

51
Zey



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

FALLA DE ORIGEN

**Desarrollo y Validación de Metodología Analítica
para la Cuantificación de Propafenona en Plasma**

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

Ma. Guillermina Munive Aragón



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Andrés Navarrete Castro
Vocal	Q.F.B. Ma. Elena Girard Cuesy
Secretario	Biologa Maricela Arteaga Mejia
Suplente	Q.F.B. Leticia Cruz Antonio
Suplente	Q.F.B. Irma Alejandre Razo

Lugar en donde se desarrollo el tema:

**Unidad de Control Técnico de Insumos del Instituto Mexicano del Seguro Social
Laboratorio de Formas Sólidas Orales e Investigación.**

Director de tesis: Q.F.B. Ma. Elena Girard Cuesy.

Asesor Técnico: Q.F.B. Francisco León Urrea.

Asesor interno: M. en C. Andrés Navarrete Castro.

Gracias por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación porque con su apoyo y aliento hoy he logrado uno de mis anhelos con amor y agradecimiento. Para mis padres: Quintila y Pedro

Existen diferentes sentimientos y caminos para llegar a la felicidad y siempre hay alguien que nos alientan a no caer, gracias por compartirlos conmigo con amor para Gregorio.

Con especial gratitud y reconocimiento a:

Mis asesores y maestros.

A las autoridades y personal de la Unidad de Control Técnico de insumos del Instituto Mexicano del Seguro Social; en especial al personal del Laboratorio de Formas Sólidas Orales e Investigación.

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	
2.1 MONOGRAFIA DE PROFAFENONA	3
2.2 CROMATOGRAFIA	11
2.3 VALIDACION	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. OBJETIVOS	29
5. HIPOTESIS	29
6. MATERIAL Y METODO	
6.1 APARATOS Y REACTIVOS	30
6.2 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	31
6.3 METODO DE EXTRACCION	32
6.4 PREPARACION DE SOLUCIONES	33
6.5 VALIDACION DEL METODO	35
6.6 APLICACION DEL METODO	38
7. RESULTADOS	
7.1 DESARROLLO DEL METODO	39
7.2 VALIDACION DEL METODO	50
7.3 APLICACION DEL METODO	60

8. ANALISIS DE RESULTADOS	64
9. CONCLUSIONES	69
10. BIBLIOGRAFIA	70
11. APENDICE	
11.1 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS	74
11.2 PARAMETROS DE VALIDACION	77

RESUMEN

La propafenona es un agente antiarrítmico nuevo recientemente introducido en la práctica clínica. Posee diversas ventajas sobre los antiarrítmicos actualmente disponibles para el tratamiento de las afecciones cardíacas. En la mayoría de los pacientes no deprime la función ventricular izquierda, la incidencia de efectos proarrítmicos son comparables o menores que la mayoría de los otros agentes antiarrítmicos. La propafenona tiene desventajas importantes como son: su farmacocinética es dosis dependiente, una vida plasmática de eliminación corta, la formación de metabolitos activos, en donde la velocidad y formación depende de las características oxidativas del paciente. La propafenona se ha incluido recientemente en el cuadro básico de medicamentos del sector salud y debido a las ventajas que posee sobre otros antiarrítmicos es necesario contar con un método analítico que permita cuantificar la propafenona y sus metabolitos en plasma. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método por cromatografía líquida de alta resolución que permita cuantificar la propafenona y sus metabolitos en plasma de seres humanos. El método desarrollado es lineal, exacto, preciso y reproducible, presentando una especificidad para la propafenona y sus metabolitos en plasma. Así el método desarrollado puede ser empleado para investigaciones biofarmacéuticas.

I. INTRODUCCION

El desarrollo de nuevos métodos analíticos para cuantificar con precisión y exactitud los fármacos en fluidos biológicos, permite establecer las condiciones adecuadas para evaluar su comportamiento farmacocinético en dichos fluidos.

En la actualidad el empleo de nuevas técnicas y el uso de equipo sofisticado ha permitido que los análisis se realicen en períodos cortos y el manejo de muestras sea rápido (1).

Los métodos de análisis reportados en la literatura para cuantificar propafenona en plasma son: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y Cromatografía de Gases (CG). Las técnicas de CLAR (2-8) requieren de grandes volúmenes de muestra (1-5 ml) y de inyección, con límite de detección de 5 -20 ng/ml. En 1984 Brode y colaboradores (9) publicaron un método por CLAR para la determinación de propafenona y 5-OH propafenona, con detección por fluorescencia con un límite de cuantificación para propafenona de 1 ng en 1 ml de plasma humano, este método requiere de la derivación con dansilhidrazina y la purificación del producto reactivo, un procedimiento que consume tiempo e incrementa la variabilidad. Kates y colaboradores en 1985 (10) reportaron un método para la cuantificación en plasma de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona, en el cual los tiempos de elución fueron hasta de 48 minutos. Otros autores utilizan métodos de CLAR con detección por espectrometría de masas (11). Los métodos por cromatografía de gases, usando tecnología de columna empacada, muestran más sensibilidad que los métodos por CLAR y permite la determinación de 10 ng/ml de fármaco, con el uso de columnas capilares para mejorar la separación y simetría de los picos, la eficacia y sensibilidad de las técnicas de cromatografía de gases se incrementa significativamente cuando se combina con la aplicación de técnicas de inyección. Otras técnicas de CG utilizan la detección por captura de electrones (12-14).

Debido a la gran variedad de métodos que se emplean para la cuantificación de propafenona, con resultados poco reproducibles, técnicas de extracción laboriosas y

grandes tiempos de elución, es necesario el desarrollo de un método rápido y sencillo por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que permita obtener resultados confiables y reproducibles en el laboratorio, para poder realizar trabajos de investigación biofarmacéutica.

2. GENERALIDADES

2.1 Monografía de Propafenona

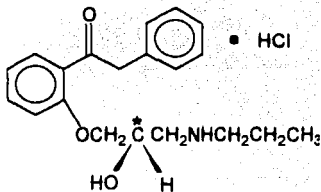
Nombre químico: Clorhidrato del 1-[2-[2-hidroxi-3-(propilamino)-propoxy]fenil]-3-fenil-1-propanona (15).

Nombre genérico: Propafenona (16).

Nombres comerciales: - Nistaken (17)
- Norfenon (17)
- Kenona (17)

Fórmula condensada: $C_{21}H_{28}ClNO_3$ (15)

Fórmula desarrollada: (15)



Peso molecular: 377.92 g/mol (15).

Propiedades Fisicoquímicas

Descripción: Cristales finos de color blanco, con ligero sabor amargo (15).

Punto de fusión: 172 - 174 °C (15).

Solubilidad: La solubilidad en varios disolventes se muestra en la tabla I (15).

Tabla I. Solubilidad de propafenona

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD
Acetona	prácticamente insoluble
Cloroformo	ligeramente soluble
Dimetilsulfóxido	soluble
Etanol	ligeramente soluble
Isopropanol	muy ligeramente soluble
Metanol	escasamente soluble
Agua (20°C)	ligeramente soluble

Propiedades espectroscópicas

En el espectro de absorción ultravioleta en metanol, la propafenona presenta dos bandas a 246 nm y 301 nm (15).

PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Antecedentes Históricos.

La propafenona es un agente antiarrítmico nuevo recientemente introducido en la práctica clínica. Su eficacia fué demostrada en la supresión de arritmias ventriculares y supraventriculares (18,19). Contiene en su molécula la estructura fenoxipropanolamina común a los β - adrenérgicos (20,21). En estudios *in vivo* e *in vivo* de el isoproterenol, que inducen efectos cronotrópicos e inotrópicos, indican que la potencia β - bloqueadora de la propafenona es 1/20 a 1/80 del propanolol sobre base molar. Las concentraciones de propafenona en plasma durante tratamientos de periodos largos puede ser 50 o más veces más alto que la del propanolol, esta propiedad bloqueadora puede ser de importancia clínica (22).

Mecanismo de Acción.

La propafenona es un agente antiarrítmico con propiedades de bloqueo débil tanto de los canales de calcio como de los receptores β - adrenérgicos (20,22,23). La propafenona deprime las funciones del nodo sinodal, del nodo atrioventricular del sistema HisPurkinje y de los sistemas intra-arteriales. La propafenona también incrementa el periodo refractario atrial y ventricular, y disminuye la velocidad de conducción. Otros efectos hemodinámicos incluyen disminución de la frecuencia cardiaca, depresión y un efecto inotrópico negativo moderado (20,22).

Usos Terapéuticos.

La propafenona puede ser utilizada en el tratamiento de taquicardias, estrasistolos ventriculares y supraventriculares, la Propafenona también puede prevenir arritmias recurrentes asociadas con el síndrome de Wolff-Parkinson (17,20,22,24).

Dosis

La propafenona puede administrarse por vía oral, el tratamiento deberá individualizarse dependiendo de la respuesta y tolerancia del paciente. Iniciando con 150 mg de propafenona cada 8 horas (450 mg al día) la dosis puede incrementarse a un mínimo de 3 ó 4 intervalos diarios de 225 mg cada 8 horas (675 mg al día) y si es necesario a 300 mg cada 8 horas (900 mg al día). En pacientes de edad avanzada o daño del miocardio severo la propafenona debe ser administrada en dosis paulatinamente crecientes (17,20,22,24).

Reacciones Adversas

Con la administración de propafenona, en casos aislados, sobre todo con dosificaciones muy elevadas, pueden presentarse trastornos gastrointestinales, como inapetencia, sensación de plenitud, náuseas, sabor amargo, en algunos casos visión borrosa y mareo. Estos síntomas desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento (17,20,22,24).

Contraindicaciones

La propafenona está contraindicada en insuficiencia cardíaca manifiesta, shock cardiogénico (excepto cuando su causa sea la arritmia); bradicardia severa. Trastornos preexistentes de alto grado de la conducción sinoauricular, auriculoventricular e intraventricular. Síndrome del nódulo sinusal (síndrome bradicárdico-taquicárdico). Trastornos manifiestos del metabolismo electrolítico; enfermedades pulmonares obstructivas graves; hipotensión marcada. La propafenona está contraindicada en los tres primeros meses del embarazo y en el periodo de lactancia (17,20,24).

Intoxicación

En el supuesto caso de ingestión accidental de la propafenona debe provocarse el vómito y consultar al médico.

Los síntomas de sobredosis son usualmente más severos después de 3 horas de ingestión y puede incluir hipotensión, somnolencia, bradicardia, disturbios en la

conducción intraarterial e intraventricular, raramente convulsiones y un alto grado de arritmia ventricular. La desfibrilación, así como una infusión de dopamina e isoproterenol ha sido efectiva en el control del ritmo y la presión sanguínea. Las convulsiones han sido tratadas con diazepam. Pueden ser necesarias medidas generales de soporte como respirador mecánico y masaje externo cardíaco (17,20,24).

Interacciones

La propafenona incrementa la concentración en plasma de Digoxina en sujetos sanos y en pacientes (22,23,24). La propafenona no debe administrarse con betabloqueadores, ni con anestésicos locales, ya que puede tener un efecto aditivo de reducción de la frecuencia cardíaca y/o contractilidad (17,20).

ASPECTOS FARMACOCINETICOS

Absorción.

La absorción de la propafenona después de la administración oral es rápida y completa (> 95%), alcanzando su pico máximo en un lapso de 2 a 3 horas, su biodisponibilidad es dependiente de la dosis (26) y oscila desde 2.2 % hasta 50% (17,20,23,24) y presenta un incremento no lineal en la concentración plasmática al aumentar la dosis, indicando una saturación de la isoenzima citocromo P-450. El rango de los niveles terapéuticos oscila de 0.5 a 3 µg/ml. La unión a proteínas plasmáticas varía de 77 % a 95 %, la vida media plasmática de la propafenona es de 2 a 8 horas, con un amplio rango de 1.8 a 32.3 horas (20,22).

Distribución

En el estado estacionario el volumen de distribución de la propafenona es de 2.5 a 4.0 L/kg, más del 95% se une a proteínas (22,24). In vitro la unión a proteínas plasmáticas de propafenona en voluntarios sanos es dependiente de la concentración declinando

rápidamente a concentraciones cerca de 1.5 mg/L. La fracción libre de fármaco fluctuó en el rango de 2.7 a 18.7 % en concentraciones de 0.25 a 100 mg/L y en promedio de 4.1 % en concentraciones de 0.5 a 2 mg/L . En suero de pacientes con uremia, las concentraciones de propafenona libre fueron alrededor del 50% por debajo de las observadas en voluntarios sanos, y correlacionadas con los niveles de β - acidogliproteínas (25). La distribución de propafenona fue caracterizada como rápida, con concentraciones altas encontradas en pulmón, hígado y corazón, subsecuentemente concentraciones altas de 5-OH propafenona fueron encontradas en tejido atrial derecho que en plasma. La propafenona y el metabolito 5-OH propafenona son distribuidos hacia el feto durante el embarazo y son excretados en la leche materna, se administraron 900 mg/día de propafenona a dos pacientes en la 19 y 24 a 25 semana de embarazo respectivamente, ambas experimentaron arritmias ventriculares. Al nacimiento la relación entre la concentración de sangre de la placenta y la concentración en plasma materno fueron de 0.14 a 0.3 para propafenona y 0.42 a 0.50 para 5-OH propafenona. La relación de concentración en leche, y la concentración plasmática materna tres días después del parto fue 0.15 y 0.55 para propafenona y 5-OH propafenona respectivamente (26).

Biotransformación

La propafenona sufre un extenso metabolismo hepático de primer paso, y menos del 1 % se excreta sin cambio en la orina. Cerca del 90% de los pacientes, metaboliza rápida y extensamente a dos metabolitos activos (17,20,22), el 5-OH propafenona y el N-depropilpropafenona (figura 1). Los cuales tienen actividad antiarrítmica comparable con la propafenona, pero están presentes en concentraciones menores del 20% de la concentración de la propafenona (23). Los principales factores que pueden influir en la farmacocinética de la propafenona están relacionados con la saturación del metabolismo hepático y con las características oxidativas determinadas genéticamente de los pacientes (17,20,22), con la presencia de enfermedades hepáticas, o en personas de edad avanzada.

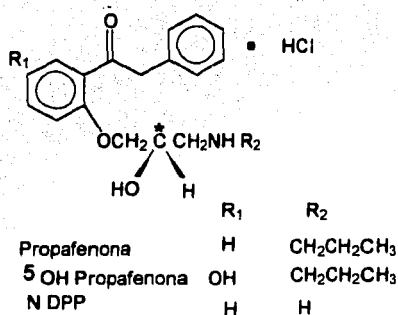


Figura 1. Metabolitos de la Propafenona.

Eliminación

La propafenona se elimina casi exclusivamente en forma metabolizada, por la bilis y las heces (57% de la dosis), así como por vía renal (18-38% de la dosis) (17,20,22), con una depuración de 11 ml/min/kg (24). Menos del 1% de la dosis original se excreta sin cambio (24). La eliminación de la dosis de propafenona es casi completa, dos días después de finalizado el tratamiento (17).

Presentación Farmacéutica

Tabletas de 150 y 300 mg (17,23).

En el cuadro básico de medicamentos del Sector Salud la clave 537 corresponde a las tabletas de 150 mg de propafenona (16).

2.2 CROMATOGRAFIA

Definición

La cromatografía es un método de separación que se basa en la distribución diferencial de una mezcla entre dos fases, como resultado de adsorciones y desorciones repetidas durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario (27,28).

Existen diferentes clasificaciones de los métodos cromatográficos; una de ellas es la que se basa en el tipo de fase móvil utilizada y de acuerdo a esto, se tienen dos tipos generales de cromatografía: la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos (CL). En la primera se utilizan gases como fase móvil y en la segunda se utilizan líquidos.

La cromatografía de gases (CG) se caracteriza por ser mucho más rápida y eficiente. Sin embargo, muchas sustancias no se pueden tratar por cromatografía de gases, ya sea porque no son lo suficientemente volátiles y no pueden ser transportadas por el gas acarreador o porque son térmicamente inestables y se descomponen bajo las condiciones de separación. La cromatografía de líquidos (CL) no está limitada por la volatilidad de la muestra ni por su estabilidad térmica, por lo que resulta idónea para la separación de macromoléculas y especies de interés biomédico, productos de naturaleza lábil y una amplia variedad de otros compuestos de alto peso molecular y/o menos estables entre los que se encuentran: proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, pigmentos de plantas, lípidos polares, algunos fármacos, esteroides, vitaminas, antioxidantes, etc. (28,29).

CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA. (30,31,32)

La cromatografía en columna se clasifica según el tipo de interacción existen entre los solutos a separar y el lecho cromatográfico en:

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.

La fase estacionaria es un adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas, la separación se basa en etapas repetidas de adsorción y desorción. El grado de separación depende de la superficie activa del sólido y del tamaño de partícula.

CROMATOGRAFIA DE PARTICION.

La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, la fase móvil es un gas o un líquido; la fase estacionaria esta saturada por la fase móvil y viceversa. La separación se realiza por partición entre la fase móvil y estacionaria, debido a la diferencia de afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es a su diferencias en sus coeficientes de reparto.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION.

La columna se rellena con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. Si el material estacionario es un gel reticulado se le denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel. La separación se realiza por la diferencia de pesos moleculares.

CLASIFICACION SEGUN LA POLARIDAD RELATIVA DE LAS DOS FASES

CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL (30,31,32).

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (n-hexano, tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA (30,31,32).

El lecho estacionario es apolar (hidrocarburo) y la fase móvil es polar (agua, alcohol) cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención.

CARACTERISTICAS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (30,31,32)

La diferencia entre Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y los procesos cromatográficos antes mencionados radican en la optimización del equipo, materiales y técnicas utilizadas:

- Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm), longitud de 10 a 50 cm , rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5-50 μm) que contienen fase estacionaria
- Presiones de entrada relativamente altas y control de flujo de la fase móvil
- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades
- Detectores especiales capaces de operar a caudales muy bajos y detectar cantidades muy pequeñas
- Instrumentos normalizados y automatizados
- Análisis rápidos
- Alta resolución

COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS (28,30,31,32)

Bomba para propulsar la fase móvil

Inyector para introducir la muestra

Columna

Detector

Registrador

La columna ésta considerada como el corazón del sistema, ésta se encuentra rellena de fase estacionaria con tamaño de partícula de 3 - 10 micras, por lo cual es necesario una bomba de alta presión para transportar la fase móvil a través de la columna . El proceso cromatográfico empieza por la inyección de la muestra en la columna, la separación ocurre al bombear la fase móvil y el soluto a través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna se detecta, ya sea por un detector universal o por uno selectivo, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir. La respuesta del detector a la presencia de cada componente se manifiesta en una carta, graficada como un cromatograma, para coleccionar, guardar y analizar los datos cromatográficos, la señal producida por el detector se manifiesta en forma de picos (Gaussianos) representando la concentración de los componentes eluidos. La calidad de separación cromatográfica puede ser determinada matemáticamente obteniendo los valores de la eficiencia, selectividad y resolución de los resultados cromatográficos.

FASE MOVIL (28,30,31,32).

La selección de los líquidos usados como fase móvil depende de varios parámetros. En la cromatografía de adsorción y de partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad , la viscosidad y otras características que pueden influir en el funcionamiento del detector (absorción UV, índice de refracción). En la cromatografía de intercambio iónico son

importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión la consideración primordial es la solubilidad de la muestra en la fase móvil.

Las características que debe reunir una fase móvil son:

- ser pura, sin contaminantes
- no reaccionar con el empaque
- ser compatible con el detector
- disolver la muestra
- tener baja viscosidad
- fácil recuperación de la muestra
- estar comercialmente disponible y a bajo precio
- no degradar o disolver la fase estacionaria
- tener la polaridad adecuada para permitir la retención conveniente de la muestra en la columna
- valores del factor de capacidad (K) entre 2 y 10

Los solventes más comúnmente usados son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, metanol, isopropanol y agua.

En muchas ocasiones en especial con fases polares, existe una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido, si estos líquidos se degasifican dentro del instrumento y forman burbujas, puede afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficacia de la columna por lo que es necesario remover estos gases disueltos empleando un método de degasificación adecuado, por ejemplo:

- calentar el líquido hasta ebullición
- conectar el líquido a una fuente de vacío
- utilizar un baño de ultrasonido o introducir en él una sonda ultrasónica
- hacer burbujear una corriente suave de helio a través del líquido

Durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias se puede utilizar un solo solvente como fase móvil ajustando adecuadamente las características de la fase, también es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis o

cambiaría. El primer método es llamado isocrático y el segundo elución por gradiente. La elución por gradiente se utiliza con muestras cuyos componentes poseen polaridades muy distintas. Por lo general se empieza con un solvente único y se aumenta con el tiempo la concentración del otro solvente.

FASE ESTACIONARIA (28,30,31,32,33).

Puede ser un sólido poroso del tipo usado en la cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión, estos difieren en su composición química, estructura y tamaño de partícula. Los rellenos más ampliamente utilizados tienen la fase estacionaria químicamente enlazada a las partículas del soporte. Las fases enlazadas se preparan por una reacción química entre los grupos hidroxilo de la superficie de las partículas de sílice y una molécula orgánica lineal o un organosilano. Aunque también existen fases enlazadas polares que se utilizan en fase normal las que contienen un grupo amino o ciano al final de la cadena hidrocarbonada, las más ampliamente utilizadas son de naturaleza apolar, con una cadena alquílica (octadesilo) enlazada por medio del átomo de silicio del alquilsilano. Las partículas de soporte totalmente poroso son de gel de sílice de gran superficie y en una gran variedad de tamaños de partícula. Los soportes pelliculares están formados por un núcleo sólido, generalmente esferas de vidrio, recubiertas por una fina capa porosa, normalmente de sílice. El tamaño de partícula es muy importante y debe aproximarse a la condición ideal, en la que la muestra se pone en contacto con la máxima cantidad de superficie de relleno, aproximadamente por debajo de 3 μm de diámetro las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta que el líquido no puede bombearse con facilidad. El tamaño promedio es de 5 - 15 μm , y en rellenos pelliculares presentan tamaños de 37 - 42 μm .

CONTROL DEL FLUJO DE LA FASE MOVIL (28,30,31,32).

Las bombas utilizadas en cromatografía líquida realizan la función de proporcionar la fuerza necesaria para impulsar el líquido a presiones elevadas. De acuerdo a la función que regulan se clasifican en:

- a) bombas de presión constante
- b) bombas de flujo constante

En general se utilizan caudales de 1 a 2 ml/min, ya que la eficacia aumenta a medida que el flujo disminuye. En cromatografía líquida se utilizan presiones de entrada elevadas, a causa de la gran resistencia que ofrece la columna rellena con partículas muy pequeñas, la presión aumenta linealmente con el flujo, a presiones elevadas se producen más fugas, la inyección resulta difícil y la eficacia disminuye al volverse más denso el líquido y reducirse las velocidades de transferencia de masa.

INTRODUCCION DE LA MUESTRA (28,30,31,32,33).

En cromatografía de líquidos, las muestras líquidas se pueden inyectar directamente y las muestras sólidas deben disolverse en algún disolvente, es conveniente eliminar los sólidos de la muestra por filtración, decantación o centrifugación ya que repetidas inyecciones de partículas sólidas puede ocasionar el bloqueo de los sistemas de inyección o de las columnas.

Existen varias formas de realizar la introducción de la muestra:

- a) Inyección con jeringa a través de septum
- b) Inyección con paro de flujo
- c) Inyección por medio de válvulas

DETECTORES (28,30,31,32).

Uno de los mayores requisitos instrumentales en CLAR es un detector sensible para el monitoreo continuo de los efluentes de la columna.

Un detector ideal para CLAR sería uno con las siguientes características:

- **tener una alta sensibilidad y la misma respuesta predecible**
- **responder a los solutos, o de otro modo especificidad predecible**
- **tener un amplio rango de linealidad**
- **no ser afectado por cambios en la temperatura o en el flujo de la fase móvil**
- **responder independientemente a la fase móvil utilizada**
- **no contribuir al ensanchamiento de las bandas**
- **ser confiable y de uso conveniente**
- **tener una respuesta que aumente linealmente con la cantidad de soluto**
- **no ser destructivo**
- **proveer información cualitativa del pico detectado**
- **tener una respuesta rápida**

Los detectores disponibles en la actualidad para CLAR permiten una amplia variedad de aplicaciones y raras veces la aplicación de la cromatografía de líquidos está limitada seriamente por el detector. Si los componentes de una muestra son muy diferentes y por lo tanto difieren ampliamente en sus propiedades físicas, será necesario utilizar dos o más detectores en serie para asegurar que cada componente de interés es medido adecuadamente.

Principalmente se utilizan detectores ópticos altamente sensibles, debido a los tamaños de muestra tan pequeños que se utilizan, por los que se hace pasar una corriente líquida a través de una microcubeta de pequeño volumen, atravesada por un rayo de luz. Las variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorción UV, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice de refracción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta que se registran en forma de variaciones de voltaje de salida y se registran gráficamente en un registrador, integrador o computadora que proporciona tiempos de retención y áreas de los picos

REGISTRADORES (28,30,31,32).

La señal del detector es amplificada transformando la medida eléctrica en una señal gráfica que se registra en una banda de papel. El cromatograma es la representación gráfica de la intensidad de la señal frente al tiempo.

Los parámetros utilizados en cromatografía se encuentran en el apéndice 11.1(página 74).

2.3 VALIDACION

La selección de un método analítico es el primer paso para establecer una metodología analítica. Se debe conocer perfectamente lo que se pretende medir o cuantificar y conocer la precisión y exactitud requeridas, sin perder de vista el aspecto económico y la disponibilidad de los recursos en la aplicación del método seleccionado. El definir porqué se eligieron ciertas condiciones analíticas es parte del desarrollo. La validación implica el demostrar a través de estudios de laboratorio que las características del método cumplen los requerimientos para las aplicaciones analíticas (34,35).

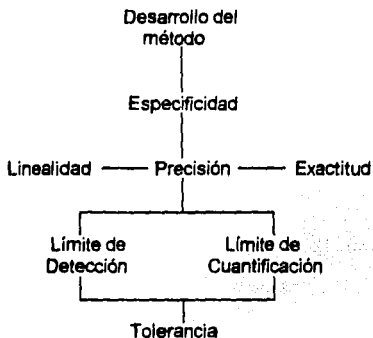


Figura 2. Representación esquemática del proceso de validación.

Como se puede observar en la figura 2, antes de iniciar la validación método y después de desarrollarlo, es importante demostrar su especificidad para evitar, en lo posible, dar marcha atrás cuando se ha avanzado en la validación.

Si el método no es específico, es necesario regresar al punto de partida, es decir, al desarrollo del mismo y tratar de modificarlo para eliminar o separar las interferencias que lo hacen inespecífico.

El error total de un método puede representarse de la siguiente manera:

$$\text{Error Total} = \text{error sistemático} + \text{error aleatorio}$$

Los errores aleatorios son inherentes a cualquier método y son la variación permitida para el mismo. Sin embargo, los sistemáticos son errores que deben corregirse y eliminarse. El error total es una expresión de la exactitud del método y por lo tanto, su valor debe ser pequeño y deberse principalmente al error aleatorio (36,37).

Pueden existir muchas fuentes de errores sistemáticos. De acuerdo a Wilson, se clasifican en 4 categorías:

- 1) sistema/calibración
- 2) interferencia directa
- 3) constantes
- 4) proporcionales

Las fuentes de error 1 y 2 no son detectables mediante procesos estadísticos y por lo tanto no existen técnicas para corregirlos. Su presencia solo puede sospecharse por un análisis experimental directo o por el conocimiento de la historia de la muestra. Sin embargo, las fuentes de error 3 y 4 pueden detectarse por técnicas de diagnóstico estadístico, se puede cuantificar su magnitud y por lo tanto sus valores pueden utilizarse para hacer correcciones del método (36,37).

Un error constante se debe a una respuesta relativa significativa, ya sea positiva o negativa, pero no debida a la sustancia de interés, y que puede estar midiéndose directamente o puede deberse a una propiedad fisicoquímica del sistema de medición el cual es independiente del tamaño de la muestra.

Un error proporcional es el resultado de un cambio relativo significativo en la respuesta de la sustancia por unidad de concentración de la misma, positiva o negativa, atribuible a un parámetro del sistema de medición, del procedimiento o del método, cuya magnitud es constante en todos los niveles de concentración de la sustancia.

La linealidad es una manera de descubrir si existen errores constantes o proporcionales en el método y eliminarlos (36,37).

DEFINICION

La validación puede definirse como el proceso por el cual, mediante estudios de laboratorio, queda establecido que la capacidad de un método satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas (34,35,38,39).

El proceso de validación incluye la evaluación de parámetros estadísticos como son : precisión, linealidad y exactitud como medida del comportamiento del método (39).

La USP XXIII (27) establece los requisitos necesarios que debe cumplir un método farmacopeico. Así mismo, se reconoce que el tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico dependerá de la naturaleza de dicho método, por lo que los procedimientos de ensayo más comunes se han clasificado como sigue:

Categoría I. Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo preservativos) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites.

Categoría III. Métodos analíticos para la determinación de las características de comportamiento del producto (ej. disolución o liberación de fármacos).

Los métodos analíticos que son empleados en la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos juegan un papel importante en la evaluación e interpretación de datos de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética (35,38).

La validación es importante para la interpretación adecuada de los resultados, cada técnica analítica tiene sus características, las cuales pueden variar de fármaco a fármaco y del objetivo del estudio. La validación incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que el método se puede utilizar en la determinación cuantitativa de la concentración de un fármaco en un fluido biológico (38).

Las técnicas bioanalíticas más utilizadas son:

- 1) métodos químicos (cromatografía de líquidos , gases , espectrofotometría de masas)
- 2) métodos biológicos (procedimientos basados en inmunoensayos, microbiológicos)

PARAMETROS PARA EVALUAR LA VALIDACION

Los parámetros para la aceptabilidad del desarrollo de un método analítico son la estabilidad del fármaco en el fluido biológico bajo condiciones de almacenaje del estudio, exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad (selectividad), reproducibilidad, función de respuesta (35,38).

Las etapas en el desarrollo y validación de un método analítico y se pueden clasificar en dos fases:

- 1) fase de desarrollo (definición del ensayo)

2) fase de aplicación (el método es aplicado al análisis de las muestras de estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y bioequivalencia).

LINEALIDAD (40)

Es una medida del grado en que el comportamiento del método analítico se acerca a la linealidad, asegurando así que los resultados obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del principio activo de interés, dentro de un rango de concentración determinada.

LINEALIDAD DEL METODO (35,38)

Se determina adicionando el principio activo al fluido biológico libre de fármaco, a concentraciones alta, mediana y baja, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración.

Criterio de aceptación:

$$b = 0$$

$$r \geq 0.99 \quad r^2 \geq 0.98$$

$$m = 1$$

LINEALIDAD DEL SISTEMA (40)

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución estándar, usando cuando menos 5 diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución.

Criterio de aceptación

$$b = 0$$

$$r \geq 0.99 \quad r^2 \geq 0.98$$

EXACTITUD (40)

La exactitud es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

EXACTITUD DEL SISTEMA (40)

Se analizan al menos 6 soluciones del principio activo de manera independiente.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2.0\%$$

EXACTITUD DEL METODO (35,38)

Se analiza con un mínimo de 5 determinaciones por concentración.

Criterio de aceptación:

El valor promedio puede estar entre $\pm 15\%$ del valor real.

Los valores de recobro no menores del 50, 80 y 90 % han sido empleados como límites de aceptación, sin embargo es deseable que se aproxime al 100% (35).

PRECISION (40)

Es el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método bajo las condiciones normales de operación.

a) Reproducibilidad. Esta expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos) (40).

b) Repetibilidad. Esta expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparatos, etc.) (40).

PRECISION DEL SISTEMA (40)

Se determina mediante el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5 \%$$

PRECISION DEL METODO (35,38)

Se determina con un mínimo de 5 determinaciones por concentración (35,38).

Criterio de aceptación:

El valor promedio no puede exceder el 15 % del coeficiente de variación (cv).

ESPECIFICIDAD DEL METODO (35,40)

Es la capacidad que tiene un sistema cromatográfico de resolver el pico de interés de los otros componentes que den señal en el detector (productos de degradación, excipientes, otros activos), es decir es el grado en que la medición se debe solo a la sustancia por determinar y no a otras que puedan estar presentes en el material a utilizar.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN FLUIDO BIOLÓGICO (35,38,40).

Verificar si la muestra almacenada a diferentes condiciones presenta algún cambio o degradación, tomando en cuenta el tiempo desde que la muestra biológica se obtiene hasta el momento en que se procesa para su análisis.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA (35,38).

Verificar si la muestra procesada sufre algún cambio o degradación, con el fin de prevenir algún problema como puede ser la falta de energía eléctrica, descompostura del equipo de análisis o alguna otra causa por la que las muestras no puedan analizarse inmediatamente. Con esta prueba se asegura la estabilidad en el medio de disolución final y dado el caso se dan las condiciones de almacenaje para las muestras.

TOLERANCIA DEL SISTEMA (40).

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación.

LIMITE DE DETECCION (38,40)

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LIMITE DE CUANTIFICACION (38,40)

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Las fórmulas empleadas para la evaluación de los parámetros se encuentran en el apéndice 11.2 (página 77).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La propafenona posee diversas ventajas sobre los antiarrítmicos actualmente disponibles para el tratamiento de afecciones cardíacas. En la mayoría de los pacientes no deprime la función ventricular izquierda (con excepción de que exista una alteración cardíaca adicional), la incidencia de efectos proarrítmicos son comparables o menores que la mayoría de los otros agentes antiarrítmicos, los efectos adversos no-cardiovasculares son bien tolerados (18,19,20). La propafenona tiene marcadas desventajas como son: su farmacocinética es dosis dependiente (no lineal (41)), una vida plasmática de eliminación corta; la formación de metabolitos activos, donde la velocidad y formación de estos depende de las características oxidativas del paciente, siendo el metabolito 5-hidroxi-propafenona tan activo como la propafenona (17,22,23,42); y un amplio rango de concentraciones plasmáticas en donde los efectos terapéuticos se pueden presentar.

La propafenona se incluyó recientemente en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud (16), debido a las ventajas que posee sobre otros antiarrítmicos. Es necesario contar con un método analítico adecuado que permita cuantificar la propafenona y sus metabolitos en plasma, para realizar estudios de biodisponibilidad y farmacocinética que permitan establecer el comportamiento de la propafenona y sus metabolitos en sujetos mexicanos, ya que los métodos reportados en la literatura no son reproducibles, emplean reactivos especiales, técnicas de derivación, así como los tiempos de análisis son muy largos y se cuantifica un , o los dos metabolito.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Desarrollar un método analítico empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar la propafenona en plasma de seres humanos.

4.2 Específicos

4.2.1 Desarrollar un método analítico empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), que permita cuantificar la propafenona y sus metabolitos en plasma de seres humanos.

4.2.2 Validar el método desarrollado

4.2.3 Evaluar el método desarrollado en muestras de voluntarios sanos.

5. HIPOTESIS

5.1 De nulidad

El método desarrollado para la cuantificación de propafenona en plasma de seres humanos no es adecuado si no cumple con los parámetros de validación.

5.2 Alterna

El método desarrollado para la cuantificación de propafenona en plasma de seres humanos es adecuado si cumple con los parámetros de validación

8. MATERIAL Y METODO

6.1 APARATOS Y REACTIVOS

Aparatos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters/ Millipore:

Bomba modelo 6000 A

Inyector automático Wisp 712

Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable Lambda-Max
modelo 481

Registrador modelo 740

- Potenciómetro Orion Research modelo 701-A

- Balanza analítica Mettler modelo AE 160

- Balanza electrónica Mettler modelo PC 2 000

- Vortex Genie

- Centrifuga Du Pont Sorvall GLC-2B

- Micropipetas de 100, 250, 500, 1000 μ l

- Cronómetro

Reactivos:

- Propafenona LU 41263 estándar interno (Knoll)

- Clorhidrato de propafenona LU 29007 (Knoll)

- 5 -OH propafenona LU 40545 (Knoll)

- N -depropilpropafenona LU48686 (Knoll)

- Fosfato dibásico de potasio R.A. (J.T. Baker)

- Tris (hidroximetil)-amino metano R.A. (Merk)

- Metanol HPLC (J.T. Baker)

- Acetonitrilo HPLC (Merk)

- Eter etílico R.A. (Merck)

- Acido fosfórico R.A. (J.T. Baker)

6.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

CONDICIONES INICIALES PARA REALIZAR EL DESARROLLO DEL MÉTODO

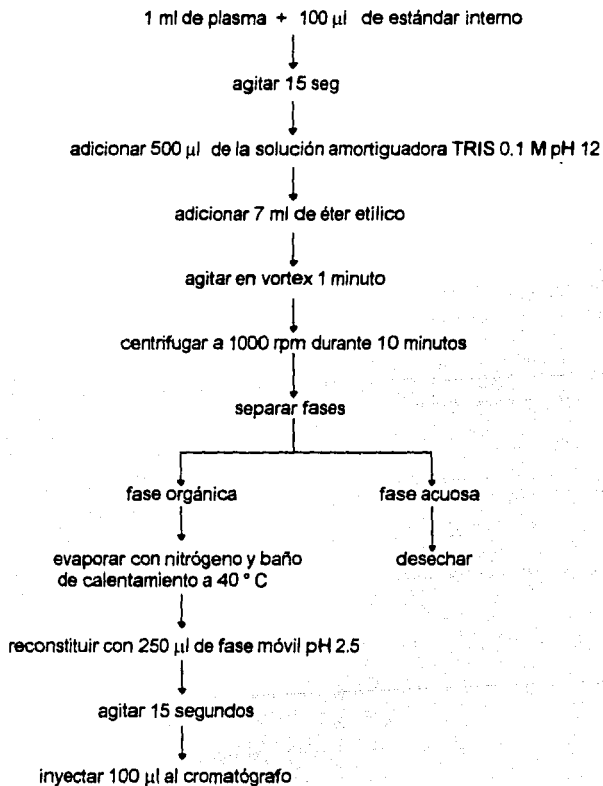
- Columna 30 cm x 3.9 mm DI de acero inoxidable empacada con grupos ciano enlazados a partículas de sílica porosa con diámetro de 5 a 10 μm .
- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH 7 : Acetonitrilo (65:35).
- Flujo: 1 ml/min
- Volumen de inyección: 100 μl
- Longitud de onda: 210 nm

En el desarrollo del método se evaluaron las variables porcentaje de solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7, acetonitrilo y metanol en la fase móvil, así como la velocidad de flujo y el pH de la fase móvil; en la resolución y especificidad para la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

6.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El método utilizado para la extracción de la propafenona en plasma es una adecuación de los métodos reportados por Hoyer (7) y Kates (10) y se muestra en la figura 3.

Figura 3. Procedimiento de extracción para la cuantificación de propafenona en plasma.



6.4 PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7

Pesar 17.41 gramos de fosfato dibásico de potasio, colocar en un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver y aforar con agua destilada, ajustar el pH a 7 con ácido fosfórico. Filtrar la solución con membrana tipo HA de 45 μ .

Solución amortiguadora de TRIS 0.1 M pH= 12

Pesar 12.11 gramos de Tris (hidroximetil)-aminometano, colocar en un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada. Ajustar el pH a 12 con Hidróxido de sodio 1N.

Solución estándar de Clorhidrato de Propafenona.

Pesar 17.5 mg, y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con agua destilada (concentración de 175.0 μ g/ml).

Solución estándar de N-depropilpropafenona.

Pesar 17.5 mg, y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con agua destilada (concentración de 175.0 μ g/ml).

Solución estándar de 5 -OH propafenona.

Pesar 17.5 mg, y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con agua destilada (concentración de 175.0 μ g /ml).

A partir de las soluciones estándares se efectuaron las diluciones adecuadas para obtener las curvas de calibración en plasma y fase móvil pH 2.5 (se ha reportado que a este pH la propafenona es estable en solución (2)), tabla II y III respectivamente.

Punto No.	Concentración (ng/ml)		
	Propafenona	5-OH propafenona	N-Depropilpropafenona
1	100	100	100
2	250	250	250
3	500	500	500
4	700	700	700
5	1000	1000	1000

Tabla II. Concentración de estándares de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona para la curva de calibración en plasma.

Preparación del estándar interno

Pesar 5 mg de estándar interno (propafenona LU 41263) colocar en un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con etanol, tomar una alícuota de 2 ml de esta solución y colocar en un matraz volumétrico de 50 ml, y aforar con agua destilada (concentración de 2 μ g/ml).

Punto No.	Concentración (ng/ml)		
	Propafenona	5-OH Propafenona	N-Depropilpropafenona
1	500	500	500
2	1000	1000	1000
3	2000	2000	2000
4	3000	3000	3000
5	4000	4000	4000

Tabla III. Concentración de estándares de propafenona, 5-OH propafenona y N-Depropilpropafenona para la curva de calibración en fase móvil pH 2.5

6.5 VALIDACION DEL METODO

Al evaluar los parámetros obtenidos al modificar el porcentaje de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH=7, acetonitrilo y metanol, la velocidad de flujo así como el pH de la fase móvil, y al analizar los resultados obtenidos de la especificidad y de la resolución entre la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona, se determinó que las condiciones cromatográficas para su evaluación en plasma fueran las siguientes:

- Columna: 30 cm x 3.9 mm DI de acero inoxidable empacada con grupos ciano enlazados a partículas de sílica porosa con diámetro de 5 a 10 μ m
- Fase móvil : mezcla de solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7:acetonitrilo:metanol (75:10:15), ajustar el pH a 7 con ácido fosfórico.
- Flujo : 1ml/min
- longitud de onda : 210 nm
- volumen de inyección : 100 μ l

Con las condiciones cromatográficas anteriores se procedió a realizar la validación para garantizar que el método es adecuado para la cuantificación de propafenona y sus metabolitos en plasma.

LINEALIDAD

Linealidad del método.

Se prepararon 5 curvas de calibración de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona en plasma libre de fármaco a las concentraciones indicadas en la tabla II y se sometieron al proceso de extracción mostrado en la figura 3. De esta manera se calculó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto de los datos de mg adicionados contra mg recuperados.

Linealidad del sistema.

Se prepararon 5 curvas de calibración de propafenona, 5-OH propafenona y N- depropilpropafenona en fase móvil pH 2.5 a las concentraciones indicadas en la tabla III. Calculando el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto al origen de los datos de concentración contra la relación de alturas.

EXACTITUD

Se evaluó preparando 6 replicas en plasma de la curva estándar de propafenona, 5-OH propafenona y N- depropilpropafenona, determinandose el coeficiente de variación.

PRECISION DEL SISTEMA

Se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona en fase móvil pH 2.5, calculandose el coeficiente de variación.

ESPECIFICIDAD

Se compararon los cromatogramas obtenidos de :

- Mezcla de los estándares de propafenona, estándar interno y los metabolitos de la propafenona en fase móvil pH 2.5
- Plasma libre de fármaco
- Muestra plasmática conteniendo estándar interno, propafenona y sus metabolitos.

ESTABILIDAD

Se estudió la estabilidad del fármaco en plasma, preparando 100 ml de la muestra de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona en plasma, separándola en fracciones en tubos, tapándolas perfectamente y almacenandolas en congelación (-20 ° C) las muestras fueron analizadas a los 1,2, 3, 5, 10 y 30 días, a las condiciones de temperatura ambiente, las muestras fueron analizadas a los 1, 2, 3 y 5 día, comparándolas

con una muestra recién preparada de igual concentración para determinar el nivel de degradación del fármaco en plasma.

LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

Se determinó el límite de detección y cuantificación en muestras de plasma a las concentraciones de 5 y 25 ng/ml de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropil-propafenona.

REPRODUCIBILIDAD

Se determinó la reproducibilidad del método analizando 3 niveles de concentración de la curva de calibración en plasma de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropil-propafenona, por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Las fórmulas empleadas para la determinación de los parámetros se encuentran en el apéndice 11.2 (página 77)

6.6 APLICACION DEL METODO

Obtención y manejo de las muestras de los voluntarios.

Se obtuvo sangre venosa de la cara anterior del antebrazo utilizando un catéter (punzocat del # 18), con el siguiente horario: 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24 y 48 horas, después de la administración de 300 mg de propafenona por vía oral, después de cada toma de muestra se pasaron 0.2 ml de heparina para mantener permeable el catéter. Cada muestra de aproximadamente 5 ml se colocó en tubos previamente heparinizados e identificados, se centrifugaron a 2 000 rpm durante 10 minutos, el plasma fue separado y depositado en otros tubos identificados; cubriéndolos con papel parafilm y se congelaron (- 20 ° C) hasta su análisis.

7. RESULTADOS

7.1 DESARROLLO DEL METODO

En la tabla IV, se muestran los tiempos de retención de la propafenona y sus metabolitos al emplear las condiciones iniciales, fase móvil: solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH7: acetonitrilo (65:35) , flujo 1 ml/min.

	Tiempo de retención (minutos)
Propafenona	14.8
Estándar interno	13.2
5-OH propafenona	10.6
N-depropilpropafenona	8.8

Tabla IV. Tiempo de retención de la propafenona, estándar interno y los metabolitos de la propafenona, con fase móvil de solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH 7 : acetonitrilo (65:35).

En la tabla V, se muestran los tiempos de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona al variar el porcentaje de acetonitrilo y solución amortiguadora en la fase móvil, en la figura 4 se observa la representación gráfica del comportamiento del porcentaje de acetonitrilo y solución amortiguadora en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona. En la figura 5 se observan los cromatogramas obtenidos al realizar las variaciones en la fase móvil de la tabla V y su efecto en la resolución de los picos cromatográficos entre la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

% de Acetonitrilo en la fase móvil	Tiempo de retención (minutos)			
	Propafenona	Std. Interno	5-OH Propafenona	N-Depropilpropafenona
60:40	11.1 ± 0.55	10.3 ± 0.51	8.5 ± 0.42	7.5 ± 0.37
65:35	14.8 ± 0.07	13.2 ± 0.66	10.6 ± 0.53	8.8 ± 0.44
70:30	19.1 ± 0.95	16.7 ± 0.83	12.8 ± 0.64	10.4 ± 0.52
75:25	24.5 ± 1.22	20.9 ± 1.04	15.3 ± 0.76	12.1 ± 0.60

Tabla V. Efecto del porcentaje de acetonitrilo y solución amortiguadora en la fase móvil en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona. En la tabla se muestra el promedio de tres determinaciones y su error estándar.

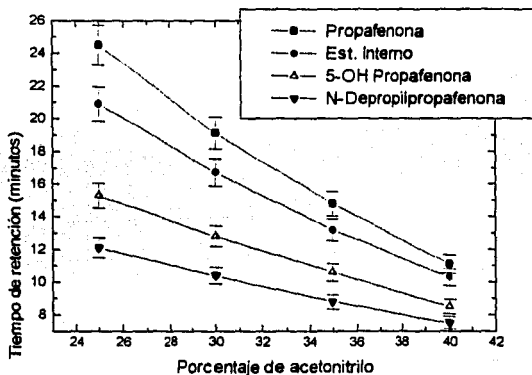


Figura 4. Representación gráfica del porcentaje de acetonitrilo y solución amortiguadora en la fase móvil y su efecto en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

En la tabla VI. Se muestran los tiempos de retención obtenidos al variar la velocidad de flujo, con fase móvil de solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH=7:Acetonitrilo (75:25), en la figura 6 se observa la representación gráfica y en la figura 7 los cromatogramas obtenidos con estas condiciones.

Velocidad de flujo (ml/minutos)	Tiempo de Retención (minutos)			
	Propafenona	Std. interno	5-OHP	N-Depropilpropafenona
1.0	24.6 ± 1.23	21.1 ± 1.05	15.3 ± 0.76	12.1 ± 0.60
1.5	16.8 ± 0.84	14.3 ± 0.71	10.4 ± 0.52	8.2 ± 0.41
2.0	12.3 ± 0.61	10.5 ± 0.52	9.6 ± 0.48	6.0 ± 0.30

Tabla VI. Efecto de la velocidad de flujo en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona. En la tabla se muestra el promedio de tres determinaciones y su error estándar.

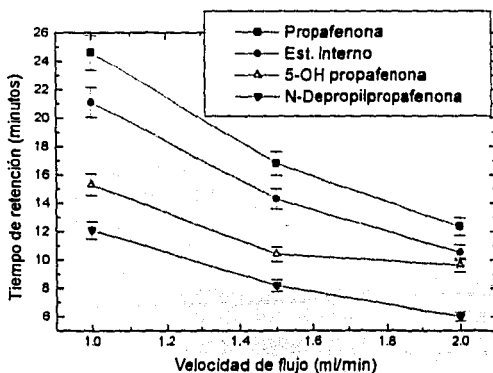


Figura 6. Representación gráfica del efecto de la velocidad de flujo en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona

FALLA DE ORIGEN

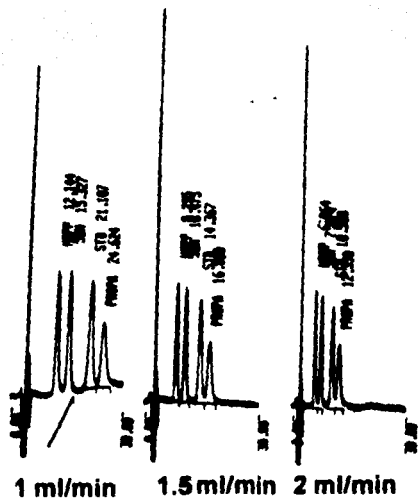


Figura 7. Cromatogramas obtenidos al variar la velocidad de flujo en la fase móvil: solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7; acetonitrilo (75:25) y su efecto en la resolución de los picos cromatograficos de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

En la tabla VII, se muestran los valores del tiempo de retención obtenidos al modificar el porcentaje de acetonitrilo y metanol en la fase móvil, manteniendo constante la proporción de la solución de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7, velocidad de flujo 1 ml/min. En la figura 8 y 9 se muestra la representación gráfica y los cromatogramas obtenidos respectivamente.

solución amortiguadora	Tiempo de Retención (minutos)				
	% de Acetonitrilo y metanol	Propafenona	Std. Interno	5-OH Propafenona .	N-Depropilpropafenona
	75:25:0	17.8 ± 0.89	12.8 ± 0.64	11.0 ± 0.55	9.7 ± 0.48
	75:20:5	18.3 ± 0.91	13.8 ± 0.69	11.5 ± 0.57	10.1 ± 0.50
	75:15:10	22.1 ± 1.10	17.0 ± 0.85	13.9 ± 0.69	12.0 ± 0.60
	75:10:15	26.8 ± 1.34	21.8 ± 1.09	16.7 ± 0.83	14.3 ± 0.71
	75:5:20	27.7 ± 1.39	24.1 ± 1.20	17.5 ± 0.87	14.8 ± 0.74

TablaVII. Efecto del porcentaje de acetonitrilo y metanol en la fase móvil, manteniendo constante la proporción de la solución amortiguadora, en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona. En la tabla se muestra el promedio de tres determinaciones y sus error estándar.

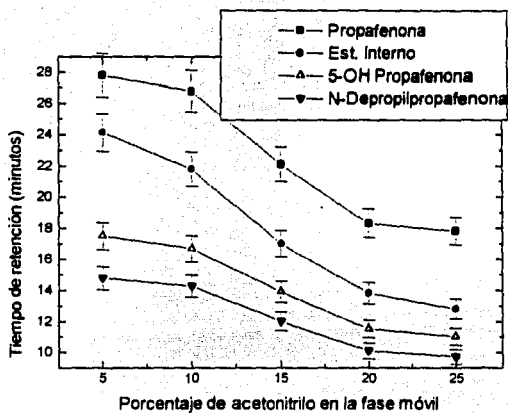


Figura 8. Representación gráfica del efecto del porcentaje de acetonitrilo y metanol en la fase móvil, manteniendo constante la proporción de la solución amortiguadora y su efecto en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

FALLA DE ORIGEN

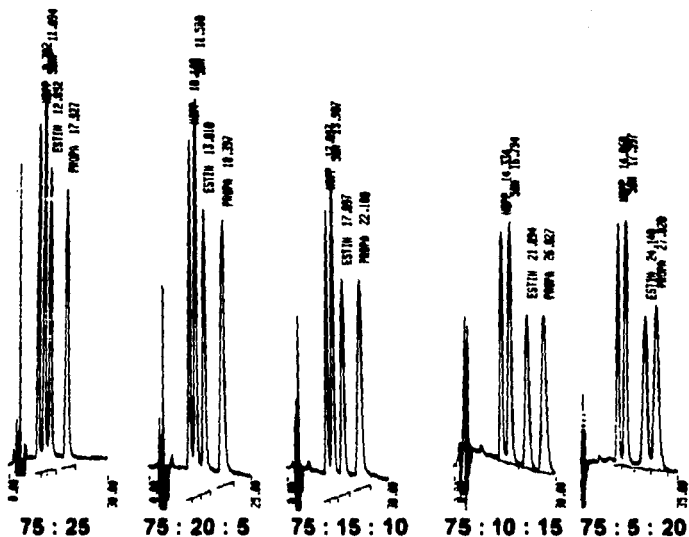


Figura 9. Cromatogramas obtenidos al variar la proporción de acetonitrilo y metanol en la fase móvil, manteniendo constante la proporción de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7 y su efecto en la resolución de los picos cromatográficos de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

En la tabla VIII. se muestran los tiempos de retención obtenidos al variar el pH de la fase móvil: solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH7; Acetonitrilo: Metanol (75:10:15), a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En la figura 10 y 11 se muestra la representación gráfica y los cromatogramas obtenidos con estas condiciones respectivamente.

pH de la fase móvil	Tiempo de Retención (minutos)			
	Propafenona	Std. Interno	5-OH Propafenona	N-Depropilpropafenona
2.5	13.8 ± 0.69	10.4 ± 0.52	9.1 ± 0.45	8.5 ± 0.42
4.0	15.1 ± 0.75	11.3 ± 0.56	9.6 ± 0.48	9.0 ± 0.45
5.0	16.4 ± 0.82	12.0 ± 0.60	10.2 ± 0.51	9.5 ± 0.47
7.0	17.8 ± 0.89	12.8 ± 0.64	11.0 ± 0.55	9.3 ± 0.46
7.7	20.7 ± 1.03	14.8 ± 0.74	11.5 ± 0.59	10.4 ± 0.52

Tabla VII. Efecto del pH de la fase móvil en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona. En la tabla se muestra el promedio de tres determinaciones y su error estándar.

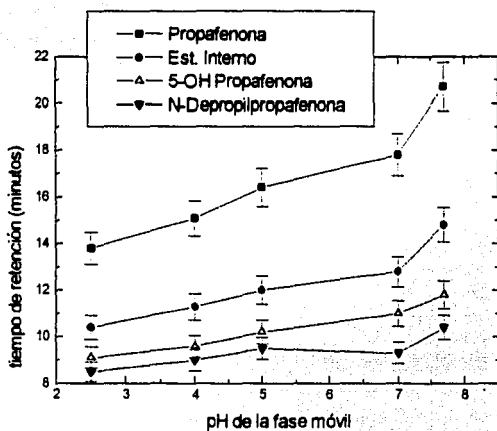


Figura 10. Representación gráfica del efecto del pH de la fase móvil en el tiempo de retención de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

FALLA DE ORIGEN

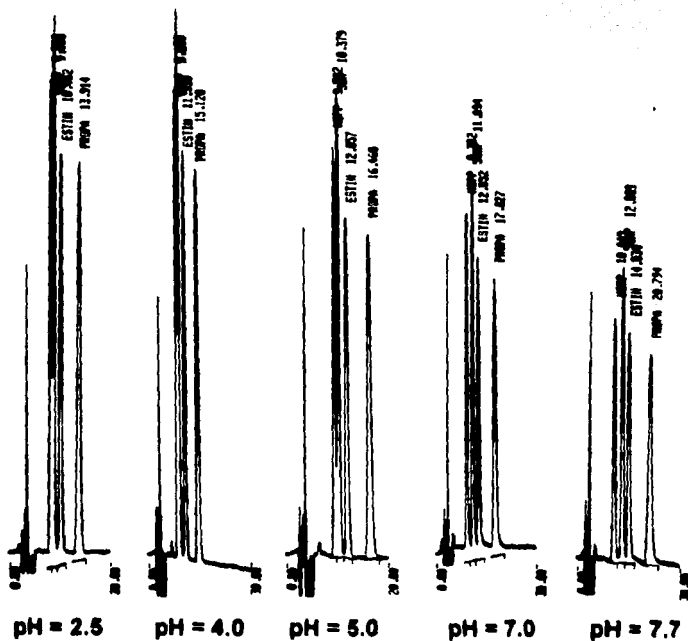


Figura 11. Cromatogramas obtenidos al variar el pH de la fase móvil : solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7: acetonitrilo:metanol (75:10:15) y su efecto en la resolución de los picos cromatográficos de la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

7.2 VALIDACION DEL METODO

Para verificar que el método desarrollado es adecuado para la cuantificación de propafenona y sus metabolitos en plasma se realizó la validación. En las tablas IX, X y XI se muestran los resultados de la linealidad del sistema a las concentraciones indicadas en la tabla III, para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona; y su representación gráfica en la figura 12.

Concentración (ng/ml)	PROPAFENONA relación de alturas						\bar{X}	E.E
500	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.024	
1000	0.97	0.96	0.97	0.97	0.98	0.97	0.048	
2000	1.89	1.93	1.89	1.89	1.89	1.896	0.094	
3000	2.80	2.86	2.89	2.82	2.83	2.84	0.142	
4000	3.80	3.92	3.80	3.94	3.82	3.856	0.192	
r	0.99985	0.99975	0.99989	0.99919	0.99988	0.99985		
b	0.01195	-0.02000	0.00920	-0.02878	0.01012	-0.00351		
m	0.00094	0.00097	0.00095	0.00097	0.00094	0.00095		

Tabla IX. Linealidad del sistema para Propafenona

Concentración (ng/ml)	5-OH PROPAFENONA relación de alturas					\bar{Y}	E.E
	500	0.61	0.64	0.62	0.61	0.61	0.618
1000	1.26	1.27	1.28	1.26	1.27	1.268	0.063
2000	2.51	2.56	2.52	2.56	2.52	2.534	0.126
3000	3.86	3.66	3.76	3.77	3.66	3.742	0.187
4000	5.13	5.00	5.11	5.02	5.13	5.076	0.253
r	0.99993	0.99959	0.99986	0.99990	0.99917	0.99988	
b	-0.04268	0.03506	-0.01591	0.00286	-0.02951	-0.00946	
m	0.00129	0.00123	0.00127	0.00125	0.00127	0.00126	

Tabla X. Linealidad del sistema para 5-OH propafenona

Concentración (ng/ml)	N- DEPROPILPROPAFENONA relación de alturas					\bar{Y}	E.E
	500	0.68	0.68	0.69	0.69	0.68	0.684
1000	1.38	1.35	1.33	1.34	1.35	1.35	0.067
2000	2.70	2.78	2.77	2.79	2.78	2.764	0.138
3000	4.00	4.10	4.06	4.07	4.07	4.06	0.203
4000	5.28	5.20	5.32	5.32	5.32	5.288	0.264
r	0.99992	0.99882	0.99968	0.99958	0.99964	0.99963	
b	0.05341	0.07689	0.03792	0.04695	0.04341	0.05171	
m	0.00131	0.00130	0.00133	0.00133	0.00133	0.00132	

Tabla XI. Linealidad del sistema para N-depropilpropafenona

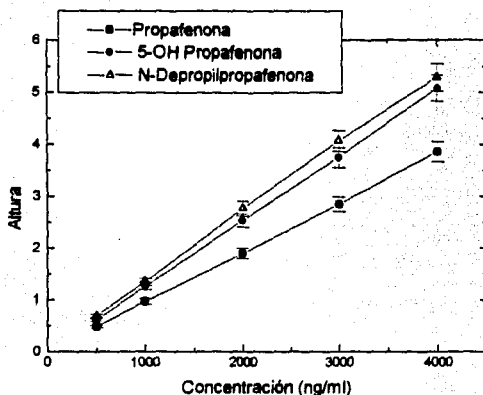


Figura 12. Representación gráfica de la linealidad del sistema para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona.

En las tablas XII, XIII y XIV se muestran los resultados obtenidos al realizar la linealidad del método para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona a las concentraciones mostradas en la tabla II, y la representación gráfica en la figura 13.

Linealidad del Método

cantidad adicionada (ng/ml)	PROPAFENONA						\bar{X}
	cantidad recuperada (ng/ml)						
20	19.39	21.00	20.50	19.86	20.58	20.26	
100	98.49	99.45	99.72	99.27	98.57	99.10	
250	249.45	251.15	251.71	251.60	249.60	250.63	
500	500.90	501.12	502.61	499.85	498.90	500.67	
700	699.00	700.60	701.00	701.60	701.45	700.73	
1000	1000.50	1001.70	1002.00	999.86	1001.27	1001.06	
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	
b	-0.9327	0.3661	0.5439	0.1262	-0.8405	-0.1506	
m	1.0012	1.0010	1.0016	1.0004	1.0019	1.0013	

Tabla XII. Linealidad del método para propafenona

cantidad adicionada (ng/ml)	5-OH PROPAFENONA						\bar{X}
	cantidad recuperada (ng/ml)						
20	19.74	19.36	19.26	19.90	19.68	19.58	
100	98.56	99.26	98.36	97.89	97.89	98.48	
250	247.90	249.60	248.00	246.90	246.90	247.93	
500	496.80	498.60	497.26	496.20	496.20	496.98	
700	724.55	723.88	724.00	724.16	724.16	724.14	
1000	986.50	988.26	987.21	986.98	986.98	987.06	
r	0.9994	0.9995	0.9994	0.9994	0.9994	0.9994	
b	0.8698	1.3421	0.5557	0.2574	0.6055	0.7046	
m	0.9995	1.0003	1.0002	1.0001	0.9995	0.9999	

Tabla XIII. Linealidad del método para 5-OH Propafenona

cantidad adicionada (ng/ml)	N- DEPROPILOPROPAFENONA					\bar{X}
	cantidad recuperada (ng/ml)					
20	18.90	19.00	18.94	19.56	18.36	18.95
100	94.56	95.16	94.86	95.84	95.16	95.11
250	238.20	239.68	238.59	239.78	238.84	239.01
500	476.10	475.96	476.86	477.21	475.19	476.26
700	663.45	664.56	663.97	665.12	663.21	664.06
1000	950.25	952.16	951.16	949.86	950.12	950.71
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
b	0.0768	0.7339	0.2437	1.4596	0.1578	0.4607
m	0.9498	0.9494	0.9505	0.9438	0.9493	0.9499

Tabla XIV. Linealidad del método para N- Depropilpropafenona.

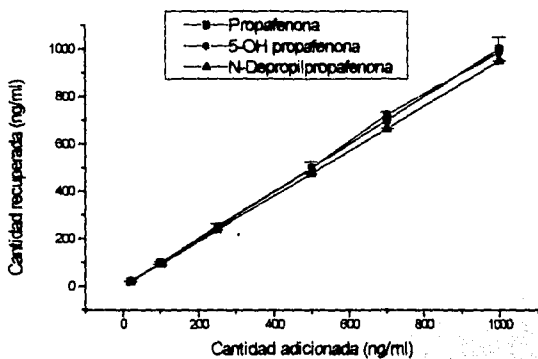


Figura 13. Representación gráfica de la linealidad del método para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona.

En la tabla XV se muestran los resultados obtenidos al realizar la precisión del sistema para la propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona a la concentración de 500 ng/ml.

	Propafenona	5-OH Propafenona	N-Depropilpropafenona
	0.75	1.09	1.87
	0.75	1.08	1.87
	0.75	1.09	1.88
	0.75	1.07	1.88
	0.75	1.09	1.86
	0.76	1.09	1.85
n =	6	6	6
\bar{X} =	0.751	1.085	1.868
D.E =	0.00408	0.00836	0.01169
D.E.R =	0.5431	0.7711	0.6257

Tabla XV. Precisión del sistema para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona.

En la tabla XVI, XVII y XVIII se muestran los promedios obtenidos al realizar la exactitud del método para la propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona respectivamente en base a la curva estándar.

PROPAFENONA			
Cantidad adicionada (ng/ml)	Cantidad recuperada (ng/ml)	% recuperado	Coefficiente de variación
20	19.90	99.52	1.60
100	99.50	99.5	1.36
250	247.00	98.80	1.45
500	501.35	100.27	1.15
700	696.70	99.52	0.56
1000	1000.40	100.04	0.74

Tabla XVI. Exactitud del método para propafenona

Exactitud del método

5-OH PROPAFENONA			
Cantidad adicionada (ng/ml)	Cantidad recuperada (ng/ml)	% recuperado	Coefficiente de variación
20	19.70	98.53	1.91
100	98.50	98.50	1.20
250	248.00	99.20	0.53
500	496.70	99.34	0.49
700	724.55	103.51	0.46
1000	986.35	98.63	1.06

Tabla XVII. Exactitud del método para 5-OH propafenona

N-DEPROPIPROPAFENONA			
Cantidad adicionada (ng/ml)	Cantidad recuperada (ng/ml)	% recuperado	Coefficiente de variación
20	18.90	94.54	2.57
100	94.50	94.25	2.25
250	238.20	95.29	2.11
500	476.10	95.22	0.88
700	663.45	94.78	1.32
1000	950.25	95.02	0.68

Tabla XVIII. Exactitud del método para N- depropilpropafenona

En las tablas XIX, XX y XXI se muestran los resultados obtenidos al realizar la reproducibilidad del método por dos analistas en dos días diferentes.

		Analista	
		1	2
D í a	1	100.30	102.31
		99.97	104.32
		97.79	98.05
		97.51	83.81
		96.58	86.88
	102.05	104.21	
	2	104.32	98.47
		95.24	110.85
		97.79	108.86
		97.51	104.32
109.29		106.25	
99.79	110.12		

Tabla XIX. Datos para evaluar la reproducibilidad del método para propafenona con dos analistas en dos días diferentes.

		Analista	
		1	2
D í a	1	120.34	121.79
		112.67	127.34
		112.17	131.40
		111.88	114.52
		115.32	114.33
	105.56	128.64	
	2	120.47	118.76
		118.76	120.64
		114.01	122.05
		114.19	124.61
123.91		124.61	
123.91	124.61		

Tabla XX. Datos para evaluar la reproducibilidad del método para 5-OH propafenona, con dos analistas en dos días diferentes.

		Analista	
		1	2
D í a	1	85.61	90.96
		80.68	96.52
		79.81	93.17
		77.49	92.42
		81.73	78.91
	2	79.11	83.31
		80.09	93.99
		82.96	96.52
		82.58	91.71
		88.31	94.51
	82.23	95.91	
	86.11	92.42	

Tabla XXI. Datos para evaluar la reproducibilidad del método para N-depropilpropafenona, con dos analistas en dos días diferentes.

Fuente de variación	g.l	Fcalculada			Ftablas
		propafenona	5-OH propafenona	N-Depropilpropafenona	
DÍA	1	1.9432	0.7450	15.6294	161.4
ANALISTA	1	0.1705	4.0000	89.2254	161.4
INTERAC.	1	3.0110	2.5923	0.3715	4.35
ERROR	20				

Tabla XXII. Resultados obtenidos al realizar el análisis de varianza de dos factores en el diseño completamente aleatorio para la reproducibilidad del método, empleando los datos de las tablas XX, XXI y XXII para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona respectivamente.

LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

Al evaluar las concentraciones de 5 y 25 ng/ml de propafenona y sus metabolitos en plasma se determinó que la concentración mínima detectable y cuantificable es de 20 ng/ml.

FALLA DE ORIGEN

ESPECIFICIDAD

En la figura 14 se muestra la especificidad del método al emplear la mezcla de estándares en fase móvil pH = 2.5, plasma libre de fármaco y muestra plasmática conteniendo estándar interno, propafenona y sus metabolitos.

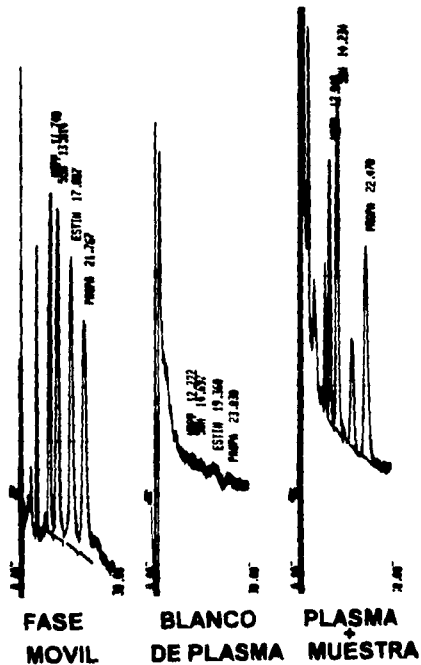


Figura 14. Cromatogramas que muestran la especificidad del método para la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona.

ESTABILIDAD

En la tabla XXIII y XXIV se muestran los resultados obtenidos al realizar la estabilidad de la propafenona, 5-OH propafenona y N- depropilpropafenona en plasma a una concentración de 500 ng/ml, a temperatura ambiente y de congelación (-20 °C) respectivamente.

Día	Propafenona	5-OH Propafenona	N- Depropilpropafenona
1	100.5	100.6	101.5
2	99.47	100.32	99.5
3	99.47	100.61	100.08
5	98.61	99.87	99.20

Tabla XXIII. Resultados obtenidos al realizar la estabilidad de la propafenona, 5-OH propafenona y N- depropilpropafenona en plasma a temperatura ambiente.

Día	Propafenona	5-OH Propafenona	N- Depropilpropafenona
1	100.27	101.36	99.86
2	100.63	100.32	99.95
3	99.84	98.03	99.89
5	98.65	99.88	100.0
10	98.26	100.40	99.50
30	99.02	100.24	99.38

Tabla XXIV. Resultados obtenidos al realizar la estabilidad de la propafenona, 5-OH propafenona y N- depropilpropafenona en plasma a temperatura de congelación (-20°C).

7.3 APLICACION DEL METODO

El método se empleo para la cuantificación de muestras plasmáticas de dos voluntarios, los resultados obtenidos son mostrados a continuación, determinandose solamente la propafenona y 5-OH propafenona, el metabolito N-depropilpropafenona no se detecto.

Resultados del estudio in vivo

Voluntario I

Tiempo (hrs)	PROPAFENONA Concentración (ng/ml)	5-OHP Concentración (ng/ml)
0.0	0.0	0.0
0.25	14.7	146.1
0.50	161.2	108.9
0.75	144.9	76.8
1.0	85.6	54.3
1.5	63.5	44.8
2.0	47.3	78.6
2.5	50.9	112.0
3.0	63.5	190.2
4.0	1837.6	779.1
6.0	535.5	272.7
9.0	193.8	87.0
12.0	161.2	70.1
24.0	63.5	9.5
48.0	47.3	19.5

Voluntario II

Tiempo (hrs)	PROPAFENONA Concentración (ng/ml)	5-OHP Concentración (ng/ml)
0.0	0.0	0.0
0.25	9.1	8.6
0.5	12.3	30.5
0.75	12.3	47.5
1.0	47.9	47.5
1.5	89.7	134.8
2.0	273.7	190.3
2.5	544.8	217.0
3.0	936.3	529.3
4.0	1282.6	386.5
6.0	650.2	190.3
9.0	334.0	234.9
12.0	138.2	74.3
24.0	62.9	11.8
48.0	27.3	11.8

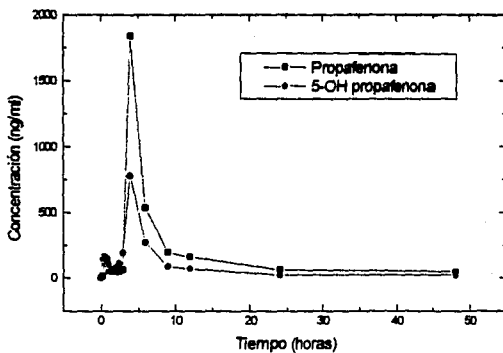


Figura 15. Determinación de propafenona y 5-OH propafenona en plasma, voluntario I

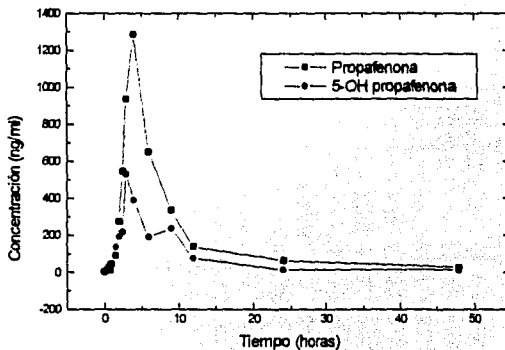


Figura 16. Determinación de propafenona y 5-OH propafenona en plasma, voluntario II.

8. ANALISIS DE RESULTADOS

DESARROLLO DEL METODO

Se evaluó en cada una de sus etapas con los parámetros de resolución y especificidad para cada uno de los componentes: propafenona, estándar interno, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona.

En la tabla IV se muestran los tiempos de retención obtenidos al emplear las condiciones iniciales y en la figura 5 se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones, la especificidad es adecuada pero la resolución no, el estándar interno presenta propiedades cromatográficas semejantes a la propafenona por lo que su tiempo de retención es semejante, sucediendo lo mismo entre los dos metabolitos. Con base en estos resultados se decidió modificar el porcentaje de acetonitrilo y de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH= 7 en la fase móvil, las condiciones y resultados obtenidos se muestran en la tabla V y la representación gráfica de estos resultados en la figura 4, en donde se observa el efecto de la variación del porcentaje de acetonitrilo y solución amortiguadora en el tiempo de retención. Los cromatogramas obtenidos con estas condiciones se muestran en la figura 5. Se observó que a un porcentaje entre 25 y 30 % de acetonitrilo se obtiene una adecuada separación entre la propafenona y el estándar interno y entre los dos metabolitos, eligiéndose la proporción de acetonitrilo en la fase móvil de 75:25 (solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH 7 : acetonitrilo). Con esta proporción se logra una mejor separación entre el estándar interno y el metabolito 5-OH propafenona, que con la proporción 70:30.

El tiempo de corrida bajo las condiciones anteriores fue de aproximadamente 30 minutos, por lo que se modificó el flujo de la fase móvil; las condiciones propuestas y resultados se muestran en la tabla VI y la representación gráfica y los cromatogramas obtenidos en las figuras 6 y 7, respectivamente. La resolución bajo estas condiciones se ve afectada solo con los flujos de 1.5 y 2 ml/minuto entre el estándar y la propafenona y el tiempo de

retención se ve disminuido, por lo que se decidió modificar la fase móvil adicionando metanol y manteniendo constante la proporción de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH 7. Las condiciones y los resultados obtenidos se muestran en la tabla VII, la representación gráfica y cromatogramas obtenidos en las figuras 8 y 9, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos muestran que al variar la proporción de acetonitrilo y metanol se favorece la resolución entre los picos cromatográficos de propafenona y el estándar interno, y entre los dos metabolitos, eligiéndose la proporción de 75:10:15 (solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1M pH7 :acetonitrilo:metanol) que presenta una buena resolución.

Con el fin de garantizar un tiempo de vida adecuado para la columna, otro de los parámetros que se evaluó fue el pH de la fase móvil, ya que el intervalo de pH adecuado para la columna es de 2 a 7. Las condiciones propuestas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII. La representación gráfica y los cromatogramas obtenidos en las figuras 10 y 11, respectivamente. En la figura 10 se observa que el aumento del pH de la fase móvil incrementa linealmente el tiempo de retención de la propafenona, del estándar interno y de los metabolitos de la propafenona. En la figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos al realizar la modificación del pH de la fase móvil, obteniéndose una separación adecuada entre pH 7 y 7.7. A pH menores los picos cromatográficos se juntan disminuyendo la resolución entre ellos. Debido a que el límite superior de pH de la columna es de 7 y no es adecuado trabajar a pH=7.7 ya que se rebasa dicho límite; por lo tanto se eligió el pH de 7.

Al evaluar los parámetros obtenidos al modificar el porcentaje de acetonitrilo y de solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1M pH=7, la velocidad de flujo, el porcentaje de acetonitrilo y del metanol, así como el pH, y al analizar los resultados obtenidos de la especificidad y la resolución entre la propafenona, el estándar interno y los metabolitos de la propafenona se determinó que las condiciones cromatográficas para evaluar la propafenona y sus metabolitos en plasma fueran las siguiente :

- Columna: 30 cm x 3.9 mm DI de acero inoxidable empacada con grupos ciano enlazados a partículas de sílice poroso con diámetro de 5 a 10 μm .
- Fase móvil: Mezcla de solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH=7 acetonitrilo-metanol (75:10:15) ajustar el pH a 7 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio 1N.
- Flujo 1 ml/min
- Longitud de onda 210 nm

VALIDACION DEL METODO

Se realizó empleando las condiciones cromatográficas mencionadas arriba. En las tablas IX, X y XI se muestran los resultados obtenidos al realizar la linealidad del sistema para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona. En la figura 12 se muestra la relación lineal que presentó el método cromatográfico, se graficó la concentración (ng/ml) de propafenona contra la razón de alturas entre la propafenona y el estándar interno; realizándose lo mismo para los dos metabolitos; la linealidad del sistema se analizó en el rango de 500 a 4000 ng/ml. Mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de una línea recta con los parámetros de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona, siendo la ecuación de la recta para la propafenona $Y = 0.00095 X - 0.00351$, para el 5-OH propafenona $Y = 0.00126 X - 0.00946$ y para la N-depropilpropafenona $Y = 0.00132 X + 0.05171$.

Así mismo, se realizó la linealidad del método con plasma cargado para propafenona y sus metabolitos en un rango de 20 a 1000 ng/ml, obteniéndose los resultados de las tablas XII, XIII y XIV, en la figura 13 se muestra la relación lineal obtenida al graficar la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona, los parámetros obtenidos al realizar el análisis de regresión por mínimos cuadrados se muestran en las mismas tablas. Obteniéndose la siguiente ecuación para la recta de propafenona $Y = 1.0013 X - 0.1506$, para 5-OH propafenona

$Y = 0.9999 X + 0.7046$ y para N-depropilpropafenona $Y = 0.9499 X + 0.4607$, con coeficientes de correlación iguales a 0.99.

La tabla XV muestra los resultados de la precisión del sistema en donde se observa que el coeficiente de variación obtenido con la propafenona y sus metabolitos es menor al 2% lo que indica que el método es preciso. La exactitud se analizó al efectuar recobros de cantidades conocidas adicionadas a muestras de plasma "blanco" de propafenona y de sus metabolitos siguiendo el método de extracción de la figura 3. En las tablas XVI, XVII y XVIII se muestran los resultados de la exactitud del método para propafenona y sus metabolitos, observándose que todas las concentraciones evaluadas se encontraron por encima del 85 % de recobro, lo cual indica una aceptable recuperación de la propafenona y los metabolitos al emplear el método de extracción de la figura 3. En la tabla XXII se muestran los resultados obtenidos al evaluar la reproducibilidad del método con los datos de las tablas XIX, XX y XXI para propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona, con dos diferentes analistas en dos días diferentes, indicando que no existen efectos debido al día, al analista, o a la interacción día-analista. En los cromatogramas de la figura 14 se observa la especificidad del método al adicionar a la fase móvil pH 2.5 y al plasma una mezcla de propafenona, estándar interno y los metabolitos de la propafenona, así como el cromatograma del plasma libre de fármacos, mostrando que el método es específico para cada una de las sustancias. Los resultados obtenidos al realizar la estabilidad de la propafenona y sus metabolitos en plasma a temperatura ambiente y de congelación (-20 °C) son mostrados en las tablas XXIII y XXIV respectivamente ya que el valor de la media del factor I (condición / tiempo) se encuentra dentro del intervalo de 98 - 102 % especificado para métodos cromatográficos.

APLICACION DEL METODO

Para evaluar el método se analizaron muestras de dos voluntarios a los cuales se les administraron oralmente 300 mg de propafenona en una dosis única, obteniéndose los perfiles farmacocinéticos mostrados en la figura 15 y 16, indicando que el método es adecuado para la cuantificación de propafenona y 5-OH propafenona, el metabolito N-

depropilpropafenona no se detecto en las muestras de plasma evaluadas, ya que la formación de los metabolitos depende de las características oxidativas y genéticas de los voluntarios, también se observó que los niveles plasmáticos obtenidos son mayores de 1000 ng/ml por lo que es conveniente realizar dos puntos con concentraciones mayores de para garantizar una mejor determinación y cuantificación de la propafenona y sus metabolitos.

9. CONCLUSIONES

Se encontraron las mejores condiciones cromatográficas para la evaluación de propafenona y sus metabolitos en plasma :

- Columna: 30 cm x 3.9 mm DI de acero inoxidable empacada con grupos ciano enlazados a partículas de sílice poroso con diámetro de 5 a 10 μ m.
- Fase móvil : Mezcla de solución reguladora de fosfato dibásico pH=7-acetonitrilo-metanol (75:10:15) ajustando el pH a 7.
- Flujo 1 ml/min
- Longitud de onda 210 nm

La validación del método indica que es lineal para propafenona con $Y = 1.0013 X - 0.1506$, para 5- OH propafenona $Y = 0.9999 X + 0.7046$, y para N-depropilpropafenona $Y = 0.9499 X + 0.4607$; con coeficientes de correlación iguales a 0.99, exacto con valores de por ciento de recobro del 94 al 103 % , preciso con coeficientes de variación menores al 2%, con limite de cuantificación de 20 ng/ml; y reproducible debido a que no existe efecto debido al día, al analista o a la interacción día-analista. La especificidad del método indica que no hay interferencia con compuestos endógenos presentes en el plasma, ni con los posibles metabolitos ya que estos también fueron evaluados en el desarrollo y validación del método. El método se empleo en la cuantificación de muestras plasmáticas obtenidas en dos voluntarios.

El análisis de resultados permite no rechazar la hipótesis alterna: El método desarrollado para la cuantificación de propafenona en plasma de seres humanos es adecuado si cumple con los parámetros de validación.

Se sugiere realizar 2 puntos de concentración mayor de 1000 ng/ml en la curva de propafenona, 5-OH propafenona y N-depropilpropafenona en plasma para garantizar una adecuada determinación y cuantificación en las muestra plasmáticas de los voluntarios en los estudios biofarmacéuticos.

10. BIBLIOGRAFIA

1. SMITH R.V. **TEXTBOOK OF BIOPHARMACEUTIC ANALISYS**. A description of methods for the determination of drugs in biologic fluids. ED. Lea & Febiger , USA pp 3-12, (1981)
2. Harapat R.S. y Kates E.R. High-performance liquid Chromatographic analysis of propafenone in human plasma samples. **J.Chromatogr.** 230,448-453. (1982)
3. Brode V.E,Sachse R. y Hoffmann H.D. Untersuchungen zur analytik von propafenon mittels interner analogstandardisierung **Arzneim.-Forsch./Drug Res.** 32(1),1-6.(1982)
4. Kannan R, Tidwell D. y Singh B. High-performance liquid chromatographic procedure for the quantitation of propafenone in serum and tissues. **J.Chromatogr.** 272,428-431. (1983).
5. Reza Mehvar. Liquid chromatographic analysis of propafenone enantiomers in human plasma. **J.Chromatogr.** 527,79-89. (1990)
6. Brode E, Kripp U y Hollmann M. Simultaneous determination of propafenone and 5-hydroxypropafenone in plasma by means of high pressure liquid chromatography. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.** 34(II),1455-1460. (1984)
7. Hoyer G.L. A HPLC method for the quantitation of propafenone and 5-hydroxypropafenone. **Chromatographia.** 25(12),1034-1038. (1988)
8. Mazzi G. Simple and practicable high-performance liquid chromatography assay of some tricyclic drugs, Haloperidol, Diltiazem, Verapamil, Propafenone and Amiodarone. **Chromatographia.** 24,313-316. (1987)
9. Marchesini B. y Tomasi L. Effects of modifiers on the chromatographic behaviour of propafenone and its major metabolites. **Chromatographia.** 24,753-758.(1987)
10. Kates R.E., Yee Y.G. y Winkle R.A. Metabolite cumulation during chronic propafenone dosing in arrhythmia. **Clin Pharmacol Ther.** 37,610-614. (1985)
11. Latini R., Sica A., Marchi S. Chen Z.M., Gavinelli M. y Benfenati E. High-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric identification of propafenone, 5-hydroxypropafenone and N-depropylpropafenone. **J.Chromatogr.** 424, 211-214.(1988)

12. Marchesini B., Boschi S., y Mantovani M.B. Determination of propafenone in serum plasma by electron-capture gas chromatography. **J.Chromatogr.**232,435-439. (1982)
13. Chan G.L., Axelson J.E., Abbott F.S., Kerr C.R. y McErlane K.M. Determination propafenone in biological fluids by fused-silica capillary gas chromatography using electron-capture detection. **J.Chromatogr.**417,295-308. (1987)
14. Chan G.L., Axelson J.E., Abbott F.S., Kerr C.R. y McErlane K.M. Determination of 5-hydroxypropafenone in biological fluids by fused-silica capillary gas chromatography using electron-capture detection. **J.Chromatogr.** 495,349-353. (1989)
15. The Merck Index. An Encyclopedia Chemical, Drugs and Biologicals. Eleventh edition. Edited by Budavari S. Merck and Co. Inc. Rahway NJ USA. pp.1239. (1989)
16. Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, p. 71 , (1989)
17. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Publicaciones PLM. 40 edición, pp.895-896,1174-1175, 1192-1193. (1994)
18. Naccarella F. Bracchetti D. Palmieri M. Marchesini B. y Ambrosioni E. Propafenone for refractory ventricular arrhythmias: correlation with drug plasma levels during long-term treatment. **Am J Cardiol.** 54,1008-1014. (1984)
19. Connolly S. Lebsack C. Winkle R.A., Harrison D.C. y Kates R.E. Propafenone disposition kinetics in cardiac arrhythmia. **Clin.Pharmacol.Ther.**36(2),163-168. (1984)
20. Bryson H.M. Palmer K.J. Langtry H.D. y Fitton A. Propafenone. A Reappraisal of its Pharmacology, Pharmacokinetics and Therapeutic Use in Cardiac Arrhythmias. **Drugs.** 45(1),85-130. (1993)
21. Muller-Peltzer H., Greger G., Neugubauer G. y Hollmann M. Beta-blocking and electrophysiological effects of propafenone in volunteers. **Eur J Clin Pharmacol.**25 831-833. (1983)
22. Funk-Brentano C., Kroemer H.K., Lee J.T., y Roden D.M. Propafenone. **The New England Journal of Medicine.**322(8), 518-525. (1990)
23. USP DI update. USPharmacopeial Convention. October Number 10,660-662,(1990)
24. Drug evaluation 6th edition, American Medical Association, p456,(1986)

25. Chan GL., Axelson L.E., Price J.DE., McErlane K.M., Kerr C.R. In vitro protein binding of propafenone in normal and uremic human sera. **Eur J Clin Pharmacol.** 36, 495-499. (1989)
26. Libardoni M., Piovon D., Busato E., Padrini R. Transfer of propafenone and 5-OH propafenone to foetal plasma and maternal milk. **British Journal of Clinical Pharmacology.** 32, 527-528. (1991)
27. The United States Pharmacopeia XXIII and National Formulary XVIII. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville MD USA p. 1768-1779, 1982-1984. (1995)
28. Skoog D.A. **PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS.** Third edition, Saunder College Publishing. USA pp.784-836.
29. Yost R.W. , **INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA PRACTICA**, Perkin-Elmer Corporation 1981.
30. Snyder L.R. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second edition, Ed. John Wiley & Sons, INC. 1973.
31. Galen W.E. Instrumental Methods of Chemical Analysis. Fourth edition, Ed. McGraw-Hill Book Company , USA, p 338- 411, 1975.
32. Pryde A. Applications of High Performance Liquid Chromatography. Ed. Chapman and Hall, USA, p 6-53, 1979
33. Catálogo de **CROMATOGRAFIA** en la química farmacéutica. Reactivos Merck.
34. Guerra J. Validation of analytical methods by FDA a laboratories. **Pharmaceutical Technology.** 3 74-83,(1986)
35. Kames T. Validation of Bioanalytical Methods. **Pharmaceutical Research.** 8(4),421-426, (1991)
36. Cardone M. Detection and Determination of Error in Analytical Methodology. Part. I In the Method Verification Program. **J. Assoc. Off Anal. Chem.** 66 (5),1257-1282, (1983)
37. Cardone M. Detection and Determination of Error in Analytical Methodology. Part. II Correction for Corrigible Systematic Error in the Course of Real Sample Analysis. **J. Assoc. Off Anal. Chem.** 66 (2),1283-1294, (1983)

38. Vinod P.S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. **Journal of Pharmaceutical Science**, 81(3),309-312(1992)
39. W. Larry. USP Perspectives on Analytical Methods Validation. **Pharmaceutical Technology**, 3 130-141.(1991)
40. Métodos Analíticos. Guía de validación editada por la secretaria de salud.
41. Vozech S., Haefeli W., Ha H.R., Viecek J. y Follath F..Nonlinear kinetics of propafenone metabolites in healthy man.**Eur J Clin Pharmacol**. 38,509-513. (1990)

11. APENDICE

11.1 PARAMETROS EMPLEADOS EN CROMATOGRAFIA

Dentro de la cromatografía se manejan algunos términos y símbolos característicos, siendo los más importantes:

Tiempo de retención (t_R)

Es el tiempo que la muestra permanece en la columna y se mide desde el momento en que se introduce la muestra al sistema hasta que se obtiene el máximo de su respuesta. Este tiempo de retención es característico para cada compuesto bajo las mismas condiciones de operación (figura 15).

Tiempo Muerto (t_0 ó t_m)

Es el tiempo que se necesita para eluir un compuesto que no se retenga en la columna, o sea, que no interacciona con la fase estacionaria (figura 15).

Tiempo de retención ajustado (t_R')

Es la diferencia entre t_R y t_0 , y este es el tiempo que el compuesto permanece en la fase estacionaria (figura 15).

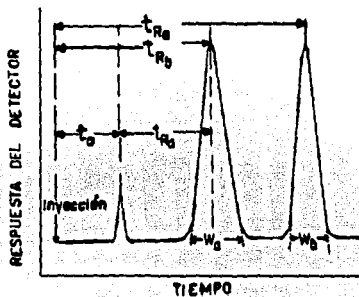


Figura 15. Cromatograma de los compuestos A y B

Ancho de la Base del Pico (W_b)

Es la línea base interceptada por las tangentes trazadas a ambos lados de la señal cromatográfica (pico del cromatograma figura 16).

Resolución

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos y se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$R = 2 \frac{\Delta t}{W_a + W_b}$$

$$\Delta t = t_{R2} - t_{R1}$$

W_a y W_b son los anchos de los picos de los compuestos a y b (figura 16).

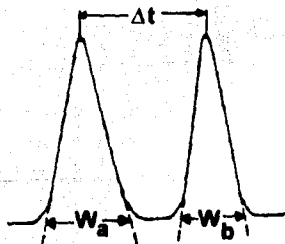


Figura 16. Resolución de los compuestos A y B.

Selectividad o Retención Relativa

Esto es la eficiencia del disolvente y su valor es :

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

donde:

t_R son los tiempos de retención ajustados de los compuestos 1 y 2

k son los coeficientes de distribución

k' son los factores de capacidad

Para optimizar la selectividad se pueden hacer cambios de la fuerza iónica de la fase móvil cambiando el porcentaje del cosolvente, el pH, la temperatura, el empaque de la columna o realizar efectos químicos especiales tales como complejación o par iónico.

Factor de capacidad (K')

Es la medida del equilibrio de distribución que existe para un determinado compuesto entre la fase móvil y estacionaria. Dada la forma en la que afecta este parámetro a la resolución, su valor debe permanecer entre 2 y 10.

Número de platos teóricos (N)

La eficiencia de una columna cromatográfica se mide por el número de platos teóricos.

Este parámetro se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

t_r = tiempo de retención del pico

W_b = es el ancho de la base del pico medido en las mismas unidades (mm, s, etc.) y se obtiene por extrapolación de las tangentes a los puntos de inflexión de la línea base (figura 16).

Altura de un plato teórico (HETP)

La altura de un plato teórico de una columna esta dada por:

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

L = longitud de la columna

n = número de platos teóricos

H depende del tamaño de la partícula del empaque de la columna

11.2 FÓRMULAS ESTADÍSTICAS EMPLEADAS EN LA VALIDACION

1. Desviación estándar (DE)

$$DE = \frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}$$

2. Coeficiente de variación (CV)

$$CV = \frac{DE \times 100}{\bar{X}}$$

3. Error estándar (E)

$$E = \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

4. Media (\bar{X})

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

5. Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{(n(\sum XY) - \sum X \sum Y)^2}{(n(\sum X^2) - (\sum X)^2)(n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2)}$$

6. Límite de confianza (< 95 %)

$$L95\% = \frac{X}{n} \pm IDE$$

7. Pendiente (m)

$$m = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

8. Intercepto (b)

$$b = Y - mX$$

9. Error estándar de regresión ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \frac{(n(Y - \bar{Y})^2)}{n - 2}$$

10. Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{(n \sum XY - \sum X \sum Y)^2}{(n \sum X^2 - (\sum X)^2)(n \sum Y^2 - (\sum Y)^2)}$$

11. Tabla para el análisis de varianza.

Fuente de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	F _{0.05}
Analista (<i>i</i>)	<i>i</i> - 1	SC _a	SC _a / gl _a	CM _a / CM _e	Fgl _a / gl _e
Día (<i>j</i>)	<i>j</i> - 1	SC _d	SC _d / gl _d	CM _d / CM _e	Fgl _d / gl _e
interacción Analista-día (<i>ij</i>)	(<i>i</i> - 1)(<i>j</i> - 1)	SC _{ad}	SC _{ad} / gl _{ad}	CM _{ad} / CM _e	Fgl _{ad} / gl _e
Error (<i>ijk</i>)	<i>ij</i> (<i>k</i> - 1)	SC _e	SC _e / gl _e	—————	—————

$\alpha = 0.05$

Si F_{cal.a} < F_{0.95}, No hay efecto debido al analista.

Si F_{cal.d} < F_{0.95}, No hay efecto por el día.

Si F_{cal.ad} < F_{0.95}, No hay efecto por interacción día-analista

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA