

24/1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFEN EN PLASMA EN PRESENCIA DE BENZIDAMINA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A
VICTOR MANUEL ACOSTA ALONSO
MEXICO, D. F. 1989

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

CAPITULO

I	Introducción	1
II	Generalidades	3
	A. Cromatografía	5
	B. Biodisponibilidad	14
	B.1 Definición de algunos términos y parámetros farmacocinéticos	14
	B.2 Factores que determinan la biodisponibilidad	20
	C. Validación de métodos analíticos	26
	D. Revisión y discusión de métodos reportados para cuantificar acetaminofén en plasma	34
	E. Monografía de acetaminofén	36
	Monografía de clorhidrato de benzidamina	45
III	Parte experimental	49
	3.1.A Cuantificación de acetaminofén en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución	51
	3.2.B Validación del método analítico	56
	3.3.C Resultados y Discusión	59
IV	Conclusiones	82
V	Bibliografía	84

I. INTRODUCCION

La eficiencia de un tratamiento terapéutico depende en gran medida de la cantidad de principio activo que llega a ser absorbido, a partir de los sitios de depósito, para integrarse a la circulación sistémica y de esa manera alcanzar los sitios de acción en el organismo. En este sentido, una fuente importante de variación terapéutica es la biodisponibilidad del principio activo a partir de la forma farmacéutica. Es por ésto que durante el desarrollo de un producto farmacéutico, - debe realizarse la correlación entre la valoración clínica y los perfiles de concentración del principio activo en fluidos biológicos con la finalidad de poder establecer la dosis que provocará la respuesta deseada, sobre todo en aquellos principios activos con un estrecho índice terapéutico, en formas de liberación prolongada, o en asociaciones de 2 o más principios activos.

En la actualidad se ha extendido el empleo de métodos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para el análisis de fármacos en muestras biológicas, ya que se cuenta con columnas de una elevada eficiencia que hacen que las determinaciones sean exactas, reproducibles y específicas. Así mismo, - el uso de detectores altamente sensibles facilita la detección de concentraciones extremadamente pequeñas en las muestras por analizar.

Cuando se desarrollan métodos analíticos debe primeramente certificarse su validez de manera que se demuestre su - confiabilidad para analizar el fármaco en cuestión en el intervalo de concentración esperado sin alteraciones. Estas alteraciones son de diversa naturaleza; pueden ser ocasionadas por el sistema de medición, el método empleado, el analista y las alteraciones del medio ambiente externo que de manera aleatoria se presentan durante el análisis de las muestras.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar el método analítico por CLAR para cuantificar acetaminofén en plasma humano en presencia de benzidamina para utilizarlo en estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia.

II. GENERALIDADES

(2, 3, 5, 6, 7)

A. CROMATOGRAFIA

La cromatografía es esencialmente, un método físico de separación basado en el reparto de los componentes de la muestra entre una fase móvil líquida o gaseosa y una fase estacionaria sólida o líquido. Los procesos cromatográficos tienen lugar - como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra en la fase sólida.

De acuerdo al tipo de fase móvil las técnicas cromatográficas se clasifican en dos grupos. Cromatografía de gases cuando la fase móvil es un gas y cromatografía de líquidos cuando la fase móvil es un líquido.

En la Figura No. 1 se muestra el diagrama general de clasificación de dichas técnicas.

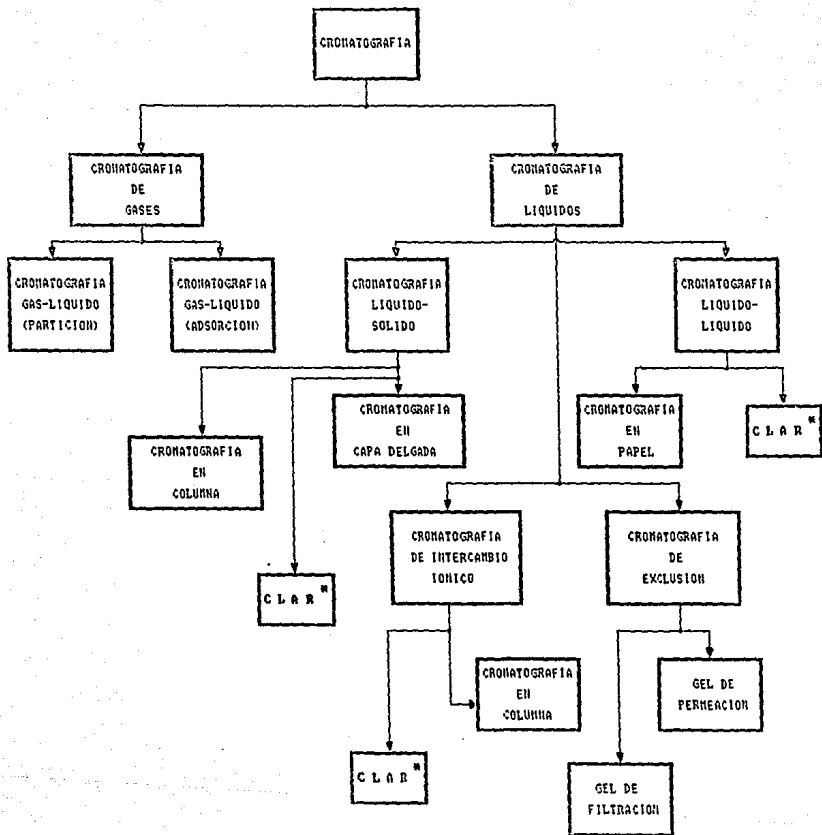


Figura No.1 Diagrama General de Cromatografía
 * CLAR = CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

Este tipo de cromatografía se fundamenta en la diferencia del equilibrio de distribución en una mezcla de componentes en fases heterogéneas, donde una de estas fases es un sistema líquido (fase móvil) que es forzado a pasar a través de un lecho estacionario (fase estacionaria) por bombas de alta presión. Durante el trayecto, las moléculas migran a una velocidad que está en función del equilibrio de distribución dado por la interacción entre los componentes de la muestra y las fases, de tal manera que cada sustancia invierte un tiempo particular en pasar a través del sistema cromatográfico, este tiempo se denomina tiempo de retención (T_R). Al salir la sustancia es rastreada por un detector para cuantificarla y posteriormente convertirla en una señal que se registra en forma de picos, éstos generalmente adquieren forma simétrica y gaussiana, debido a que el promedio de moléculas de soluto mantiene un equilibrio de distribución en su trayecto a través de la columna, originando así una isoterma de distribución lineal.

Un cromatograma típico se presenta en la Figura No. 2.

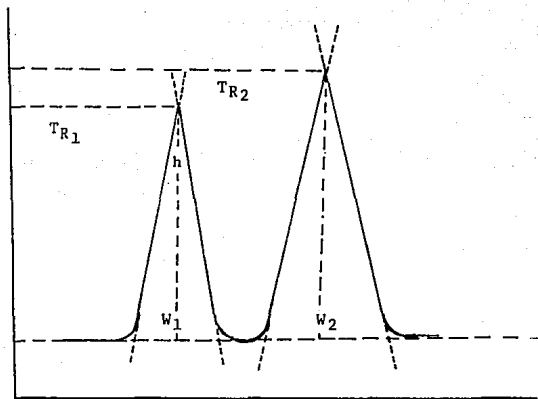


Figura No. 2 Cromatograma típico de CLAR

Donde: T_R : Tiempo de retención
 W : Amplitud del pico correspondiente
 h : Altura del pico correspondiente.

El área de un pico (W) es proporcional a la cantidad de soluto; la altura del pico (h) se correlaciona con la concentración y el tiempo de retención (T_R) es el tiempo en el cual aparece el máximo de un pico en un cromatograma y está en función de la velocidad de flujo y del volumen de la fase móvil.

La resolución de 2 bandas adyacentes es igual a la distancia entre los centros de las 2 bandas dividido entre el promedio de amplitud de sus bases:

$$R_s = \frac{T_{R2} - T_{R1}}{1/2 [W_1 + W_2]}$$

Una buena resolución entre dos picos puede observarse también en la Figura No. 2, si la resolución tiene un valor de 1.5 nos indica que existe una buena separación, valores inferiores a este parámetro indican separaciones deficientes.

La resolución es un parámetro que se relaciona con la selectividad, eficiencia y capacidad y está expresada por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{K'}{K' + 1} \right]$$

La selectividad está determinada por la separación relativa de los componentes y depende del coeficiente de distribución de los solutos de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

Donde: α = Selectividad

K_1, K_2 = Coeficientes de distribución de los componentes 1 y 2 respectivamente.

La eficiencia es una medida de la habilidad de una columna para dar picos en forma angosta y estrecha, se expresa cuantitativamente por el número de platos teóricos de la columna.

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{W} \right]^2$$

Donde: N = Número de platos teóricos.

N es proporcional a la longitud de la columna (L,) al incrementar L aumenta también N, mejorando así la separación.

La relación entre N y L se expresa en términos de la ecuación.

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

Donde: H es llamada altura equivalente de platos teóricos. (H = L/N) y mide la eficiencia de una columna por unidad de longitud.

El factor de capacidad indica la afinidad de los componentes en la fase móvil por la fase estacionaria y queda expresado como:

$$K' = \frac{n_s}{n_m}$$

Donde: n_s = Moles de soluto en la fase estacionaria

n_m = Moles de soluto en la fase móvil.

Pequeños valores de K' indican que los componentes tienen gran afinidad por la fase móvil ($n_m > n_s$) y consecuentemente son poco retenidos por la columna.

Los componentes básicos de un sistema cromatográfico de CLAR se muestran en la Figura No. 3 y se describen a continuación.

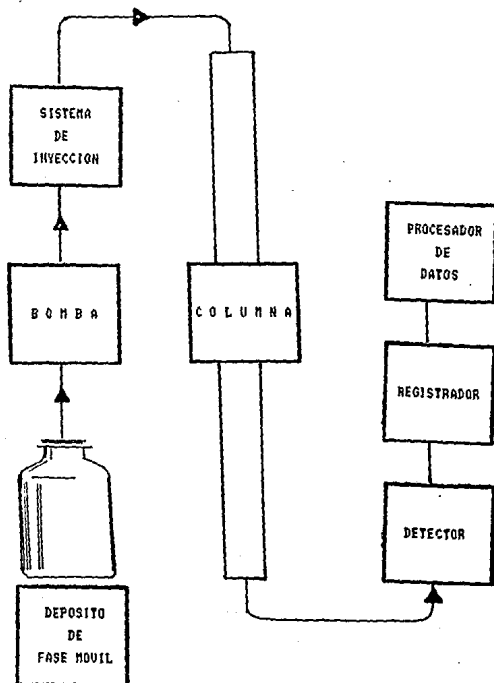


Figura No. 3 Sistema cromatográfico.

- a) Depósito de fase móvil. Para elegir un contenedor se debe considerar el material del cual esté fabricado, de tal manera que no interaccione con la fase móvil; puede ser de - vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes.

Los disolventes correspondientes a la fase móvil deben ser desgasificados, ya sea antes de colocarse en el contenedor o directamente en él para eliminar los posibles gases disueltos (oxígeno) que pueden reaccionar con la fase móvil o con la estacionaria.

Dichos disolventes deben reunir las siguientes características:

- Poseer alta pureza.
 - No interactuar con la columna.
 - Tener baja viscosidad.
 - Ser capaces de disolver la muestra.
 - Ser estables bajo las condiciones de operación.
 - Comercialmente disponibles.
- b) Bomba. Las bombas permiten a los disolventes fluir a través del sistema por la permeabilidad de la columna, la viscosidad de la fase móvil y la longitud de la columna.

Las bombas pueden ser clasificados en dos grupos:

1. Bombas de volumen constante, que a su vez pueden ser de desplazamiento constante o recíprocas.
2. Bombas de presión constante. Desplazan la fase móvil por medio de un gas inerte, el flujo es uniforme, continuo y libre de pulsaciones. La capacidad de esta bomba es más limitada que el caso anterior.

c) Sistema de Inyección. Dispositivo que permite la introducción de la muestra a la columna, para que puedan separarse los componentes de la muestra. Un inyector debe ser capaz de introducir cualquier muestra a la entrada de la columna sin alterar el empaque, debe resistir altas presiones y - debe ser lavado completamente por la fase móvil.

d) Columna. Es la parte esencial del sistema cromatográfico, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los - componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente consiste de un tubo de material inerte, que van desde adsorbentes de diferentes polaridades, grupos iónicos específicos, de sílica o grupos funcionales característicos, de diámetro uniforme, capaz de resistir altas presiones el cual está empacado de acuerdo a las necesidades particulares de la separación.

e) **Detector.** Dispositivo que permite la detección de manera continua de los componentes de la muestra que se eluyen de la columna.

Debe tener alta sensibilidad y responder linealmente en un amplio intervalo de concentraciones.

Los detectores más usados son:

- Absorción ultravioleta
- Fluorescencia
- Índice de refracción
- Radioactividad
- Conductividad térmica
- Electroquímicos

f) **Registrador.** Tiene como función graficar automáticamente en forma de picos a cada componente que es eluido, dependiendo de la concentración del soluto y del tiempo de retención.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las - señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

B. BIODISPONIBILIDAD (10)

La biodisponibilidad se refiere a la cantidad relativa de fármaco administrado que llega a la circulación sistémica, así como la velocidad con la que dicho fármaco se absorbe. La biodisponibilidad es la característica más importante para determinar el inicio, intensidad y la duración del efecto terapéutico de un fármaco.

B.1 DEFINICION DE ALGUNOS TERMINOS Y PARAMETROS FARMACOCINETICOS. (10, 11, 12)

Biofarmacia: Estudia los factores y variables que modifican la biodisponibilidad de un fármaco en animales y humanos, el uso de esta información es comúnmente valiosa para la optimización de las formas farmacéuticas. Así un principio activo tendrá una mayor potencialidad de ser absorbido más eficazmente a partir de los sitios de depósito e integrarse a la circulación sistémica.

Farmacocinética: Estudia el curso temporal de las concentraciones y cantidades de fármaco o metabolito en fluidos, tejidos y excreciones biológicas. Además permite construir modelos adecuados para la interpretación de resultados y predicción de niveles de fármaco.

Bioequivalencia: Es un estudio de biodisponibilidad relativa de dos o más productos farmacéuticos diferentes conteniendo el mismo principio activo, y administrados en el mismo régimen de dosificación a los mismos pacientes.

Constante de velocidad (K): Es una constante específica que representa la velocidad de transferencia de fármaco de un compartimento a otro. Dicha velocidad de transferencia del medicamento de un compartimento a otro se ha observado que generalmente sigue una cinética de primer orden.

Se expresa matemáticamente como:

$$\frac{dc}{dt} = -Kc$$

Donde: dc/dt = Velocidad de transferencia del fármaco

c = Concentración del fármaco en un compartimento dado.

K = Constante velocidad de transferencia intercompartimental de la sustancia de interés.

Vida media biológica ($t_{0.5}$): Es el tiempo necesario para reducir la concentración de un fármaco en el organismo en un 50%. En cinética lineal este parámetro es constante, independiente de la dosis administrada y de la vía de administración.

Constante de eliminación (K_e): Es una constante híbri
da resultante del equilibrio dinámico que regula la velocidad
de desaparición del principio activo o sus metabolitos del orga
nismo. En la Figura No. 4 se muestra la constante de elimina
ción obtenida a partir de la porción terminal de una gráfica -
que muestra el perfil temporal de un fármaco que sigue una -
cinética lineal de primer orden en su fase de eliminación.

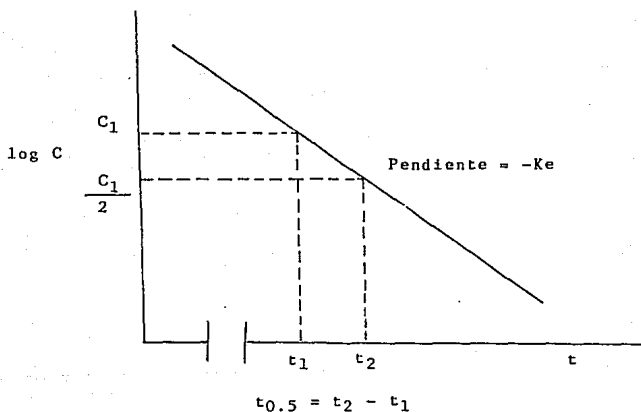


Figura No. 4

Perfil temporal plasmático de un fármaco que sigue una cinética
lineal.

Concentración plasmática máxima ($C_{pm\acute{a}x}$): Es la máxima concentración sanguínea alcanzada después de la administración del medicamento. Se emplea para determinar si una formulación proporciona niveles sanguíneos, dentro del intervalo terapéutico, conociendo previamente la concentración mínima efectiva y la concentración tóxica.

En la Figura No. 5 se muestra una curva de niveles sanguíneos.

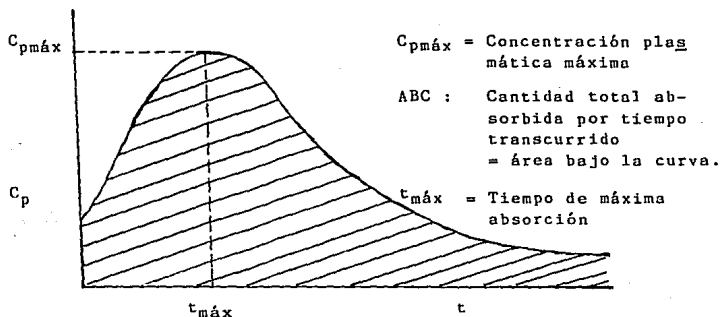


Figura No. 5

Perfil plasmático de un fármaco que sigue un modelo abierto de un compartimento (MAUC) cuando es absorbido con una cinética de primer orden.

Tiempo de máxima absorción ($T_{máx}$): Es el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima después de la administración del medicamento y está determinado por el equilibrio que guardan la velocidad de absorción y la de eliminación del fármaco.

Volumen de distribución (V_d): Es el volumen de fluido corporal que se requeriría para diluir la dosis del fármaco administrado y mostrar la misma concentración que éste muestra en dicho fluido en condiciones in vivo.

Cantidad total absorbida o área bajo la curva (ABC): Es el producto de la cantidad total del principio activo absorbido después de la administración de una dosis única de medicamento por el período transcurrido. Está representada por el área total que abarca la curva.

Al graficar el logaritmo de la concentración plasmática contra tiempo en este caso se obtiene una línea recta, cuya pendiente en la porción terminal es la constante de eliminación (K_e), y el intercepto al origen es el logaritmo de $F \cdot D / (K_a - K_e) \cdot V_d$. Aquí K_a = constante de absorción; F = factor de biodisponibilidad; D = dosis administrada; V_d = volumen de distribución y K_e = constante de eliminación.

Al extrapolar la fracción logarítmica lineal y restar cada uno de los puntos de esta línea en la porción temporal que se distingue de la fase de absorción, y graficar estos - resultados en la escala semilogarítmica se origina una línea recta cuya pendiente es $-ka/2.303$, de donde es posible calcular la constante de velocidad de absorción de un fármaco.

En la Figura No. 6 se muestra la obtención de la constante de velocidad de absorción de primer orden, de acuerdo con el método de residuales que en forma resumida se describió en el párrafo anterior.

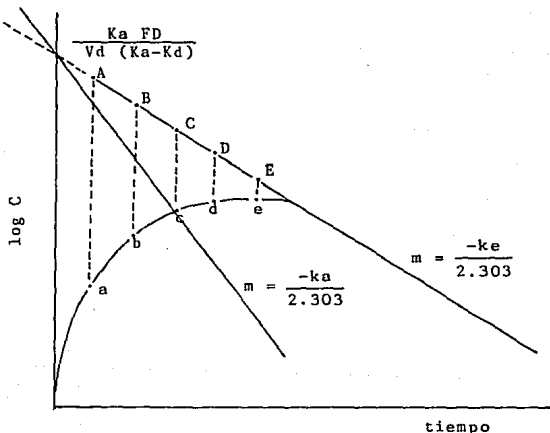
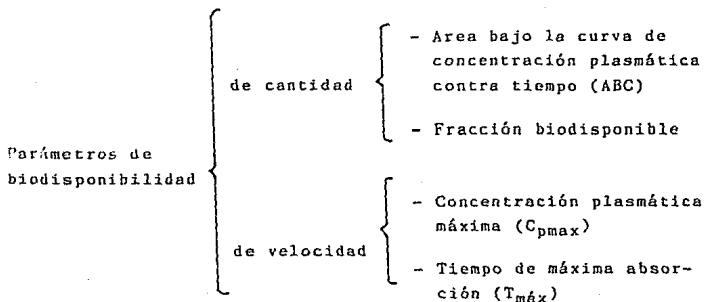


Figura No. 6 Gráfica de concentración de fármaco en un fluido biológico contra tiempo.

B.2 FACTORES QUE DETERMINAN LA BIODISPONIBILIDAD

Desde el momento en que una forma farmacéutica sólida se administra oralmente a un paciente, hasta la terminación del efecto biológico producido, ocurren una serie de eventos que son característicos de la relación fármaco-organismo. Estos se observan en la Figura No. 7.

Los parámetros utilizados para caracterizar la biodisponibilidad pueden dividirse en dos grupos, según se determine la cantidad absorbida o la velocidad de absorción.



El que se utilice un parámetro u otro dependerá de las aplicaciones terapéuticas y la trascendencia de éstos en la aplicación clínica.

La liberación del fármaco se puede estimar mediante estudios in vitro tales como la disolución. Dicha liberación está determinada por variables de la forma farmacéutica, incluyendo las propiedades físico-químicas del fármaco, la formulación o el proceso de fabricación del medicamento.

La biodisponibilidad de un fármaco administrado oralmente es función, en primer lugar, de la liberación del principio activo a partir de su forma farmacéutica, así como de la interacción estrecha del medicamento con los variables fisiológicas relativas a las diversas regiones del tracto gastrointestinal. Una vez disuelto, el fármaco puede absorberse pasando a través de la membrana de la mucosa gastrointestinal. Dicha absorción puede medirse con concentración del fármaco en sangre u otro fluido biológico y los perfiles a diferentes tiempos pueden en algunos casos asociarse con la respuesta terapéutica.

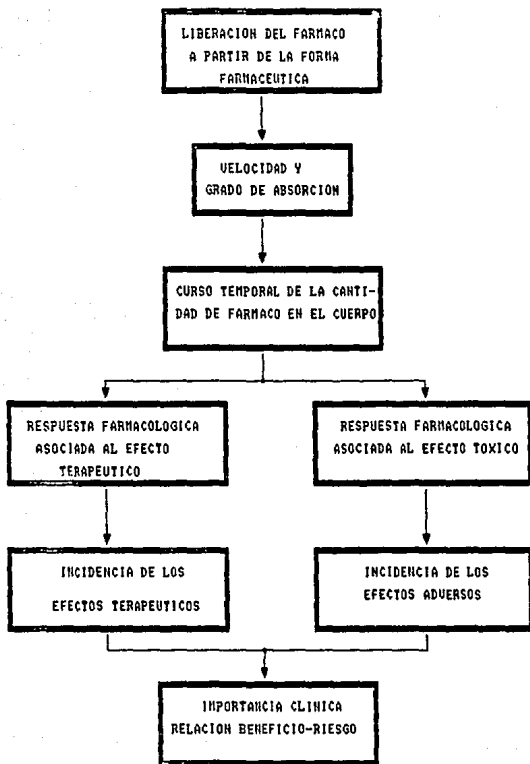


Figura No.7 Secuencia de eventos cuantificables en el uso de farmacos.

Los factores que afectan la biodisponibilidad se pueden dividir en 2 grandes grupos.

1. Factores fisiológicos (Tabla No. 1)

La velocidad de vaciamiento gástrico y tránsito intestinal son las variables fisiológicas más importantes que determinan el tiempo de residencia del fármaco en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal, la velocidad y magnitud de liberación y absorción del fármaco pueden ser también modificados - por diversos factores tales como: cambios en el pH y el volumen de los fluidos lumbinales, la presencia de enzimas digestivas, de enzimas metabólicas en las células de la mucosa, el área superficial de la mucosa, el flujo sanguíneo y la capacidad absorbente del tubo gastrointestinal.

Factores Fisiológicos	Propiedad de los fluidos lumbinales	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración del ión hidronio. - Interacción con la mucosa. - Compuestos complejantes presentes. - Interacción con la bilis.
	Factores que afectan el tránsito gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura del contenido gastrointestinal. - Vaciamiento gástrico. - Efecto de los alimentos. - Viscosidad de los alimentos. - Fuerza iónica del contenido gastrointestinal. - Estado de reposo-actividad. - Motilidad gastrointestinal.
	Factores de sitio de absorción	<ul style="list-style-type: none"> - Superficie efectiva. - Flujo sanguíneo local. - Transporte especializado. - Metabolismo intestinal.
	Aspectos metabólicos	<ul style="list-style-type: none"> - Metabolismo hepático. - Niveles enzimáticos. - Flujo sanguíneo hepatoportal, unión a proteínas.
	Efectos de distribución	<ul style="list-style-type: none"> - Recirculación enterohepática. - Niveles de proteínas plasmáticas. - Obesidad

Tabla No. 1 factores que modifican la biodisponibilidad.

2. Factores inherentes a la forma farmacéutica.

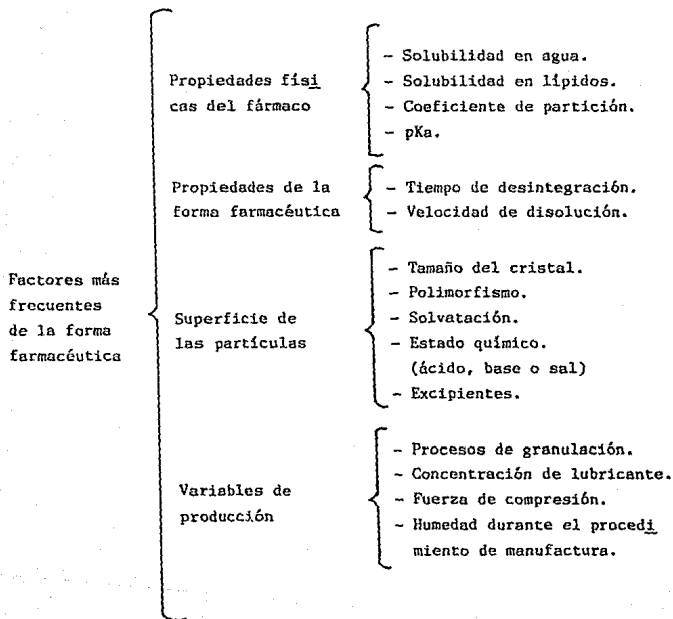


Tabla No. 2 Algunos factores de la forma farmacéutica.

C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (8, 9)

Los problemas que se presentan en el campo del análisis de fármacos en fluidos biológicos son múltiples y variados. Con la ayuda de las técnicas analíticas modernas y con la metodología estadística adecuada, podemos ser capaces de resolverlos con la confiabilidad requerida.

Para demostrar que una metodología analítica es adecuada se han desarrollado diversos procedimientos que incluyen la elaboración de pruebas con los parámetros que a continuación se describen.

- a) **Linealidad:** Es la habilidad del sistema analítico para asegurar que los resultados son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

En la práctica se grafican los datos experimentales, de tal manera que la cantidad recobrada esté en función de la cantidad adicionada para observar el grado en el que los resultados se comportan como una función lineal. Para conocer numéricamente lo anterior, se determina la correlación lineal de los datos. Por regresión se entiende la relación existente entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada representada por la ecuación:

$$Y_{ij} = A + Bx_i + E_j(i)$$

Donde:

A = Ordenada al origen

B = Es el coeficiente de regresión o pendiente de la recta, que nos indica la proporción entre las dos variables.

x_i = Cantidad adicionada de la concentración del nivel i-ésimo.

Y_{ij} = Cantidades recobradas de la concentración del nivel i-ésimo en j-ésima repetición.

$E_j(i)$ = Es el error experimental.

Para determinar numéricamente la anterior se utilizan las siguientes expresiones (según el método de mínimos cuadrados).

$$A = \frac{(\sum Y_i) (\sum x_i^2) - (\sum x_i) (\sum x_i Y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$B = \frac{n (\sum x_i Y_i) - (\sum x_i) (\sum Y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$E_j(i) = (Y_{ij} - \hat{Y}_i)$ donde \hat{Y}_i es el valor de Y_i estimado por la recta de regresión. $E_j(i)$ representa el error experimental asociado a la j-ésima repetición del i-ésimo nivel de concentración.

La correlación significa el grado de asociación entre dos variables, representado por un número llamado coeficiente de correlación "r", el cual indica la variabilidad explicada por la recta de regresión, siendo su estimación de manera puntual:

$$r = \frac{n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

- b) Exactitud. Es el grado de concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia. Una forma de evaluar la exactitud en función de los datos experimentales, efectuando inferencias estadísticas respecto al valor de referencia (cantidad adicionada) mediante:

Pruebas de hipótesis: El procedimiento se basa en verificar si los datos experimentales pertenecen a una distribución teórica cuyo parámetro es el valor de referencia. Una estadística de prueba que nos permite determinar lo anterior a partir de los datos de la muestra es el estadígrafo "t" de student que se expresa por:

$$t = \frac{\text{Valor promedio de los datos} - \text{Valor real}}{\text{Error experimental}}$$

dado que el diseño contempla, en los datos experimentales, el uso de porcentaje de recobro, la prueba t es:

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

donde: \bar{x} = Promedio de porcentajes de recobro de n muestras independientes.

μ = Es el parámetro, que nos representa el valor de referencia del porcentaje de recobro.

s/\sqrt{n} = Error estándar es una medida del error experimental, el cual está dado por la desviación estándar.

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n \sqrt{(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1} \text{ y la raíz cuadrada del número de muestras.}$$

Intervalo de confianza: Permite evaluar el intervalo en que se localiza el valor verdadero del parámetro.

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{x} \pm t_{0,975} \cdot s/\sqrt{n}$$

donde: \bar{x} = Valor promedio de los porcentajes de recobro.

$t_{0,975}$ = Es el valor teórico del estadígrafo que dará una confianza del 95% para el intervalo.

c) **Precisión:** Es el grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad y puede ser expresada en términos de repetibilidad y reproducibilidad, donde la primera es la concordancia respecto al valor central entre resultados sucesivos, obtenidos en un método sobre iguales condiciones de trabajo, y la reproducibilidad es la concordancia respecto a un valor de referencia en un método, pero bajo condiciones diferentes (analista, tiempo, aparatos, etc...).

1) **Evaluación de repetibilidad:** Para inferir la variabilidad a partir de los datos de la muestra, se utiliza un estadístico de prueba llamado χ^2 (ji-cuadrado), el cual se expresa por:

$$\chi^2_{\text{calculado}} = \frac{(n - 1) (s^2)}{\sigma^2}$$

donde: n = número de observaciones de muestras independientes.

s^2 = es la varianza muestral dada por:

$$s^2 = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

σ^2 = Es el parámetro, que nos representa la varianza del método, denominado varianza poblacional.

Dado que la variación debe ser menor al 5% para los - fines del presente estudio este valor es escogido como límite, se establece una hipótesis $H_0: \sigma^2 = 0.05$ y una alternativa $H_1: \sigma^2 > 0.05$ y en función de esto se establece una región de rechazo y aceptación de H_0 con un riesgo de tomar una decisión equivocada de $\alpha = 0.05$.

Se determina el intervalo de confianza del 95% para la estimación de σ , con el objeto de evaluar dentro de - qué intervalos se localiza el verdadero valor del pará- metro, mediante la siguiente expresión:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$$

donde: n = número de muestras independientes.

s^2 = varianza de los datos de porcentaje de recobro.

χ^2 = valor teórico del estadígrafo, que tiene asociado una confianza del 95%.

2) Evaluación de la repetibilidad en diferentes días.

Para conocer su variabilidad se utiliza la prueba de análisis de varianza (para dos factores con efectos aleatorios), que consiste en desglosar las diversas fuentes que contribuyen a la variabilidad del fenómeno

no, probando la significación de cada fuente contra el error experimental y valorando así su importancia relativa, cuyo criterio de prueba es el cociente del estadígrafo de prueba F de dos varianzas; donde el modelo estadístico lineal del diseño experimental es:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + E_{j(i)}$$

Para los propósitos del presente estudio este modelo lineal resulta apropiado. En él, la fuente de variación es el día. Esto se debe a la falta de analistas en el laboratorio que pudieran colaborar con el estudio.

donde: Y_{ij} = Porcentaje cuantificado en el i -ésimo día de la j -ésima repetición.

D_i = Efecto del i -ésimo día del porcentaje cuantificado.

$E_{j(i)}$ = Error experimental, el cual es una medida de la reproducibilidad día tras día.

μ = Es el parámetro el cual representa el valor real del porcentaje de recobro que no considera el efecto del día.

- d) **Especificidad:** Nos indica el grado en el cual la respuesta analítica es debida sólo a la sustancia que se desea determinar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar, ésto es, que pudiera haber - interferencias en los resultados por excipientes y/o productos de degradación formados durante el almacenamiento del material.
- e) **Sensibilidad:** Es la menor cantidad detectable del compuesto en análisis.
- f) **Estabilidad:** Este estudio permite establecer la estabilidad del principio activo o metabolito por cuantificar en la muestra por analizar. Además, señala si en un período de interés la muestra se conserva estable.

D. REVISION Y DISCUSION DE METODOS REPORTADOS PARA
CUANTIFICACION DE ACETAMINOFEN EN PLASMA HUMANO

(13, 14, 15, 16, 17)

El acetaminofén es un fármaco que se emplea principalmente como analgésico y antipirético. Para la determinación de acetaminofén en fluidos biológicos se han reportado algunos métodos analíticos que incluyen a la cromatografía de gases. Esta técnica requiere una sililación para convertir el acetaminofén en un derivado disilil volátil, lo cual involucra un - mayor tiempo de análisis y además introduce otra posible fuente de error en el mismo.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una alternativa más adecuada para la cuantificación de estos fármacos, debido a su versatilidad, eficacia, precisión y rapidez.

En la Tabla No. 3 se muestra una comparación de métodos analíticos reportados en la literatura para cuantificar - acetaminofén en plasma humano. En élla podemos observar las - diferencias existentes en cuanto al tratamiento de las muestras.

M E T O D O	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	LIMITE DE DETECCION	LONGITUD DE ONDA
<p>DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE ACETAMINOFEN EN PLASMA.</p> <p>SANDRA E. O'CONNELL and FRANK J. ZURZOLA. (13)</p> <p>J. Pharm. Sciences 71, 1982</p>	<p>1 ml plasma + 1 ml solución Saturada Ba(OH)₂ 0.3N</p> <p>Agitar vigorosamente 2 minutos</p> <p>+ 1 ml solución ZnSO₄ 5X</p> <p>Agitar vigorosamente 1 minuto, centrifugar 10 minutos a 3814 rpm.</p> <p>inyectar 75 µcl del sobrenadante.</p>	<p>Columna uBondapak C₁₈ 30 cm x 40 mm de (d-1) y pre-columna uBondapak C₁₈</p>	<p>MeOH/H₂O 15% 85%</p>	<p>0.1 mcg/ml plasma</p>	<p>240 nm</p>
<p>DETERMINACION DE ACETAMINOFEN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CLAR.</p> <p>LAWRENCE T. WONG, GNANAPRAKASAM SOLOMONHRAJ, BARRY H. THOMAS.(14)</p> <p>J. Pharm. Sciences vol. 65, 1976</p>	<p>1 ml plasma + 1 ml solución reguladora de fosfatos 1M pH 7.4</p> <p>Saturar c/NaCl.</p> <p>Extraer c/2ml de éter fase éterea</p> <p>Evaporar Lavar c/THF Evaporar</p> <p>Reconstituir en 50-250 µcl de CHCl₃: THF 2:1 v/v</p> <p>inyectar 2 µcl.</p>	<p>Columna sílica gel 10 µm de (d-1) 50 x 0.22 cm (1).</p>	<p>THF-CHCl₃ CH₃COOH/ Cl₃OH. 90% 10% 0.04 v/v</p>	<p>1.0 mcg/ml plasma</p>	<p>247 nm</p>
<p>DETERMINACION DE ACETAMINOFEN EN PLASMA POR CLAR.</p> <p>BARBARA ANEER, DAVID J. GREENBLATT, MARCIA DIVOLL D'ARHELL H. ABERNETHY and LEON SHARGEL. (15)</p> <p>J. of Chromatography 226, (1981)</p>	<p>15 µg de Std interno</p> <p>Evaporar 40-50°C presión reducida</p> <p>1 ml plasma + 5 ml Acetato de etilo</p> <p>Agitar vigorosamente 30 segundos. Centrifugar 10 minutos.</p> <p>fase orgánica.</p> <p>Evaporar 40-50°C presión reducida</p> <p>Reconstituir en 100 µcl MeOH.</p> <p>inyectar de 10-20 µcl</p>	<p>Columna uBondapak C₁₈ 8 mm (d-1) x 10 cm (1).</p>	<p>ACN/MeOH/ H₂O 6% 6% 88%</p>	<p>0.1-0.2 mcg/ml plasma</p>	<p>254 nm</p>
<p>DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE ACETAMINOFEN EN PLASMA.</p> <p>POFOS M. PLAKOGIANNIS and AHMED M. SAAD. (16)</p> <p>J. Pharm. Sciences, 66.604 (1977)</p>	<p>2 ml plasma + 4 ml HCl 4N</p> <p>Diluir c/H₂O destilada. Centrifugar a 5000 rpm.</p> <p>Extraer c/4 ml éter</p> <p>Extraer c/10 ml HCl 1N</p> <p>A 2 ml adicionar 5 ml de vainillina en 2-propanol al 5X</p> <p>Leer a 395 nm.</p>				<p>395 nm</p>
<p>DETERMINACION DE ACETAMINOFEN POR CLAR.</p> <p>HORWITZ R.A. Y COLABORADORES (17)</p> <p>Clin, Chem, 23, 1956 (1977).</p>	<p>0.5 ml plasma</p> <p>Extraer c/7 ml de éter difílico</p> <p>fase orgánica</p> <p>Evaporar</p> <p>Reconstituir en 200 µcl de fase móvil.</p> <p>inyectar 50 µcl.</p>	<p>Columna fenilo 3.9 mm (d-1) x 30 cm (1).</p>	<p>ACN/ KH₂PO₄ 0.1M pH 2.4 7% 93%</p>	<p>0.02 - 0.06 mcg/0.5 ml plasma</p>	

Tabla N° 3 Métodos analíticos para cuantificar acetaminofén en plasma.

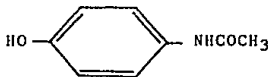
E. MONOGRAFIA

(18, 19, 20, 21, 22)

1. Nombres químicos y sinónimos

N-(4-hidroxifenil)acetamida, 4'-hidroxiacetanilida, p-hidroxiacetanilida, p-acetaminofenol, p-acetil aminofenol, N-acetil p-amino fenol, paracetamol.

2. Fórmula desarrollada



3. Fórmula condensada

C₈H₉NO₂

4. Peso molecular

151.16

5. Descripción

Polvo blanco cristalino, inodoro y de sabor amargo.

6. Espectro de absorción infrarrojo

En una dispersión sólida de KBr, el acetaminofén presenta los siguientes máximos: 1659 cm⁻¹ (C=O); 3326 cm⁻¹ (N-H); 3162 cm⁻¹ (OH).

7. Espectro de absorción ultravioleta

Presenta dos máximos de absorción en los siguientes disolventes.

Etanol	249	y	290	um.
Eter anhidro	247	y	283	um.
Agua	242	y	283	um.

8. Solubilidad

Temperatura °C	Solubilidad (mg/ml)	Disolvente
20	11.3	Agua
25	11.6	Agua
37	20.0	Agua
100	52.0	Agua
37	23.8	Solución reguladora pH 6
20	1 en 10	Etanol
20	1 en 10	Metanol
20	1 en 15	Acetona
20	1 en 10	Propilénglicol
20	1 en 50	Cloroformo
20	Insoluble	Benceno
20	Insoluble	Eter
20	Insoluble	Pentano
20	Insoluble	Eter de petróleo

9. Identificación

A: El espectro de absorción infrarrojo de acetaminofén en una dispersión de bromuro de potasio presenta máximos a las mismas longitudes de onda que una muestra de acetaminofén estándar de referencia.

B: El espectro de absorción ultravioleta de una solución 1:200000 de acetaminofén en una solución 1:100 de ácido clorhídrico 0.1 N en metanol, exhibe un máximo y un mínimo a las mismas longitudes de onda que una solución de referencia de acetaminofén.

C: A 10 ml de una solución 1:100 de acetaminofén, agregar una gota de cloruro férrico: se produce una coloración azul-violeta.

10. Intervalo de fusión

168 - 172°C

11. Constante de acidez y pH.

El acetaminofén es un ácido débil, cuyo valor de pKa se encuentra entre 9.0 y 9.5.

Una solución acuosa saturada tiene un pH entre 5.3 y 6.5 a 25°C.

12. Método analítico para cuantificar acetaminofén como materia prima.

A: Espectrofotométrico: debe contener no menos del 98% y no más del 101% de $C_8H_9NO_2$ calculado en base seca.

Se determina en solución acuosa a una concentración aproximada de 12 mcg/ml en celdas de 1 cm de espesor a una longitud de onda de 244 nm en un espectrofotómetro adecuado, usando agua como blanco.

13. Usos

Se emplea como analgésico y antipirético, es de uso alternativo para pacientes sensibles a la aspirina.

14. Estabilidad

El acetaminofén en solución es ligeramente sensible a la luz; en forma sólida y pura es muy estable a temperaturas superiores a los 45°C; es relativamente estable a la oxidación por efecto del aire.

15. Vías metabólicas

Existe una gran variabilidad inter individual en los porcentajes relativos de acetaminofén libre y sus conjugados glucurónidos y sulfatos, sin embargo, las proporciones se

encuentran en los siguientes rangos:

Acetaminofén inalterado	2.0	-	5.0	%
Glucurónido	55.0	-	75.0	%
Sulfato	20.0	-	40.0	%
Acetaminofén 3-cisteína	0.5	-	7.0	%
Acido acetaminofén-3-cisteína	5.0	-	7.0	%

En la Figura No. 8 se muestran las vías metabólicas de acetaminofén.

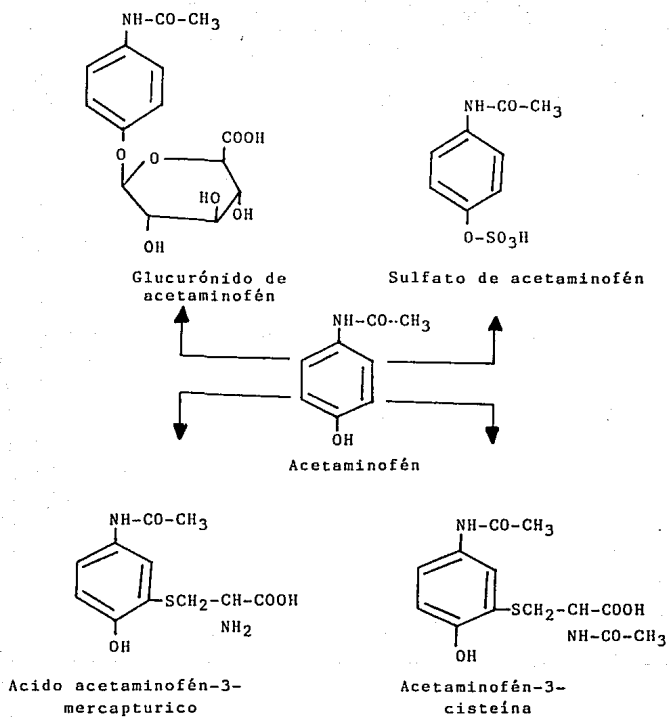


Figura No. 8

Rutas de biotransformación de acetaminofén.

16. Farmacocinética (21)

El acetaminofén se absorbe rápida y totalmente en el tracto gastrointestinal. La concentración plasmática máxima se alcanza entre 30 y 90 minutos después de la administración oral. El tiempo de vida media en plasma humano se encuentra entre 1.5 a 3 horas. Los metabolitos de mayor importancia son los conjugados glucurónidos y sulfatos. Son eliminados por la vía renal.

Se distribuye uniformemente en todo el organismo, se une a proteínas plasmáticas entre el 20 y el 50%.

17. Aspectos biofarmacéuticos

Se ha encontrado un incremento en la biodisponibilidad de acetaminofén cuando éste se mezcla con urea; por otro lado se observa un aumento en la disolución de acetaminofén - empleando alfa y betaciclodextrinas. Se ha comprobado que un elixir preparado con sorbitol aumenta las propiedades analgésicas y antipiréticas del activo. Del mismo modo, se han realizado formulaciones efervescentes con acetaminofén y se encontró que se obtienen mayores y más rápidas concentraciones en plasma que con otro tipo de formulaciones.

18. Interacción con otros fármacos (20)

El acetaminofén al ser formulado con aspirina, reacciona y da lugar al ácido salicílico y al diacetil-p-aminofenol. Al mezclarse con antipirina, irgapirina, irgafén, clorhidrato de difenhidramina, da lugar a complejos untuosos al tacto.

La salicilamida retarda la velocidad de excreción de los conjugados de acetaminofén, por una inhibición competitiva de la formación de conjugados de acetaminofén y salicilamida en la sangre, por lo cual, la concentración de acetaminofén se incrementa. Se ha demostrado que el acetaminofén y la antipirina inhiben mutuamente su metabolismo en ratas y conejos, también se ha visto que la penetración de éstos se inhibe en intestino de ratas. En humanos se ha observado que la antipirina prolonga la concentración plasmática de acetaminofén libre.

19. Toxicología

En las dosis terapéuticas recomendadas, es generalmente bien tolerado; sin embargo, pueden ocurrir ciertas reacciones - alérgicas, como erupciones cutáneas que pueden estar acompañadas de fiebre y lesiones en mucosas. El efecto secundario de más cuidado es la necrosis hepática potencialmente fatal que depende de la dosis, también puede haber necrosis

tubular renal y coma hipoglucémico, la hepatotoxicidad puede ocurrir al ingerir una dosis única de 10 a 15 g de acetaminofén (200-250 mg/kg de peso); una dosis de 25 g o más incrementa el riesgo.

20. Dosis

La dosis oral convencional para adultos es de 325 a 650 mg cada 4 horas en niños de 6 a 12 años, no debe exceder 2.6 g diarios; para los niños menores de 1 año la dosis única es de 60 a 120 mg según la edad y el peso; la dosis total diaria no debe exceder de 1.2 g.

MONOGRAFIA DE CLORHIDRATO DE BENZIDAMINA

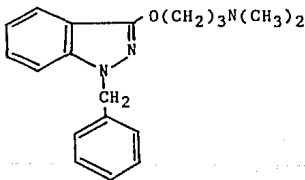
(22, 23, 24)

1. Nombres químicos y sinónimos

N,N-dimethyl-3-[[1-(phenylmethyl)-1H-indazol-3-yl]oxy]
-1-propanamine; 1-benzyl-3-[3-(dimethylamino)propoxy]
-1H-indazole; 1-benzyl-1H-indazol-3-yl 3-(dimethylamino)
propyl ether; benzindamine.

Benalgin, Tantum, Indolin, Tamas, Dorinamin.

2. Fórmula desarrollada



3. Fórmula condensada

$C_{19}H_{23}N_3O \cdot HCl$.

4. Peso molecular

345.86

5. Descripción

Polvo blanco cristalino inoloro.

6. Espectro de absorción ultravioleta

Una solución acuosa de clorhidrato de benzidamina, al 0.00123% presenta dos máximos de absorción a 306 nm y a 217 nm.

7. Solubilidad

Soluble en agua, alcohol y cloroformo.

8. Identificación

A: El espectro de absorción infrarrojo de clorhidrato de benzidamina en una dispersión de bromuro de potasio presenta máximos a las mismas longitudes de onda que una solución de referencia de clorhidrato de benzidamina.

B: A 1 ml de una solución al 1% de clorhidrato de benzidamina, agregar una gota de ácido nítrico; evaporar la mezcla a sequedad y humedecer con una gota de una solución alcohólica de hidróxido de potasio: Se produce una coloración naranja.

9. Intervalo de fusión

157 - 159°C.

10. pH

Una solución acuosa al 10% tiene un pH entre 4.0 y 5.5.

11. Método analítico para cuantificar clorhidrato de benzidamina como materia prima

Debe tener no menos del 98% y no más del 102% de $C_{19}H_{23}N_3O \cdot HCl$. calculado en base seca.

Se determina por método espectrofotométrico al U.V en una solución acuosa cuya concentración es aproximadamente 19.8 mg/ml en celdas de 1 cm de espesor a una longitud de onda de 306 nm. Usando agua como blanco.

12. Usos

Se emplea como antiinflamatorio, analgésico y antipirético.

13. Farmacocinética

La dosis oral de clorhidrato de benzidamina es absorbida en el tracto gastrointestinal. La concentración plasmática máxima se alcanza a las 2 horas después de la administración oral. El tiempo de vida media en plasma humano es aproximadamente de 13 horas. El 70% de la dosis es

eliminada inalterada por vía renal. Los metabolitos de mayor importancia son el N-óxido de benzidamina y los conjugados del ácido glucurónico con la 5-hidroxibenzidamina. Se une entre el 15 y el 20% a proteínas plasmáticas.

14. Toxicidad

Los diversos estudios de toxicidad realizados en distintos animales, permiten afirmar que la benzidamina no produce efectos tóxicos sistémicos.

La comparación de los efectos observados en ratas y ratones, demuestra que la vía parenteral resulta más tóxica que la vía oral (DL₅₀ en el ratón, 540 mg/kg vía oral y 107 mg/kg por vía parenteral), ocurriendo la muerte de los animales a las pocas horas de la administración del fármaco. Las dosis letales producen trastornos de la coordinación motora y convulsiones clónicas.

15. Dosis

La dosis oral recomendada para adultos es de 150 a 200 mg cada 24 horas. En niños la dosis oral es de 50 mg/kg de peso por día.

III. PARTE EXPERIMENTAL

La forma farmacéutica estudiada contiene como principios activos benzidamina y acetaminofén.

El objetivo de la combinación es incrementar la actividad analgésica del acetaminofén aprovechando las indicaciones terapéuticas de ambos y evitando la irritación estomacal causada por salicilatos.

O'Connell y Col. (13) utilizaron un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, en donde el tratamiento de la muestra comprende una desnaturalización de proteínas con una solución 0.3 N de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y una precipitación posterior de las mismas con una solución acuosa al 5% de ZnSO_4 . Este método fue probado sin tener éxito en cuanto a la purificación del plasma.

Por tal motivo se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución sencillo, rápido y confiable con el objeto de poder ser utilizado en estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia que incluyan acetaminofén en presencia de benzidamina.

La Figura No. 9 se muestra la secuencia de trabajo utilizada para el desarrollo del método de análisis cuantitativo de acetaminofén en plasma humano.

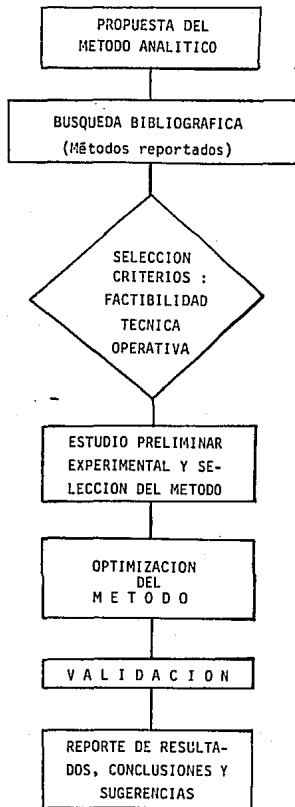


Figura No. 9

Diagrama de desarrollo del método analítico para cuantificar acetaminofén en plasma.

3.1.A. CUANTIFICACION DE ACETAMINOFEN EN PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Waters) con bomba de alta presión (Waters modelo 510, inyector automático "Wisp" modelo 712 (Waters), módulo de datos "Hewlett Packard" modelo 730, módulo z de compresión radial (Waters), cartucho "radial-pak uBondapak" C₁₈ de 8 mm de diámetro interno por 10 centímetros de longitud (Waters), precolumna "uBondapak C₁₈ (Waters)", detector de absorbancia U.V de longitud de onda variable "Kratos-Analytical" modelo 757, agitador mecánico (Lab. Line Inst.), microjeringa 100 mcl de capacidad (Hamilton).

Reactivos

Acetato de etilo R.A. (Baker), Metanol "Lichrosolv" (Merck), Metanol Absoluto R.A. (Baker), Acetonitrilo grado "HPLC" - (Fisher).

Solución de referencia de acetaminofén

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de acetaminofén estándar de referencia y transferir a un matraz volumétrico de 200 ml, disolver y llevar a volumen con metanol R.A. La concentración final es aproximadamente 250 mcg/ml (solución de referencia 1).

Tomar 2 ml de la solución de referencia 1, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con metanol R.A. La concentración final es aproximadamente 5 mcg/ml (Solución de referencia 2).

Preparación de la curva de calibración

A partir de las soluciones de referencia 1 y 2, preparar las soluciones de la curva de calibración en las proporciones exactas como la indica la siguiente tabla:

Solución No.	Solución de referencia 1	Solución de referencia 2	Aforo	Concentración (mcg/ml)
1	-	2.0 ml	10 ml	1.0
2	-	4.0 ml	10 ml	2.0
3	-	6.0 ml	10 ml	3.0
4	-	8.0 ml	10 ml	4.0
5	-	10.0 ml	10 ml	5.0
6	1 ml	-	25 ml	10.0

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra

Añadir a tubos con tapón de rosca de 10 ml: 1 ml de plasma y 5 ml de acetato de etilo R.A., agitar vigorosamente durante

1 minuto, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos; separar la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur y transferir a un tubo de ensayo; descartar la fase acuosa.

Colocar los tubos en un baño de agua a una temperatura entre 40 y 50°C, evaporar la fase orgánica a sequedad utilizando una corriente de aire, reconstituir el residuo con 500 mcl de metanol e inyectar 50 mcl en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución bajo las siguientes condiciones.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Velocidad de flujo	1.8 ml/min.
Presión	500 psi.
Sensibilidad	0.1 U.A.
Detector	U.V. a 254 nm.
Velocidad de carta	0.2 cm/min.
Atenuación	1.0
Tiempo de retención	8.44 min. aproximado
Temperatura	ambiente
Fase móvil	6% de acetonitrilo 3% de metanol 91% de agua destilada
Volumen de inyección	50 mcl.

CALCULOS:

Se construyeron curvas de calibración para determinar los - valores para intercepto y la pendiente, los cuales se utilizan para calcular la concentración de acetaminofén en mcg por ml de plasma con la siguiente fórmula:

$$\text{mcg acetaminofén/ ml plasma} = \frac{\text{Area de acetaminofén} - \text{Intercepto}}{(\text{Pendiente}) (\text{Volumen de plasma})}$$

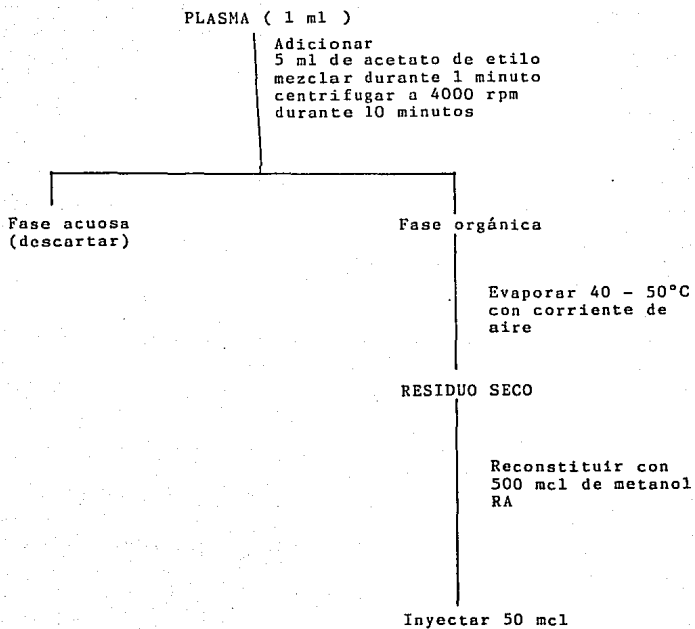


Figura No. 10

Diagrama general de tratamiento de muestras de plasma con acetaminofén.

3.2.B. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Para certificar la confiabilidad del método fue necesario realizar diversas pruebas y evaluar estadísticamente los resultados de acuerdo a los siguientes parámetros.

1. Linealidad del sistema

Se prepararon seis concentraciones diferentes de soluciones de referencia de acetaminofén: 0.0, 1.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0 mcg/ml, analizando por triplicado cada solución.

Los resultados se presentan en la Tabla No. 4 y en la Figura No. 11.

2. Linealidad del método

Se prepararon seis concentraciones diferentes de acetaminofén adicionado a plasma: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0 mcg/ml y se analizaron por duplicado cada muestra.

Los resultados se presentan en la Tabla No. 7 y en la Figura No. 13.

3. Límite de detección

Se analizaron seis concentraciones diferentes de acetaminofén: 0.0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 mcg/ml, inyectando

por triplicado cada concentración.

En las Tablas No. 5 y 8 se muestran los resultados y en las Figuras No. 12 y 14 la linealidad del sistema y del método respectivamente.

En la Figura No. 15 se muestra la recta de regresión de la cantidad mínima cuantificable para la determinación de acetaminofén en plasma humano por el método propuesto.

4. Precisión del método: repetibilidad día tras día

Se analizaron 10 muestras de acetaminofén en plasma en 4 días diferentes, utilizando la máxima concentración esperada (5 mcg/ml) e inyectando cada una por cuadruplicado.

Los resultados obtenidos se reportan en las Tablas No. 9 y 10.

5. Exactitud

Se analizaron 12 muestras de acetaminofén en plasma para cada una de las siguientes concentraciones 1.0, 2.0 y 5.0 mcg/ml. Inyectando por duplicado cada concentración.

En las Tablas No. 11 y 12 se presentan los resultados.

6. Especificidad

Se prepararon las siguientes muestras:

- a) Plasma libre de principio activo (blanco).
- b) Plasma adicionado de 5.0 mcg de acetaminofén.
- c) Plasma adicionado de 1.0 mcg de clorhidrato de benzidamina.
- d) Plasma conteniendo acetaminofén y clorhidrato de benzidamina obtenido a los 30 minutos después de la administración de la forma farmacéutica a un voluntario sano.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura No. 16 en los cuales se pueden observar que no existe interferencia alguna para la determinación de acetaminofén en plasma en las condiciones mencionadas anteriormente.

7. Estabilidad de acetaminofén en plasma

Para determinar la estabilidad de acetaminofén se analizaron muestras con una concentración de 5.0 mcg/ml mantenidas en refrigeración de acuerdo con el siguiente programa.

Tiempo	Condiciones
Inicial	- 5°C
1o. día	5°C
2o. día	5°C
7o. día	5°C

En las Tablas No. 13 y 14 se observan los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de acetaminofén en plasma.

3.3.C. RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Se hicieron determinaciones analíticas de acetaminofén siguiendo el método propuesto para calificar su operatividad.

3.3.C.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

A. Intervalo de concentraciones esperadas

Para evaluar la linealidad del sistema se utilizaron las concentraciones que aparecen en la Tabla No. 4.

mcg/ml de acetaminofén adicionados	Razón de áreas
1.01	141358.88
2.02	284000.00
3.03	432560.00
4.04	573843.33
5.05	726153.33
10.10	1494488.88

Tabla No. 4

Linealidad del sistema para cuantificar acetaminofén en metanol.

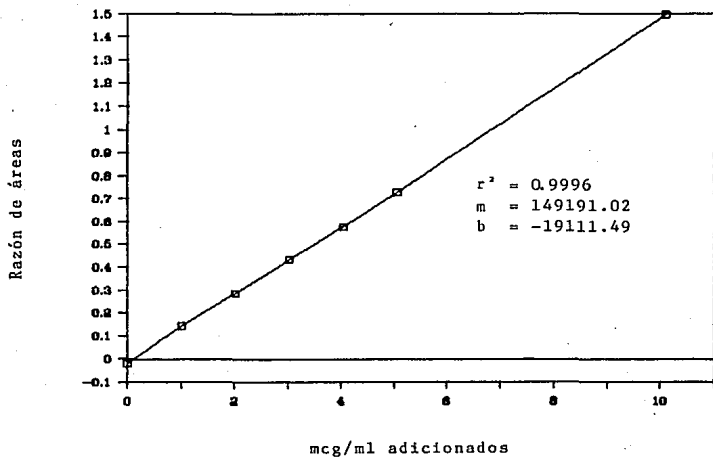


Figura No. 11

Gráfica que muestra la linealidad del sistema para cuantificar acetaminofén en metanol.

B. Nivel de concentraciones bajas para establecer la cantidad mínima cuantificable.

Para estimar la capacidad del sistema analítico para cuantificar acetaminofén en metanol a concentraciones bajas se utilizaron las siguientes concentraciones.

mcg/ml de acetaminofén adicionados	Razón de Áreas
0.202	29072.00
0.303	41001.22
0.404	54532.00
0.505	70268.00
0.606	83784.00
0.808	110228.88

Tabla No. 5

Linealidad del sistema a bajas concentraciones en metanol.

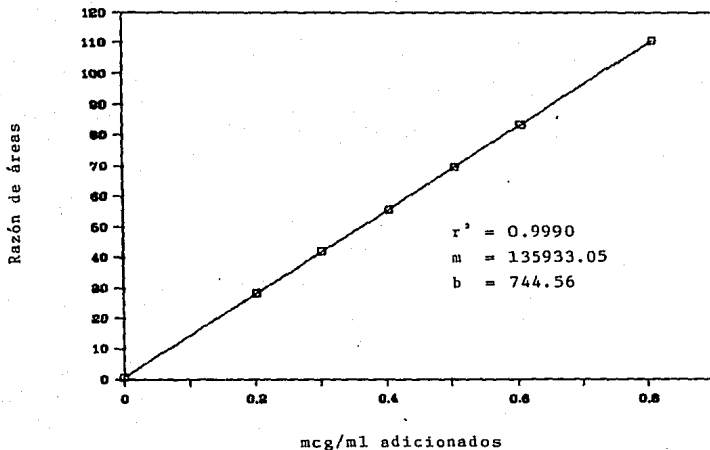


Figura No. 12

Gráfica que muestra la linealidad del sistema para cuantificar acetaminofén a bajas concentraciones en metanol.

Para evaluar la linealidad del sistema y método, existen criterios establecidos basados en la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2).

P A R A M E T R O	CRITERIOS DE ACEPTACION	
Pendiente	$m \approx$	1.00
Ordenada al origen	$b \approx$	0.00
Coeficiente de correlación	$r \geq$	0.99
Coeficiente de determinación	$r^2 \geq$	0.98

Tabla No. 6

Criterios de aceptación utilizados en la evaluación del sistema.

Discusión

Como se puede ver en los resultados obtenidos el sistema analítico es funcional para cuantificar acetaminofén en metanol dentro del intervalo de concentraciones esperado (1 a 10 mcg/ml).

Además permite cuantificar concentraciones bajas conservando - linealidad en el intervalo de 0.2 a 0.8 mcg/ml.

3.3.C.2. LINEALIDAD DEL METODO

A. Intervalo de concentraciones esperados

Para evaluar la linealidad del método se realizaron recorridos de acetaminofén presentes en placebos añadidos con diferentes cantidades de acetaminofén.

No. de muestras	mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	C.V.%
2	1.01	0.845	83.66	1.16
2	2.02	1.731	85.69	1.51
2	3.03	2.431	80.23	1.55
2	4.04	3.233	80.02	1.36
2	5.05	4.290	84.95	1.32
2	10.10	8.530	84.45	1.83

$$\bar{X} = 83.16 \quad 1.45$$

$$D.E = 2.45$$

$$C.V = 2.94$$

$$S y/x = 0.096$$

Tabla No. 7

Linealidad del método para cuantificar acetaminofén en plasma.

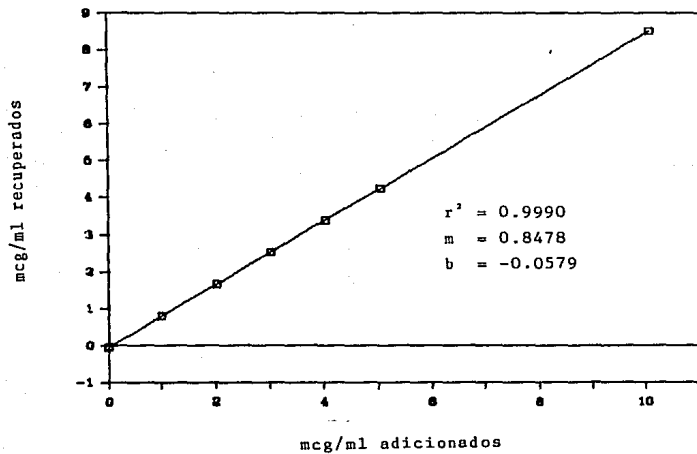


Figura No. 13

Gráfica que muestra la linealidad del método para cuantificar acetaminofén en plasma.

B. CONCENTRACIONES BAJAS

Para evaluar la linealidad del método a bajas concentraciones se analizaron muestras plasmáticas adicionadas de diferentes concentraciones de acetaminofén con el fin de establecer la mínima cantidad cuantificable. Los resultados se muestran en la Tabla No. 8.

No. de Muestra	mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	C.V.%
3	0.202	0.243	120.3	4.33
3	0.303	0.358	118.15	11.19
3	0.404	0.383	94.80	3.6
3	0.505	0.512	101.38	5.34
3	0.606	0.550	91.0	2.55
3	0.808	0.756	93.56	1.57

$$\bar{X} = 99.95\% \quad 4.92\%$$

$$D.E = 14.56$$

$$C.V = 14.57\%$$

$$S y/x = 0.027$$

Tabla No. 8

Linealidad del método para cuantificar acetaminofén en plasma a bajas concentraciones.

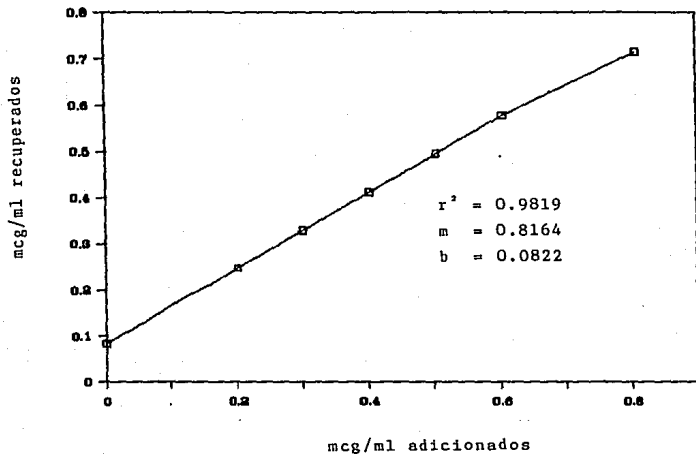


Figura No. 14

Gráfica que muestra la linealidad del método

a bajas concentraciones.

B.1 LIMITE DE DETECCION

Para determinar la cantidad mínima cuantificable se realizaron recobros de acetaminofén presentes en placebos añadidos con diferentes concentraciones de acetaminofén.

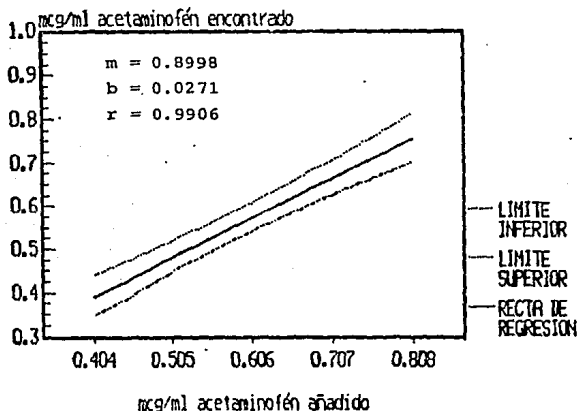


Figura No. 15

Recta de regresión del método analítico propuesto a bajas concentraciones mostrando las cinturas de confianza del 95%.

DISCUSION:

Como se puede ver en los resultados obtenidos en la linealidad del método:

El método analítico es funcional para cuantificar acetaminofén en plasma dentro del intervalo de concentraciones esperados (1 a 10 mcg/ml).

Además permite detectar concentraciones bajas conservando la linealidad del método en el intervalo de 0.2 a 0.8 mcg/ml.

3.3.C.3. PRECISION DEL METODO

A. Repetibilidad

Se analizaron muestras plasmáticas añadidas a una concentración de 5.0 mcg/ml de acuerdo al método analítico propuesto cuyos resultados se muestran en la Tabla No. 9.

No. de muestras analizadas	Día	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	C.V.%
4	1	4.43	88.6	0.84
4	1	4.29	85.8	1.79
4	1	4.32	86.4	0.69
4	1	4.30	86.0	1.50
4	1	4.00	80.0	1.38
4	1	4.11	82.2	0.17
4	1	4.35	87.0	0.94
4	1	4.29	85.8	1.40
4	1	4.27	85.4	0.15
4	1	4.04	80.8	1.97
4	2	4.14	82.8	2.64
4	2	4.25	85.0	1.90
4	2	4.26	85.2	1.70
4	2	3.95	79.0	0.28
4	2	3.95	79.0	1.45
4	2	4.27	85.4	1.43
4	2	4.17	83.4	1.52
4	2	4.27	85.4	2.06
4	2	4.26	85.2	1.31
4	2	3.82	76.4	1.06

Tabla No. 9

Precisión del método por CLAR para cuantificar acetaminofén en plasma tratando muestras añadidas a una concentración de 5 mcg/ml c/u.

No. de muestras analizadas	Día	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	C.V.%
4	3	4.09	81.8	1.89
4	3	4.08	81.6	1.40
4	3	4.17	83.4	1.22
4	3	4.09	81.8	1.54
4	3	4.18	83.6	0.79
4	3	3.88	77.6	1.35
4	3	4.13	82.6	1.65
4	3	4.11	82.2	1.10
4	3	4.10	82.0	0.23
4	3	3.96	79.2	0.46
4	4	3.83	76.6	0.46
4	4	4.12	82.4	1.77
4	4	4.22	84.4	2.30
4	4	4.28	85.6	2.24
4	4	3.86	77.2	0.89
4	4	4.02	80.4	1.60
4	4	4.12	82.4	3.02
4	4	4.55	91.0	1.02
4	4	4.16	83.2	0.21
4	4	4.15	83.0	1.78

Continuación de la Tabla No. 9.

Día	mcg/ml de Acetaminofén Adicionados	Número de Muestras	% Recuperado	C.V.%
1	5.0	10	84.80	1.08
2	5.0	10	82.68	1.54
3	5.0	10	81.58	1.16
4	5.0	10	82.62	1.53
Total	5.0	40	82.92	1.33

Tabla No. 10

Tabla acumulativa de datos de la repetibilidad día tras día del método.

Para evaluar la reproducibilidad en días diferentes se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza (ANAEVA). Según el siguiente modelo.

$$Y_{ij} = \mu + D_i + E_j(i)$$

donde: Y_{ij} = porcentaje de recuperación

μ = valor medio de las observaciones

D = efecto del día

E = error experimental

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrática	F calculada
D_i	4 - 1	20652.808	6884.269	0.9999
$E_j(i)$	4(10)-4	247833.80	6884.27	≈ 1.0
Total	4(10)-1	268486.608		

Comparando: $F_{calculada} < F_{3,36}^{0.05}$ tablas
 $1.0 < 2.87$

Siendo $F_{calculada} < F_{tablas}$ por lo tanto el método es repetible día tras día.

B. REPETIBILIDAD

Se analizaron 10 muestras independientes para evaluar la repetibilidad del método analítico en el mismo día mediante un estadígrafo de contraste χ^2 (ji-cuadrado).

$$n = 10$$

$$\bar{X} = 84.8$$

$$s = 2.8174$$

$$s^2 = 7.94$$

$$\alpha = 0.05 \text{ (nivel de significancia)}$$

Hipótesis de contraste

$$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2 = (3)^2$$

$$H_1: \sigma^2 > \sigma_0^2$$

$$\chi^2_{0.95} = 16.92$$

$$\chi^2_{\text{calc}} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2} = 7.94$$

$$\begin{aligned} \text{Comparando: } \chi^2_{\text{calc.}} &< \chi^2_{\text{tabl.}} \\ 7.94 &< 16.92 \end{aligned}$$

$$\text{Intervalo de confianza: } I.C_{0.95} = 1.94 < \sigma < 5.14$$

Discusión: Siendo $\chi^2_{\text{calc.}} = 7.94 < \chi^2_{\text{tabl.}} = 16.92$ se acepta H_0 y por lo tanto el método es repetible en el mismo día.

3.3.C.4. EXACTITUD

Para evaluar los resultados obtenidos en exactitud se realizaron 12 determinaciones de cada una de las 3 concentraciones 1, 2 y 5 mcg los resultados se muestran en la Tabla No. 11.

No. de Muestras	mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado
2	1.01	0.7816	78.16
2	1.01	0.7936	79.36
2	1.01	0.8057	80.57
2	1.01	0.8320	83.20
2	1.01	0.8026	80.26
2	1.01	0.8057	80.57
2	1.01	0.8505	85.05
2	1.01	0.8627	86.27
2	1.01	0.8545	85.45
2	1.01	0.8636	86.36
2	1.01	0.8526	85.26
2	1.01	0.8500	85.00

\bar{X} = 0.83 83.00

D.E = 0.03

C.V = 3.55%

Tabla No. 11

Exactitud del método.

No. de Muestras	mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado
2	2.02	1.6720	83.60
2	2.02	1.6684	83.42
2	2.02	1.6200	81.00
2	2.02	1.6850	84.25
2	2.02	1.7410	87.05
2	2.02	1.6480	82.40
2	2.02	1.5600	78.57
2	2.02	1.5920	79.60
2	2.02	1.5842	79.21
2	2.02	1.6108	80.54
2	2.02	1.6540	82.70
2	2.02	1.7410	87.05

\bar{X} = 1.65 82.45

D.E = 0.05

C.V = 3.41%

Continuación de la Tabla No. 11.

No. de Muestras	mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado
2	5.05	3.9775	79.89
2	5.05	4.1200	82.40
2	5.05	4.0750	81.50
2	5.05	4.4440	88.88
2	5.05	4.3200	86.40
2	5.05	4.4400	88.80
2	5.05	4.2200	84.80
2	5.05	4.3500	87.00
2	5.05	4.3200	86.40
2	5.05	4.3700	87.37
2	5.05	4.2400	84.80
2	5.05	4.2300	84.60

$$\bar{X} = 4.26 \quad 85.20$$

$$D.E = 0.14$$

$$C.V = 3.40$$

Continuación de la Tabla No. 11.

mcg/ml de acetam inofén adicionados	Número de muestras	% Recuperado promedio	% C.V.
1.0	12	83.00	3.55
2.0	12	82.45	3.41
5.0	12	85.20	3.40
Total	36	83.55	3.45

Tabla No. 12

Tabla acumulativa de datos de la exactitud del método.

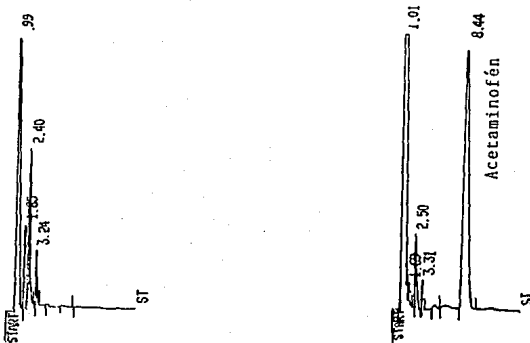
Discusión:

Como se puede ver en los resultados obtenidos en exactitud del método no es necesario efectuar un análisis estadístico para determinar la exactitud del método.

Lo que sí se puede es determinar la constancia del porcentaje recuperado a través de los diferentes niveles de concentración.

3.3.C.5. ESPECIFICIDAD

Con el propósito de demostrar que no hay interferencias para la cuantificación de acetaminofén en plasma se analizaron las siguientes muestras con el método desarrollado.

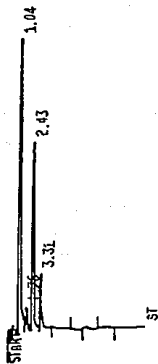


a) Blanco (plasma libre de principio activo)

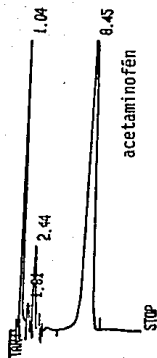
b) Plasma + 5 mcg de acetaminofén.

Figura No. 16

Cromatogramas obtenidos en la prueba de especificidad del método.



c) Plasma + 1 mcg de clorhidrato de benzidamina.



d) Plasma + acetaminofén y clorhidrato de benzidamina obtenida a los 30 minutos después de la administración de la tableta a un voluntario sano.

Continuación de la Figura No. 16

3.3.C.6. ESTABILIDAD

Considerando que las muestras biológicas no son analizadas inmediatamente después de haberse tomado, se analizaron muestras de plasma adicionado con una concentración de 5.0 mcg de acetaminofén.

mcg/ml de acetaminofén adicionados	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado	mcg/ml de acetaminofén recuperados	% recuperado
	Inicial		Día 1 (5°C)		Día 2 (5°C)		Día 7 (5°C)	
5	4.43	88.60	4.28	87.6	3.77	75.4	2.83	56.60
5	4.48	89.60	4.30	86.0	3.90	78.0	3.04	60.86
5	4.41	88.20	4.53	90.6	3.97	79.4	2.94	58.80
5	4.31	86.20	4.03	80.6	3.58	71.56	2.96	59.20
5	4.36	87.20	4.04	80.8	3.67	73.40	3.05	61.00
5	4.31	86.20	4.03	80.7	3.68	73.60	3.12	62.40
5	4.28	85.20	4.07	81.4	3.85	77.00	3.39	67.80
5	4.25	85.00	4.06	81.2	3.90	78.00	3.09	61.80
5	4.37	87.40	4.20	84.0	3.87	77.50	2.34	58.80
	$\bar{X} = 87.0$		$\bar{X} = 83.65$		$\bar{X} = 75.98$		$\bar{X} = 60.80$	
	D.E = 1.56		D.E = 3.65		D.E = 2.63		D.E = 3.18	
	C.V = 1.79%		C.V = 4.36%		C.V = 3.46%		C.V = 5.22%	

Tabla No. 13

Tabla que muestra los resultados obtenidos en la estabilidad de acetaminofén en plasma.

	Inicial	24 hrs. 5°C	72 hrs. 5°C	168 hrs. 5°C
\bar{X}	87.0 %	83.65 %	75.98 %	60.80 %
D.E.	1.56	3.65	2.63	3.18
C.V.	1.79%	4.36	3.46 %	5.23 %

Tabla No. 14

Tabla acumulada de los resultados obtenidos en la estabilidad de acetaminofén en plasma.

Discusión:

Como se puede observar en los resultados obtenidos acetaminofén no es estable en plasma descongelado por más de 24 hrs., por lo que se recomienda que las muestras plasmáticas siendo descongeladas deben ser extraídas y evaporadas a la brevedad posible.

Se recomienda que este estudio de estabilidad se realice con muestras congeladas en un periodo mayor de tiempo que permita evaluar un tiempo confiable de almacenamiento.

V. CONCLUSIONES

Se implantó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución y demostró ser confiable, sencillo y rápido, ya que reúne las siguientes características:

- 1) Linealidad: El método analítico desarrollado para cuantificar acetaminofén en plasma demostró ser lineal en el intervalo de concentraciones de 0.4 a 10 mcg/ml de plasma, - se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9993.
- 2) La repetibilidad del método en el mismo día y en días diferentes no presenta diferencias significativas, dado que la variación no sobrepasó el 3% contrastado a partir del estadístico de prueba χ^2 (ji-cuadrado), sin embargo, se recomienda realizar una curva estándar cada vez que se analicen muestras.
- 3) La evaluación de la pendiente de la recta de regresión lineal indica que sólo el 84.25% en promedio se está recuperando. Por lo que el método no es exacto ya que no se obtuvo el 100% de rendimiento en la extracción de acetaminofén en plasma, sin embargo, es adecuado para estudios de biodisponibilidad y farmacocinética, ya que es lineal y preciso en el intervalo que va de 1 a 10 mcg/ml que es el

que comprende las concentraciones plasmáticas esperadas.

- 4) La cantidad mínima cuantificable se estima en 0.4 mcg/ml de plasma.
- 5) Estabilidad. Las muestras de acetaminofén descongeladas demostraron no ser estables en plasma por más de 24 hrs. Se recomienda un estudio de estabilidad por un período de tiempo que comprendan de 2 ó 3 meses de muestras en congelación.
- 6) Especificidad. No se detectó ninguna sustancia que interfiriera en la cuantificación de acetaminofén en plasma.

Recomendaciones

- Implantar el método analítico buscando un estándar interno.
- Completar el estudio desarrollando un método analítico para determinar clorhidrato de benzidamina en plasma, en presencia de acetaminofén.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. J.C. Dick, "Analytical Chemistry", International Student Edition, Mc Graw-Hill, Inc, Kogakucha, Ltd. (1973).
2. J.J. Kirkland, "Modern Practice of Liquid Chromatography", Wiley-Interscience, New York (1979).
3. A. Pryde, M.T. Gilbert, "Applications of High Performance Liquid Chromatography", John Wiley & Sons, New York (1973).
4. "GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents Part 2" Kiyoshi Tsuji, Marcel Dekker, New York (1978).
5. Stevenson, R. and Johnson, B.L.: Basic Liquid Chromatography, Varian Associates, U.S.A., (1978).
6. Varian, "Basic Liquid Chromatography", Varian Aerograph, New York (1971).
7. Hamilton, Sowell, "Introduction to High Performance Liquid Chromatography", Chapman and Hall, London (1977).
8. "Curso Teórico Práctico de Espectroscopia y Validación de Técnicas Analíticas", AFM, México (1981).

9. M.A. Brooks, R.E. Weinfeld.
A Validation Process for Data from the Analysis of Drugs
in Biological Fluids. Drug Development and Industrial
Pharmacy, 11 (9 & 10), 1703-1728 (1985).
10. C.R. García, A. López A. Aspectos Básicos de Farmacociné-
tica Biodisponibilidad, Revista mexicana de ciencias far-
macéuticas vol. 12 No. 1, (1980).
11. Garzón A. Aspectos Prácticos de Biofarmacia Farnetrix,
México, (1977).
12. Introducción a la Farmacocinética, Edición Cid Camaró.
Sria. General de la OEA, Programa Regional de Desarrollo
Científico y Tecnológico, Washington D.C. (1982).
13. S.E. O'Connell, F.J. Zurzola, A. Rapid Quantitative Deter-
mination of Acetaminophen in Plasma J. Pharm, Sci. 71,11
(1982).
14. L.T. Wong, G. Solomonraj, B.H. Thomas High-Pressure Liquid
Chromatographic Determination of Acetaminophen in Biologi-
cal Fluids. J. Pharm, Sci. 65,7 (1976).

15. B. Ameer, D.J. Greenblatt, M. Divoll, D.R. Abernethy, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Acetaminophen in Plasma. J. Chromatography, 226 (1981).
16. P.M. Plakogiannis, A.M. Saad, Quantitative Determination of Acetaminophen in Plasma. J. Pharm, Sci. 67.4 (1978).
17. R.A. Horwitz, High-Pressure-Liquid Chromatography Determination of Acetaminophen in Plasma. Clin, Chem. 23, 1596 (1977).
18. Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, Ninth Edition Published by Merck & Co. Inc. U.S.A. (1976).
19. "The United States Pharmacopeia XXI" 21st. Revision (1985).
20. Florey Klaus, "Analytical Profiles of Drug Substances", "Academic Press", U.S.A. (1974).
21. Goodman, S.L., Gilman, A. "The Pharmacological Basis of Therapeutics" 6th Ed. Macmillan Publishing Co., Inc. U.S.A. (1980).

22. Martindale, "The Extra Pharmacopeia", 27th, Edition, Pharmaceutical Press, London (1978).
23. Chasseaud L.F., Catanase B. Pharmacokinetics of Benzylamine Int. J. Tiss. Reac. VII (3) 195-204 (1985).
24. B y C Köppel and J. Teczner Metabolism of Benzydamine Drug Res. 35 (I), Nr. 3 (1985).