pico del ATN

| Fuentes de variación | Suma de cuadrados | G.L | Cuadrados medios | F _o | VP |
|----------------------|--------------------------|-----|--------------------------|----------------|--------|
| A: potencia | $4,4977 \times 10^{10}$ | 1 | $4,4977 \times 10^{10}$ | 70,10 | 0,0000 |
| B: tiempo | $9,46821 \times 10^9$ | 1 | $9,46821 \times 10^9$ | 14,76 | 0,0013 |
| C: relación v:v | $9,96392 \times 10^6$ | 1 | $9,96392 \times 10^6$ | 0,02 | 0,9023 |
| AA | $1,9215 \times 10^{10}$ | 1 | $1,9215 \times 10^{10}$ | 29,95 | 0,0000 |
| AB | $2,00307 \times 10^{10}$ | 1 | $2,00307 \times 10^{10}$ | 31,22 | 0,0000 |
| AC | $4,77228 \times 10^8$ | 1 | $4,77228 \times 10^8$ | 0,74 | 0,4004 |
| BB | $1,02255 \times 10^9$ | 1 | $1,02255 \times 10^9$ | 1,59 | 0,2238 |
| BC | $2,62496 \times 10^7$ | 1 | $2,62496 \times 10^7$ | 0,04 | 0,8421 |
| CC | $1,81709 \times 10^8$ | 1 | $1,81709 \times 10^8$ | 0,28 | 0,6015 |
| Error | $1,09068 \times 10^{10}$ | 17 | $6,41577 \times 10^8$ | | |
| Total | $1,17887 \times 10^{11}$ | 26 | | | |

R² = 90,741%

R² (ajustado para los G.L) = 85,8500%

Estadístico Durbin-Watson = 2,3989 (P=0,8582)

G.L: grados de libertad, F_o: estadístico de Fisher; VP: Valor-p: P(F>F_o)

Tabla 6
Análisis de varianza para los efectos principales de la reacción de derivatización asistida por microondas en el área de pico del PRO

| Fuentes de variación | Suma de cuadrados | G.L | Cuadrados medios | F _o | VP |
|----------------------|--------------------------|-----|--------------------------|----------------|--------|
| A: potencia | $5,08817 \times 10^{10}$ | 1 | $5,08817 \times 10^{10}$ | 73,91 | 0,0000 |
| B: tiempo | $8,92033 \times 10^9$ | 1 | $8,92033 \times 10^9$ | 12,96 | 0,0022 |
| C: relación v:v | $7,56855 \times 10^7$ | 1 | $7,56855 \times 10^7$ | 0,11 | 0,7443 |
| AA | $1,92048 \times 10^{10}$ | 1 | $1,92048 \times 10^{10}$ | 27,90 | 0,0001 |
| AB | $1,96907 \times 10^{10}$ | 1 | $1,96907 \times 10^{10}$ | 28,60 | 0,0001 |
| AC | $2,75808 \times 10^8$ | 1 | $2,75808 \times 10^8$ | 0,40 | 0,5352 |
| BB | $1,26039 \times 10^9$ | 1 | $1,26039 \times 10^9$ | 1,83 | 0,1937 |
| BC | $2,91842 \times 10^8$ | 1 | $2,91842 \times 10^8$ | 0,42 | 0,5237 |
| CC | $6,85847 \times 10^7$ | 1 | $6,85847 \times 10^7$ | 0,10 | 0,7561 |
| Error | $1,17026 \times 10^{10}$ | 17 | $6,88387 \times 10^8$ | | |
| Total | $1,24473 \times 10^{11}$ | 26 | | | |

R² 90,5483%

R² (ajustado para los G.L) = 85,621%

Estadístico Durbin-Watson = 2,23437 (P=0,7517)

G.L: grados de libertad, F_o: estadístico de Fisher; VP: Valor-p: P(F>F_o)

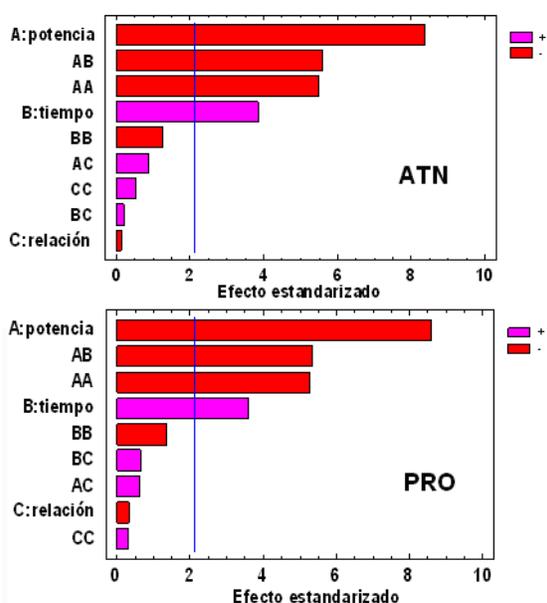


Figura 3. Gráfico de efectos estandarizados en la reacción de derivatización asistida por microondas para ATN y PRO.

Separación cromatográfica

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice fundida con un 5% fenil, 95% metilpolisiloxano, (VA-5MS) de 30 m × 0,25 mm con un espesor de película de 0,25 μm suministrada por VARIAN. El programa de temperatura del horno que permitió la mejor resolución de los analitos fue: 120°C (3 min) hasta 290°C (5 min) con una rampa de temperatura de 35°C/min. Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 mL min⁻¹.

Teniendo en cuenta los bajos niveles de concentración para la ATN y PRO en orina reportados en la literatura (11, 17), se mejoró la detección utilizando el inyector en la modalidad de inyección splitless. Para ello, se optimizó el programa de temperatura del inyector con una temperatura inicial por encima de la temperatura de volatilización del

Tabla 7

Ecuaciones predictivas para la variabilidad en el área de pico con respecto a los factores estudiados la reacción de derivatización

| Analito | Ecuación |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATN | $Y = 149999 + 5237,31 \cdot X_1 + 3594,86 \cdot X_2 - 34951,8 \cdot X_3 - 47,319 \cdot X_1^2 - 33,1266 \cdot X_1 \cdot X_2 + 179,569 \cdot X_1 \cdot X_3 - 10,9159 \cdot X_2^2 + 42,1144 \cdot X_2 \cdot X_3 + 5503,17 \cdot X_3^2$ |
| PRO | $Y = 160516 + 5215,51 \cdot X_1 + 3495,79 \cdot X_2 - 30812,8 \cdot X_3 - 47,3065 \cdot X_1^2 - 32,8443 \cdot X_1 \cdot X_2 + 136,513 \cdot X_1 \cdot X_3 - 12,119 \cdot X_2^2 + 140,425 \cdot X_2 \cdot X_3 + 3380,94 \cdot X_3^2$ |

Y = área de pico; X₁ = potencia de irradiación; X₂ = tiempo de irradiación; X₃ = relación analito:reactivo v.v.

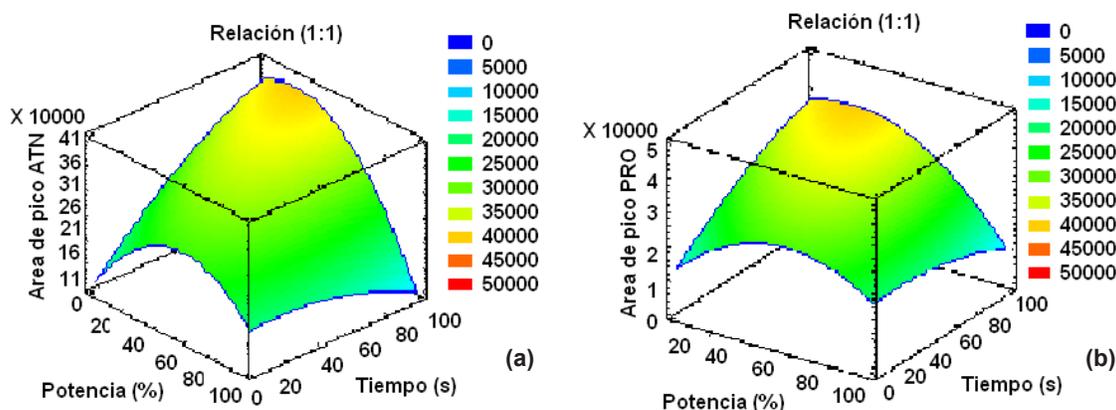


Figura 4. Superficies de respuesta estimadas para las variables involucradas en la reacción de silanización asistida por microondas con respecto al área de pico de: (a) ATN y (b) PRO como respuesta analítica con relación molar analito:reactivo (1:1).

solvente (MeCN) pero inferior a la temperatura de volatilización de los derivados del ATN y PRO. El mejor resultado fue: 120°C (2 min) con una rampa de 200°C/min hasta una temperatura final de 325°C (5 min), Adicionalmente, se reguló el tiempo de splitless utilizando el programa de apertura de la válvula: de 0 a 1,0 min *on*, de 1,0 a 1,5 min *off*. Bajo estas condiciones se pudieron inyectar 9 μL de muestra minimizando el efecto de grandes cantidades de vapores de solvente en el sistema.

El detector de masas se utilizó bajo la forma de impacto electrónico (70 eV). Las temperaturas de la línea de transferencia, manifold y trampa de iones fueron de 230°C, 40°C y 280°C respectivamente. Los iones seleccionados para llevar a cabo el monitoreo de ion específico (SIM) fueron: m/z 72, 188, 294 y 395 para el atenolol-diTMS y m/z 72, 115 y 332 para el propranolol-TMS.

En la figura 5 se muestran los cromatogramas obtenidos para la solución de los derivados de los analitos, se puede observar un pico a 7,1 min correspondiente al deri-

vado del ATN y uno a 7,5 correspondiente al del PRO con una buena resolución y sin interferencias por parte de la matriz. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores (17) que también desarrollaron métodos por cromatografía de gases y son menores a los reportados por Yilmaz y col. (20) y Paik y col. (16).

Validación del método

La validación del método propuesto se realizó evaluando la linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y los límites de cuantificación para ATN y PRO así como también el efecto de matriz.

Para evaluar la linealidad del método, se realizaron curvas de calibrado de soluciones patrones acuosas de ATN y PRO y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a los mismos niveles de concentración utilizando el método de adición estándar. El intervalo de concentración estudiado fue: 0,06-1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En la tabla 8, se muestran los resultados correspondientes a las ecua-

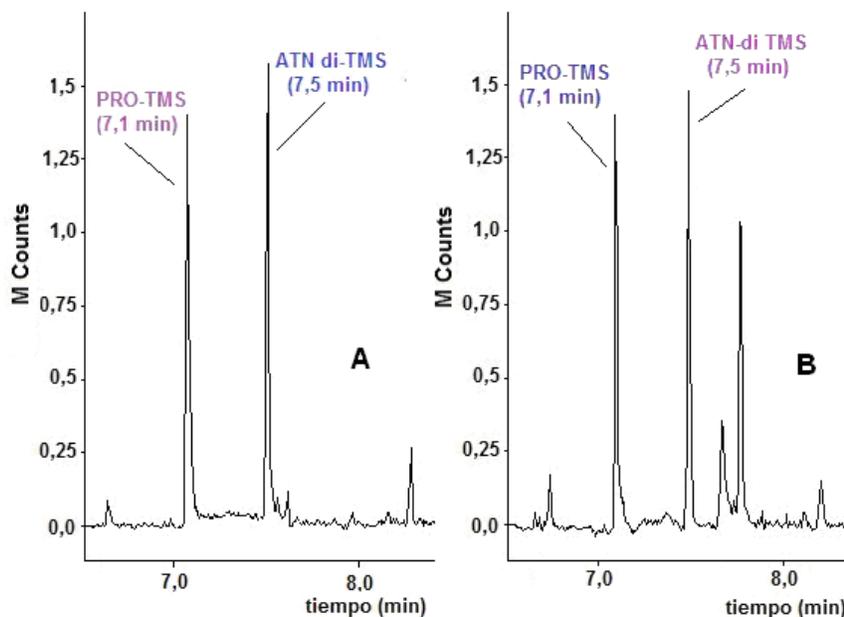


Figura 5. Cromatogramas obtenidos con las condiciones optimizadas, **A** solución estándar acuosa de ATN y PRO de 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos analitos, **B** muestra de orina enriquecida con los analitos en estudio (0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabla 8
Características analíticas del sistema MSFIA-MW-CG-EM para la determinación de ATN y PRO en patrones acuosos y orina enriquecida

| Parámetro analítico | ATN (calibración externa) | ATN (adición de estándar) | PRO (calibración externa) | PRO (adición de estándar) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|
| Intervalo lineal ($\mu\text{g/mL}$) | 0,06-1,00 | 0,06-1,00 | 0,06-1,00 | 0,06-1,00 |
| Pendiente | 94181 ($\pm 20,4$) | 96855 ($\pm 17,2$) | 94790 ($\pm 16,2$) | 96682 ($\pm 9,3$) |
| Intercepto | 463,8 ($\pm 0,8$) | 1353,8 ($\pm 0,4$) | 643,5 ($\pm 0,5$) | 1943,9 ($\pm 0,2$) |
| Coefficiente de correlación (r^2) ($n=7$) | 0,9995 | 0,9960 | 0,9977 | 0,9960 |
| Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$) | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$) | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| Reproducibilidad en un día (0,25, 0,50, 0,75 $\mu\text{g/mL}$) C.V. %, ($n=5$) | 2,72; 2,11; 2,85 | 2,76; 0,58; 2,90 | 2,60; 2,12; 0,48 | 1,51; 0,83; 2,86 |
| Reproducibilidad entre días (0,25, 0,50, 0,75 $\mu\text{g/mL}$) C.V. %, ($n=5$) | 0,25; 3,61; 3,85 | 2,27; 2,11; 3,49 | 2,59; 3,70; 2,92 | 3,24; 1,48; 2,18 |
| Exactitud (0,25, 0,50, 0,75 $\mu\text{g/mL}$) % de recuperación (C.V. %) ($n=5$) | 101,2 (3,1%); 102,0 (1,9%); 104,4 (2,7%) | | 99,0 (2,8%); 106,5 (3,2%); 103,7 (2,9%) | |

C.V. Coeficiente de variación ($n=5$), r^2 : coeficiente de determinación.

ciones de regresión lineal del área del pico de los analitos en función de la concentración para todos los casos. Cada gráfico de calibración incluyó una serie de seis puntos y un blanco medidos al menos tres veces. Se puede observar que los coeficientes de regresión lineal son mayores a 0,996 para todos los casos por lo que existe una buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

Por otra parte, para evaluar el efecto de la matriz en el análisis, se llevó a cabo un estudio estadístico (*t-student*) con el fin de comparar las pendientes de las rectas de calibrado de las soluciones estándares acuosas y aquellas correspondientes a las de adición de estándar. Los resultados indicaron que no existía diferencia significativa entre las curvas de regresión de estándares acuosos y de muestras de orina enriquecidas con los betabloqueadores estudiados (*t-student* 95% < 2,18, $n=7$). Este comportamiento permitió concluir que no existe interferencia de la matriz en el análisis y que se puede evaluar los niveles de concentración de los analitos

en las muestras de orina utilizando la curva de calibración de los estándares acuosos.

La precisión del método en un día y entre días se evaluó para soluciones estándares acuosas de los analitos y para muestras de orina enriquecidas a diferentes niveles de concentración. Las muestras se analizaron por el procedimiento propuesto durante un día ($n=5$) y para días diferentes ($n=5$). Los coeficientes de variación fueron <3,85% para todos los casos lo que indicaba una buena precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del método y estabilidad del sistema MSFIA-MW-CG-EM utilizado.

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación de los analitos desde muestras de orina. Para ello se analizaron por el método propuesto muestras enriquecidas a diferentes niveles de concentración (tabla 8). Para todos los casos los valores de los % de recuperación estuvieron comprendidos en el intervalo 98,99 y 104,41% con un coeficiente de variación <3,00% ($n=5$). Estos resultados nos prue-

ban una buena exactitud del método, ya que los valores de los porcentajes de recuperación son cuantitativos. Por otra parte la buena exactitud del procedimiento descrito nos confirma la excelente eficiencia de extracción de la precolumna OASIS HLB empleada para el tratamiento de la muestra.

Los límites de detección y de cuantificación definidos como la concentración de los analitos que cumplen con una relación señal:ruido de 3:1 y 10:1 respectivamente, fueron de 0,02 y de 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para ambos analitos. Es importante señalar, que estos valores fueron obtenidos para un volumen de muestra de 0,200 mL, que permitió evaluar satisfactoriamente a ambos analitos en muestras de orina analizadas. Sin embargo, si se necesitara mejorar la sensibilidad del método se podría aumentar el volumen de inyección hasta valores de 0,300 mL.

Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto se analizaron 6 muestras de orina de pacientes hipertensos bajo tratamiento con 100 mg de ATN o con 80 mg de PRO. Los resultados obtenidos indicaron cantidades excretadas de ATN en el intervalo 0,80-1,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y para PRO en el intervalo 0,85-3,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos valores se encuentran en concordancia con los reportados en la literatura [36-40].

Adicionalmente, el método desarrollado también se validó analizando las mismas muestras reales por un método desarrollado en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección por fluorescencia (FL) y con tratamiento de la muestra en línea en un sistema de columnas acopladas, utilizando igualmente como precolumna de extracción la Oasis HLB [41]. Con los datos obtenidos de ambos métodos se realizó un gráfico de correlación y los resultados indican que existe una correlación muy buena (recta de correlación: $Y = 0,981X - 0,017$; $n = 6$) con un valor del coeficiente de determinación (R^2) = 0,9923. También, los resultados se compararon estadísticamente utilizando el estadístico *t-student*. El análisis estadístico

demonstró, que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos ($t_{\text{observada}}: 0,55 < t_{\text{critico}} 2,23$ ($P = 0,05$); $n = 6$) [42].

Conclusiones

Este trabajo propone un método para la determinación de ATN y PRO en muestras de orina que representa una excelente alternativa como método de rutina para estudios farmacocinéticos o seguimiento de tratamientos clínicos. El procedimiento automatiza el tratamiento de la muestra con la determinación de los analitos por CG-EM aumentando la frecuencia de análisis a 8 muestras por hora. Las propiedades analíticas son apropiadas para el análisis propuesto y compiten favorablemente con las de otros métodos descritos en la literatura [16].

Agradecimientos

Los autores agradecen al FONACIT y al CDCHT-ULA por el apoyo financiero que brindan para la divulgación de resultados, a través de diversos programas de apoyo al investigador. El desarrollo de este trabajo fue cofinanciado a través del Proyecto G-2005000641 del FONACIT.

Referencias bibliográficas

1. VELASCO M., ROMERO B., BETANCOURT M. *Arch Venezolanas de Farmacología y Terapéutica* 21(2): 139-147. 2002.
2. FLORES J. *Farmacología Humana*. Editorial Masson, Barcelona, España, 1998.
3. GUEVEDO F. El Control de la calidad integral de los medicamentos. *Diagnóstico* 43(2). 2004.
4. SAPIR A., SHALEV A.H., SKALKA N., BRONSHTEIN A., ALTSTEIN M. *Environ Toxicol Chem* 32: 585-593, 2013.
5. SILVA L., TREVISAN M., POPPI R., SENA M. *Anal Chim Acta* 595: 282-288, 2007.

6. DE LIMA I.A., DOS REIS R.R., DE MELO E.B. **Bioscience Journal** 28(3): 484-493. 2012.
7. DAMIAN P.C. **Talanta** 85(3): 1526-1534. 2011.
8. GOYAL R., GUPTA V., OYAMA M., BACHHETI N. **Electrochem Commun** 8: 65-70. 2006.
9. DELAMOYE M., DUVERNEVIL M., PARAIRE F., MAZANCOURT P., ÁLVAREZ J.C. **Forensic Sci Int** 141(1): 23-31. 2004.
10. LEE H.B., SARAFIN K., PEART T. **J Chromatogr A** 1148: 158-167. 2007.
11. IHA M., MARTINEZ A., BONATO P. **J Chromatogr B** 767: 1-9, 2002.
12. PIRES DE ABREU L., CALAFATTI S., PEDRAZZOLI J. **Am Assoc Pharmaceut Scientists** 5 (2): 1-7. 2003.
13. PARTANI P., MODHAVE Y., GURULE S., KHURROO A., MONIF T. **J Pharmaceut Biomed** 50(5): 966-976. 2009.
14. ALIZADEH T. **Separ Purif Technol** 118: 879-887. 2013.
15. DOMÍNGUEZ-ROMERO J.C., GARCÍA-REYES J.F., MARTÍNEZ-ROMERO R., BERTON P., MARTÍNEZ-LARA E., DEL MORAL-LEAL M.L., MOLINA-DÍAZ A. **Anal Chim Acta**, 761: 1-10. 2013.
16. PAIK M.J., NGUYEN D.T., KIM K.R. **Chromatographia** 64(11-12): 673-679. 2006.
17. PAIK M.J., LEE J., KIM K. R. **Anal Chim Acta** 601: 230-233. 2007.
18. YILMAZ B., ARSLAN S., AKBA V. **Talanta** 80 (1): 346-351. 2009.
19. YILMAZ B., ARSLAN S. **Chromatographia** 70 (9-10): 1399-1404. 2009.
20. YILMAZ B., ARSLAN S. **J Chromatogr Sci** 49(5): 365-369. 2011.
21. CABAN M., STEPNOWSKI P., KWIATKOWSKI M., MIGOWSKA N., KUMIRSKA J. **J Chromatogr A** 1218(44): 8110-8122. 2011.
22. SOUVERAIN S., RUDAZ S., VEUTHEY L.J. **J Chromatogr B** 801: 141-156. 2004.
23. MIRÓ M., CERDÀ V., ESTELA J.M. **Trends Anal Chem** 21: 199-210. 2002.
24. CERDÀ, V. **Introducción a los métodos de análisis en flujo**. SCIWARE, S.L., Palma de Mallorca, España. 20-27. 2006.
25. WATERS OASIS. Mildford, Massachusetts, 2008. Disponible en: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locate=en_us&cid=513209
26. RUZICKA J., HANSEN E. **Anal Chim Acta** 78: 145-157. 1975.
27. Blau K., HALKET J.M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. Editorial John Wiley Interscience 1993.
28. BLANCHARD J. **J Chromatogr A** 226: 455-460. 1981.
29. SCHUMMER C., DELHOMME O. **Talanta** 77: 1473-1482. 2009.
30. POOLE C.F. **J. Chromatogr. A** 1296: 2-14. 2013.
31. Statgraphics 5.1. Software Warrrenton V. A. 20186 USA; Starpoints Technology. INC. 2001.
32. GUTIÉRREZ PULIDO H., DE LA VARA SALAZAR R. **Análisis y diseño de experimentos**. McGraw Hill (México). 2ª Edición. 62-79. 2008.
33. CORTAZAR E., BARTOLOMÉ L., DELGADO A., ETXEBARRIA N., FERNÁNDEZ L.A., USOBIAGA A., ZULOAGA O. **Anal Chim Acta** 534: 247-254. 2005.
34. AZZOUZ A., BALLESTEROS E. **J Chromatogr B** 891-892: 12-19. 2012.
35. HYÖTYLÄINEN T., ANDERSSON T., RIEKKOLA M.L. **J. Chromatogr. Sci.** 35: 280-286. 1997.
36. JOHNSON R.D., LEWIS R.J. SIMULTANEOUS QUANTITATION OF ATENOLOL, METOPROLOL, AND PROPRANOLOL IN BIOLOGICAL MATRICES VIA LC/MS. Washington, DC: U.S. Department of Transportation, Federal Aviation Administration, Office of Aerospace Medicine, Technical Report N° DOT/FAA/AM-05/10. 2005- pág 1-7.
37. JOHNSON R.D., LEWIS R.J. **Forensic Science International** 156: 106-117. 2006.
38. MEHVAR R. **J Pharm Sci** 78(12):1035-1039. 1989.

39. BARANOWSKA I., MAGIERA S., BARANOWSKI J. **J Chromatogr Sci** 49: 764-773. 2011.
40. PUJOS E., CREN-OLIVÉ C., PAISSE O., FLAMENT-WATON M., GRENIER-LOTUSLALOT M. **J Chromatogr B** 877: 4007-4014 2009.
41. BRUNETTO M.R., CLAVIJO S., DELGADO Y., OROZCO W., AYALA C., GALLIGNANI M., CALDERÓN L. **Rev de la Facultad de Farmacia** 53(1): 28-37 2011.
42. MILLER J.N., MILLER J.C. **Estadística y quimiometría para química analítica**. 4 ed. Editorial Pearson Educación Madrid España 2005.