



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**" VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA  
CUANTIFICAR NAPROXENO SODICO EN PLASMA  
POR CLAR EN UNA COMBINACION DE NAPROXENO  
SODICO CON CLORHIDRATO DE AMBROXOL "**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A:  
NORMA CONTRERAS OLIVARES**

**ASESOR DE TESIS :  
M. en C. VICENTE ALONSO PEREZ  
COASESOR DE TESIS :  
Q. F. B. PEDRO ALONSO ALBARRAN**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO, MEXICO**

**1995**

**FALLA DE ORIGEN**



## **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).

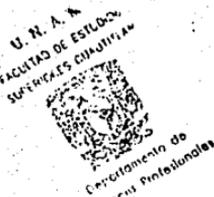
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



NIVEL NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo

"Validación de un método analítico para cuantificar naproxeno  
sódico en plasma por CLAR en una combinación de naproxeno  
sódico con clorhidrato de ambroxol".

que presenta la pasante: Norma Contreras Olivares.

con número de cuenta: 8507573-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 29 de Marzo de 1995

|               |                                          |
|---------------|------------------------------------------|
| PRESIDENTE    | <u>M. en C. Vicente Alonso Pérez</u>     |
| VOCAL         | <u>Q.F.B. Elia Granados Enriquez</u>     |
| SECRETARIO    | <u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>      |
| 1er. SUPLENTE | <u>Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera</u> |
| 2do. SUPLENTE | <u>Q.F.B. Efrén Hernández Baltazar</u>   |

# AGRADECIMIENTOS.

A: Dios y a mis padres.

Por haberme permitido existir, guiarme y hoy poder cumplir una de las metas más importantes en mi vida.

A mi querida maestra Q.F.I. CRISTINA REYES †.

Quien me ayudó mucho en mi formación académica y personal, ya que además de haber sido para mí, una guía profesional fué una gran amiga y siempre vivirá en mi corazón.

A mi asesor de tesis M en C. Vicente Alonso Pérez.

Por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la vida profesional en los laboratorios Syntex donde realice este trabajo de tesis.

A mi coasesor de tesis Q.F.B. Pedro Alonso Albarrán.

Por toda la invaluable ayuda que siempre me ha proporcionado y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, ya que sin su ayuda este trabajo de tesis no se hubiese sido posible.

A todos mis compañeros del departamento de Desarrollo Analítico.

No menciono nombres por temor a olvidar alguno, sin embargo quiero que sepan que siempre guardare un grato recuerdo de todos y cada uno de ustedes en mi corazón, puesto que les debo mucho de mi formación profesional.

A mi amiga M. en C. Guadalupe Clara Espinoza Martínez.

Por enseñarme a trabajar muestra biológicas y por proponerme este trabajo de tesis y ayudarme a desarrollarlo.

A mis amigas y amigos de la 15ava. Generación de Q:F.B.

Por compartir conmigo todos aquellos gratos y no tan gratos momentos que vivimos a lo largo de nuestra formación académica durante nuestra estancia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y en especial a Marisol, Vicky, Claudia, Andrés y Ramses quienes, siempre desde que los conozco han formado una parte importante en mi vida.

A mis profesores.

A todos y cada uno de los profesores que he tenido a lo largo de toda mi vida, ya que no puedo decir que tuve profesores malos todos fueron excelentes.

A los laboratorios Syntex.

Un especial agradecimiento a los laboratorios Syntex por haberme permitido realizar en sus instalaciones este trabajo de tesis al 100%.

# DEDICATORIAS.

A mis padres.

Dedico este trabajo de tesis a mis padres, puesto que nadie más que ellos merecen todo el crédito, ya que gracias a ellos hoy en día soy lo que soy, ya que su guía y apoyo, además de todo el amor que siempre me han proporcionado en todos los aspectos, ha sido el pilar de mi vida.

A mis queridos hermanos.

Eduardo, Javier, Adrián y Miguel Ángel, porque siempre están cuando los necesito.

A mis dos amores.

Mis dos pequeños sobrinos David y Andrea.

A mi abuelito Adrián Contreras Navarro †.

Porque dondequiera que él esté, quiero que sepa que gracias al amor que siempre nos proporciona tanto a mí como a mis hermanos hemos llegado a ser personas de provecho.

A las nuevas generaciones de Químicos Farmacéuticos Biólogos y a todas aquellas personas que este trabajo les pueda ayudar en su formación; les quiero dar las siguientes frases anónimas que les pueden ayudar a superarse día a día.

- La carrera no siempre la ganan los más veloces, sino aquellos que siguen corriendo.
- Si no tienes el valor de perder de vista la costa nunca podrás descubrir nuevos océanos.
- Nadie sabe que tan alto puede volar. Tú mismo no tendrás noción hasta que te atrevas a extender tus alas.
- No temas a los vientos de la adversidad, ten presente que sin viento no hay papalote que ascienda.
- Algunos sueñan con alcanzar grandes logros, otros se mantienen despiertos, se esfuerzan y los hacen posibles.
- El éxito es un viaje no un destino.
- El orgullo es un compromiso personal, es una actitud que separa a la excelencia de la mediocridad.
- La actitud que tomes ante la vida es algo pequeño que hace una gran diferencia.

## INDICE

| CONTENIDO                                                     | PÁGINA |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN.                                              | 5      |
| 2. GENERALIDADES.                                             | 9      |
| 2.1 Antecedentes Históricos del Naproxeno sódico.             | 10     |
| 2.1.1 Monografía del Naproxeno Sódico.                        | 11     |
| 2.1.2 Farmacología del Naproxeno Sódico.                      | 15     |
| 2.2 Generalidades sobre cromatografía de líquidos             | 19     |
| 2.3 Generalidades sobre biodisponibilidad y/o bioequivalencia | 30     |
| 2.4 Validación de métodos analíticos.                         | 37     |
| 3. ESTABLECIMIENTO DEL PROBLEMA.                              | 44     |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL.                                        | 48     |
| 4.1 Material.                                                 | 50     |
| 4.2 Condiciones experimentales.                               | 53     |
| 4.3 Procedimiento Analítico.                                  | 54     |
| 4.4 Validación del Método Analítico                           | 59     |
| 4.4.1 Especificidad.                                          | 59     |
| 4.4.2 Límite de detección y Límite de cuantificación.         | 61     |
| 4.4.3 Comparación de áreas contra alturas.                    | 64     |
| 4.4.4 Linealidad.                                             | 64     |
| 4.4.5 Exactitud.                                              | 65     |
| 4.4.6 Precisión.                                              | 65     |
| 4.4.7 Estabilidad.                                            | 67     |
| 4.4.8 Robustez.                                               | 68     |

| CONTENIDO                                                        | PÁGINA |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| 5. RESULTADOS.                                                   | 70     |
| 5.1 Especificidad.                                               | 71     |
| 5.2 Límite de detección y Límite de cuantificación               | 77     |
| 5.3 Comparación de áreas contra alturas                          | 87     |
| 5.4 Linealidad.                                                  | 90     |
| 5.5 Exactitud.                                                   | 100    |
| 5.6 Precisión.                                                   | 101    |
| 5.7 Estabilidad                                                  | 104    |
| 5.8 Robustez.                                                    | 105    |
| 5.8.1 Efecto de la proporción de fase móvil.                     | 105    |
| 5.8.2 Efecto de la cantidad de ácido en la fase móvil.           | 106    |
| 5.8.3 Efecto de la columna sobre los parámetros cromatográficos. | 107    |
| 6. DISCUSION DE RESULTADOS.                                      | 108    |
| 7. CONCLUSIONES.                                                 | 113    |
| 8. BIBLIOGRAFÍA.                                                 | 115    |

T Í T U L O

Validación de un Método Analítico para Cuantificar Naproxeno Sódico en Plasma por CLAR en una combinación de Naproxeno Sódico con Clorhidrato de Ambroxol.

2

**TÍTULO :**

"VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR  
NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA POR CLAR EN UNA  
COMBINACIÓN DE NAPROXENO SÓDICO CON  
CLORHIDRATO DE AMBROXOL"

## O B J E T I V O S.

**OBJETIVOS:**

ADECUAR UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA EN PRESENCIA DE CLORHIDRATO DE AMBROXOL.

VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA EN PRESENCIA DE CLORHIDRATO DE AMBROXOL.

1

I N T R O D U C C I O N

## 1. INTRODUCCIÓN

La humanidad desde sus comienzos se ha preocupado por buscar formas que ayuden a conservar la salud y aliviar el dolor. A finales de la edad media aparecen las preparaciones medicamentosas a base de extractos vegetales y sustancias arcillosas, dando así inicio a lo que actualmente conocemos como industria farmacéutica (1).

Como todas las industrias tienen su período de auge, la industria farmacéutica no fue la excepción. Al producirse los medicamentos a escala industrial y sin lineamientos específicos sobre su elaboración, sugieron graves problemas. Tal fue el caso que ocurrió en los Estados Unidos de Norteamérica en 1930, con una grave intoxicación en una población bastante considerable, con un elixir de sulfanilamida que contenía un agente extremadamente tóxico, dietilenglicol. Por lo que el congreso de este país dictó el acta Food Drug and Cosmetics FD&C, el cual estipulaba que se deberían elaborar productos seguros y confiables, además del acta que ya se había creado en 1906 Food Drugs Administrations (FDA), la cual regulaba las condiciones para la elaboración de medicamentos y alimentos (2).

Pero no fue hasta 1976, cuando se legisló la FDA, dando así un mayor peso regulatorio y al mismo tiempo la FDA, emite una serie de modificaciones a sus propuestas anteriores, incluyendo aquí por primera vez el concepto de validación (2).

En México la industria farmacéutica se basa principalmente en las regulaciones emitidas por la Secretaría de Salud y/o los de la FDA.

En las dos últimas décadas se ha discutido mucho acerca de la validación de procesos y de control de los procesos farmacéuticos debido en gran medida a que el desarrollo de los productos y procesos farmacéuticos no se llevan a cabo de una manera adecuada. Es por ello que surge la necesidad de la validación. Con la finalidad de obtener menos errores, menos demoras y una buena calidad en los resultados, para lograr productos con garantía para la preservación de la salud (3).

La Federal Drug Administration (FDA) define la validación como un proceso documentado que proporciona una gran seguridad de que un proceso específico,

generará consistentemente un producto que cumpla con las especificaciones y atributos de calidad y diseño preestablecidos. Mientras que La Secretaría de Salud (SSA) define a la validación como un método científico que proporciona la evidencia documental, para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación o proceso (3).

Por lo anterior se ha comprobado que cada vez es más necesario contar con métodos analíticos confiables (4). En el presente trabajo se pretende validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar naproxeno en plasma en una combinación de naproxeno sódico con clorhidrato de ambroxol, de acuerdo a los últimos requerimientos para fluidos biológicos emitidos por los diferentes organismos regulatorios, mundialmente reconocidos (4, 5 y 6).

Es necesario considerar, que la especificidad del método es un punto muy importante a evaluar, durante la validación del método analítico. Sobre todo en este caso, donde el método se desea utilizar en un estudio de bioequivalencia de un producto, que posee dos activos diferentes dentro de la misma formulación.

En general, la validación del método consistirá en evaluar lo siguiente:

- - Especificidad.
- - Linealidad
- - Repetibilidad
- - Exactitud
- - Límite de detección
- - Límite de cuantificación.
- - Estabilidad de la muestra
- - Robustez del sistema cromatográfico.

En la última década en diversos países, el tema de la biodisponibilidad de los fármacos ha sido motivo de preocupación para las Autoridades de Salud, sobre todo en los concerniente a seguridad y eficacia terapéutica. Por lo que resulta importante efectuar pruebas tales como disolución, estabilidad y pruebas de biodisponibilidad biológica, como características de calidad durante el desarrollo y la evaluación clínica de un medicamento (6, 7 y 8).

Las cualidades terapéuticas de un fármaco, deben estar basadas en evidencias clínicas, sin embargo, un fármaco cuya efectividad ha sido probada, puede llegar a ser un medicamento no efectivo, debido a la poca biodisponibilidad del principio activo (7).

En los estudios de disponibilidad biológica, realizados en el hombre se usan concentraciones en sangre, y/o concentraciones en orina del fármaco intacto y/o productos de biotransformación. Tales estudios deben estar debidamente diseñados y evaluados para que puedan revelar la verdadera disponibilidad de los fármacos. Si dicho estudio es diseñado y ejecutado adecuadamente, es suficiente un número pequeño de voluntarios para poder obtener datos confiables, y así determinar los principales parámetros farmacocinéticos como son: tiempo al que se alcanza la máxima concentración, tiempo de vida media biológica, constante de absorción, constante de eliminación, concentración plasmática máxima alcanzada, cantidad total absorbida, Área bajo la curva. Esto siempre y cuando se cuente con un método analítico perfectamente validado para su cuantificación (7, 8 y 10).

En un estudio de biodisponibilidad, los parámetros farmacocinéticos que se evalúan son: tiempo al que se alcanza la máxima concentración, constante de eliminación, concentración plasmática máxima alcanzada, cantidad total absorbida, áreas bajo la curva a diferentes tiempos. Sin embargo los parámetros que se utilizan estadísticamente para determinar la biodisponibilidad y/o bioequivalencia según los organismos regulatorios son: área bajo la curva (AUC), concentración plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) y tiempo al que se alcanza la máxima concentración del analito en cuestión. Los organismos regulatorios que establecen lo anterior son: Food Drug Administration (FDA.) y la Comunidad Económica Europea (CEE) (10).

Cuando se va a realizar un estudio de bioequivalencia y/o biodisponibilidad, lo primero que se debe de realizar antes que nada, es una investigación exhaustiva de todo lo que se haya realizado referente al fármaco de interés. Esto por acuerdo de las autoridades correspondientes, que indican que no se puede desarrollar otro método analítico para cuantificar al mismo fármaco. Sólo bajo la condición de que se demuestre que el nuevo método, supera en mucho al primero. Y sólo se permitirá adecuar el método ya existente, a las condiciones del laboratorio, que desee realizar este tipo de estudio.

Siempre que se haga algún cambio al método ya existente, se deberá realizar la revalidación del método (5). Como es el caso del método para naproxeno sódico, ya que sólo se van a adecuar las condiciones de un método ya existente a las condiciones del laboratorio y de la formulación, debido a que esta posee una combinación de fármacos, por lo que se debe de comprobar que el otro fármaco no interfiere en la cuantificación del fármaco de interés.

2

G E N E R A L I D A D E S

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL NAPROXENO SÓDICO.

Durante los últimos años, los fármacos antiinflamatorios no esteroides más recientes han conquistado en grado dominante, la aceptación médica para la reducción de la inflamación y el dolor en la artritis reumatoide y otros padecimientos reumáticos. Algunos han ganado preferencia al grado de haber desplazado el ácido acetilsalicílico de su posición tradicional como el fármaco de elección en una diversidad de indicaciones (11).

En el intento de buscar fármacos que alivien la inflamación y el dolor; se ha tenido especial éxito en los compuestos derivados del ácido propiónico; tales como el naproxeno y naproxeno sódico, esto es debido a que su mecanismo de acción, es básicamente a nivel de músculos; mediante estudios se ha comprobado que estos compuestos poseen propiedades clínicamente importantes como inhibidores de la síntesis de prostanglandina-sintetasa (11 y 12).

Estos compuestos han demostrado tener un orden elevado de eficacia en aliviar la inflamación y el dolor en un amplio espectro de padecimientos reumáticos. Más recientemente se ha encontrado que el naproxeno y naproxeno sódico son potentes inhibidores de las agregaciones plaquetarias; por lo tanto, útil en la profilaxis de los ataques de migraña (12).

El naproxeno es un antiinflamatorio no esterooidal administrado oralmente, el cual tiene propiedades analgésicas y antipiréticas. Es administrado generalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juveniles, así como paliativo para el dolor moderado y el tratamiento de la primera dismenorrea (11).

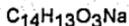
Cuando se administra oralmente, se absorbe completamente, Presentando un tiempo de 2 hrs., para alcanzar la máxima concentración plasmática. Es eliminado del cuerpo por medio de la O-desmetilación y la acilglucoronación (13).

### 2.1.1 MONOGRAFÍA DEL NAPROXENO SÓDICO.

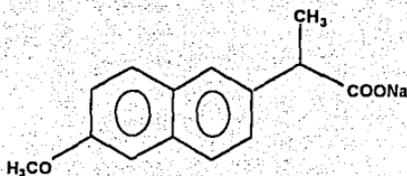
#### NOMBRES QUÍMICOS Y SINÓNIMOS (14):

Sal sódica del ácido S-6-metoxi-2-naftil acético.  
Sal sódica del ácido (+)-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-naftalen acético.  
Sal sódica del ácido(d)-2-(6-metoxi-2'-naftil) propiónico.  
Sal sódica del ácido S-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-naftil acético.  
Naproxeno Sódico.

#### FORMULA CONDENSADA(14):



#### FORMULA DESARROLLADA (11):



pKa = 4.74

#### PESO MOLECULAR (14):

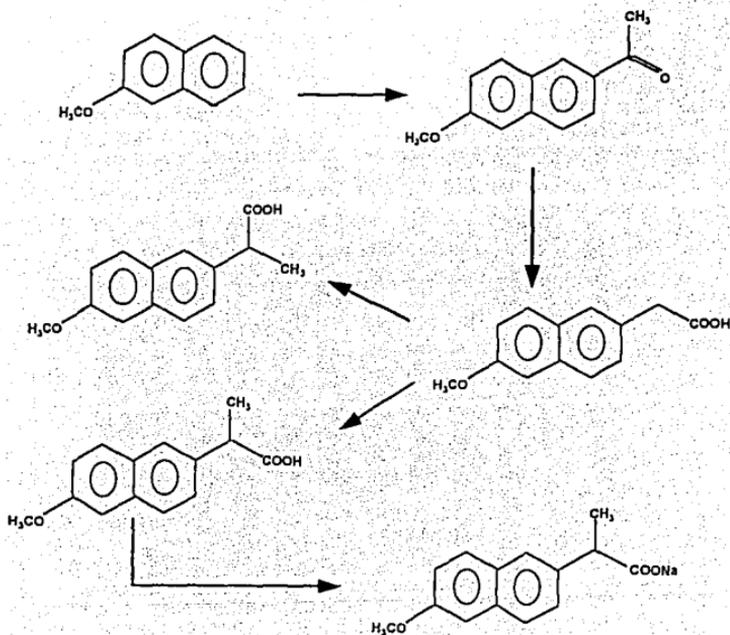
252.25

DESCRIPCIÓN (13, 14):

Polvo cristalino, blanco o ligeramente crema, sabor amargo y picante, sin olor o casi inodoro.

Moderadamente higroscópico, absorbe un promedio de 1% a 35% de humedad relativa.

SINTESIS (12):



#### SOLUBILIDAD (14):

Muy soluble en agua y metanol, soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona y cloroformo y muy ligeramente soluble en tolueno y benceno.

#### ENSAYOS DE IDENTIDAD (15):

Temperatura de fusión: funde a 251-253°C con descomposición.

#### ROTACIÓN ESPECÍFICA (15):

Una solución al 1% del ácido, presenta una rotación específica de +63.0° a +68.5°. Su rotación como sal sódica en agua a 25° C, es aproximadamente -14°.

#### ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO (15).

El espectro de absorción al infrarrojo en bromuro de potasio (1:400) presenta los siguientes máximos:

| ASIGNACION                       | LONGITUD DE ONDA |
|----------------------------------|------------------|
| Eter metílico aromático          | 1260             |
| Dobles ligaduras aromáticas      | 1600-1625        |
| Grupos carbonilos (carboxilatos) | 1725             |

#### ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA (15).

Una solución al 0.002% en solución 1.0N de hidróxido de sodio en metanol, exhibe máximos a : 262, 273, 316 y 330 nm

Validación de un Método Analítico para Cuantificar Naproxeno Sódico en Plasma por CLAR en una combinación de Naproxeno Sódico con Clorhidrato de Ambroxol.

14

#### RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (15).

El espectro de una solución concentrada de la sal sódica usando como pico de referencia el tetrametil silano, presenta los siguientes valores:

| ASIGNACIÓN                     | FRECUENCIA $\delta$ ppm |
|--------------------------------|-------------------------|
| -CH-CH <sub>2</sub> (dobletes) | 1.50                    |
| -O-CH <sub>3</sub>             | 3.83                    |
| -CH-COO (cuarteto)             | 3.66                    |
| Protones aromáticos            | 7.13 - 7.83             |

#### ENSAYOS DE PUREZA (15).

- Metales pesados: No más de 30 ppm
- Sustancias extrañas relacionadas: No más de 2% , no más de 1% del ácido libre.
- Pérdidas al secado: Secado a 105°C durante 3 horas en vacío pierde no más de 1 % de su peso.
- Claridad de solución: Una solución al 1% en metanol debe ser clara y libre de materia extraña
- pH en solución: El pH de una solución 1:20 en agua debe ser entre 7.5 y 9.0

#### ESTUDIOS DE ESTABILIDAD (15).

- Estabilidad acelerada: En condiciones de calor ( 60° C) y humedad (79% H.R.) durante 6 semanas, no se presenta descomposición o cambio de apariencia que afecte la estabilidad.
- Estabilidad a largo plazo: No presenta ningún cambio a temperaturas de 25° , 37° y 45° C por un período de 31 meses.

## 2.1.1 FARMACOLOGÍA DEL NAPROXENO SÓDICO Y FARMACOCINÉTICA

### MECANISMO DE ACCIÓN.

El naproxeno sódico es un agente no esteroide, que presenta notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, igual que otros fármacos antiinflamatorios no esteroides su mecanismo de acción, todavía no ha sido bien establecido. Se cree que su eficacia terapéutica está basada en su potente inhibición de la síntesis de prostaglandinas. No es un corticoesteroide, como se indica, ni tampoco ejerce su efecto farmacológico por estimulación del sistema hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS). Inhibe la prostaglandina sintetasa. Además reduce la hiperagregación plaquetaria, que se ha observado durante la etapa prodómica de la migraña. El tiempo de vida media del naproxeno es de aproximadamente 13 horas (12 y 13).

Las prostaglandinas evocan respuestas anti-inflamatorias y piréticas in vivo, y se sabe que el naproxeno bloquea la síntesis de prostaglandinas a partir de su precursor, el ácido araquidónico (12).

En asociación con la respuesta inmune del cuerpo a la lesión tisular, se produce migración celular y liberación de varias sustancias químicas. Este proceso se llama quimiotaxis. Específicamente, se acumulan leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en el sitio de la lesión tisular y liberan ciertas sustancias químicas, llamadas enzimas lisosómicas, que contribuyen al daño celular. Se ha sugerido que los efectos antiinflamatorios y antirreumáticos de naproxeno podrían ser atribuidos, en parte, a su capacidad para suprimir la quimiotaxis al inhibir la migración de PMNs y la liberación subsecuente de enzimas lisosómicas (12).

## ABSORCIÓN, METABOLISMO Y EXCRESIÓN.

El naproxeno es un fármaco ácido, con un alto grado de fijación a la albúmina. Es absorbido con rapidez y en forma prácticamente completa. La absorción de naproxeno no es alterada significativamente por los alimentos.

Las concentraciones séricas de naproxeno aumentan en proporción a la dosis administrada hasta 500 mg, obteniendo una respuesta lineal. Además, conforme aumentan las concentraciones séricas, también lo hacen las tasas de eliminación y excreción; esto ha sido explicado por la saturación aparente por los puntos de fijación a la albúmina sérica (16), lo cual produce más fármaco libre, no fijado, que es eliminado rápidamente através de los riñones. Este fenómeno sugiere que las concentraciones séricas alcanzables de naproxeno podrían ser limitadas, lo cual, cuando menos en teoría, podría limitar, a su vez, los efectos tóxicos en caso de una sobredosis, satura las enzimas metabolizantes y promueve una acumulación creciente (13).

El naproxeno atraviesa la barrera placentaria de 20 a 30 minutos después de su administración por vía oral, aparece en leche de las mujeres lactantes en una concentración de aproximadamente del 1% del nivel en el suero materno (17).

El naproxeno es biotransformado en el hígado, y excretado por orina, básicamente como productos de biotransformación inactivos (glucurónidos), el producto de biotransformación de naproxeno detectado en el hombre, es el 6-desmetilnaproxeno. Tanto naproxeno como este producto de biotransformación son excretados en la orina (17).

## EFFECTOS SECUNDARIOS.

Los síntomas gastrointestinales asociados con naproxeno han sido indigestión, náuseas, pirosis y malestar o dolor abdominal. Los efectos secundarios en el sistema nervioso central son cefalea, vértigo o aturdimiento, incapacidad para concentrarse y somnolencia, con reportes ocasionales de sudoración, depresión, tinnitus y otros trastornos auditivos.

Puesto que las acciones farmacológicas del naproxeno no son mediadas a través del eje hipofisario-suprarrenal, no debe esperarse ninguno de los efectos adversos de supresión corticosuprarrenal.

El naproxeno no debe ser administrado a pacientes con úlcera péptica activa.

El naproxeno debe ser empleado con mucha precaución en pacientes con deterioro significativo de la función renal; en estos pacientes se recomienda monitorear la creatinina. En algunos pacientes de edad avanzada en quienes pueda esperarse deterioro de la función renal, debe considerarse una reducción de la dosis diaria. También se recomienda proceder con precaución cuando se requieran altas dosis en pacientes ancianos y en pacientes con deterioro de la función hepática (11 y 13).

#### INTERACCIONES CON OTROS FÁRMACOS.

Como naproxeno tiene un alto grado de fijación a la albúmina sérica, posee potencial teórico de interacción con otros fármacos que se fijan a la albúmina, tales como ácido acetilsalicílico (ASA), warfarina, sulfonilureas, e hidantoínas. Esta interacción puede presentarse pero en la mayoría de los casos no parece tener importancia clínica.

Cuando se administran naproxeno y ASA de una manera concomitante, se obtienen concentraciones séricas muy bajas de cada uno de los dos fármacos, además de que el aclaramiento renal para naproxeno aumenta. Pero es posible que este efecto no altere significativamente la eficacia del naproxeno, pues el tratamiento combinado ha demostrado ser más eficaz, que cuando solo se administra ASA.

En pacientes que reciben dicumarol o warfarina, la adición de naproxeno al tratamiento podría prolongar el tiempo de protrombina, por consiguiente, los pacientes que reciban esta terapéutica anticoagulante, deben ser vigilados estrechamente durante la administración de naproxeno (12 y 13).

#### APLICACIONES CLÍNICAS.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos se utilizan primariamente para el tratamiento de la artritis reumatoide, en pacientes que no toleran o no responden al ácido acetilsalicílico (11 y 13).

#### REACCIONES ADVERSAS E INDESEABLES.

En modelos experimentales se ha demostrado que todos estos fármacos pueden causar irritación gástrica y erosiones hemorrágicas. En los humanos, la reacción indeseable más localizada es de tipo gastrointestinal. Comparados con el ácido acetilsalicílico, la hemorragia gastrointestinal oculta es menos frecuente y severa, aunque en pocas ocasiones se observa hemorragia gastrointestinal o desarrollo de úlcera péptica ( 12 y 13).

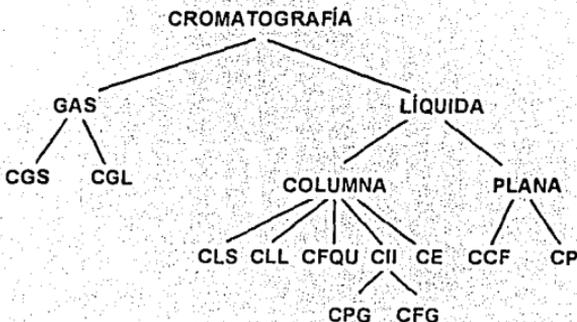
Entre los efectos sobre el SNC se incluyen episodios transitorios de mareo, cefalea, vértigo y tinnitus. Rara vez se presenta visión borrosa, disminución de la agudeza visual y dificultad para distinguir colores, de manera transitoria; estos síntomas remiten cuando se suspende la medicación (12 y 13).

## 2.2 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.

La cromatografía es un método que permite separar, identificar y aislar los componentes de una mezcla de compuestos químicos mediante la distribución de una muestra entre dos fases: una estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido, la fase móvil puede ser un líquido o un gas (18).

### CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA.

Los dos grandes campos en los que se clasifica actualmente a la cromatografía son: cromatografía de gases y cromatografía líquida, estos a su vez sufren una subclasificación, dependiendo de las características de las fases estacionarias y de las fases móviles, como se pueden ver a continuación (18).



#### Métodos cromatográficos:

- CGS: cromatografía gas-sólido
- CGL: cromatografía gas-líquido
- CLS: cromatografía líquido-sólido
- CLL: cromatografía líquido-líquido
- CFQU: cromatografía de fase químicamente unida
- CII: cromatografía de intercambio iónico
- CCF: cromatografía de capa fina
- CP: cromatografía de papel
- CE: cromatografía de exclusión
- CPG: cromatografía de permeación en gel
- CFG: cromatografía de filtración en gel.

Las técnicas cromatográficas incluyen todo proceso en el que la separación de una mezcla es realizada por la adsorción diferencial o solución de los componentes individuales entre dos fases inmiscibles.

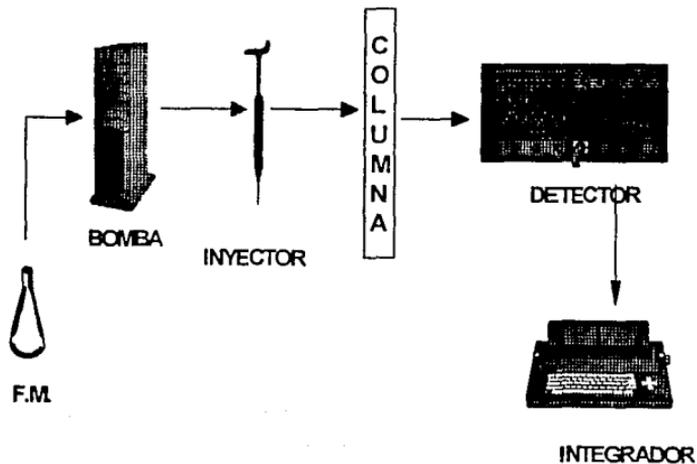
La forma común de la separación cromatográfica es la retención selectiva de cada uno de los componentes de una muestra en la fase estacionaria; esta retención selectiva es debida a diferencias en adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica entre el soluto y la fase estacionaria involucrando también un sistema de transporte o fase móvil. Las diferentes velocidades de elución de cada compuesto dependen de la distribución relativa o partición de dicho soluto entre las dos fases (19).

La cromatografía líquida de alta resolución es una modalidad de la cromatografía de líquidos en la cual la fase estacionaria se encuentra empaquetado en una columna y la fase móvil, es un líquido que fluye a través de la primera (20).

### COMPONENTES BÁSICOS DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (18).

A continuación se describen brevemente los principales componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta presión (18).

Esquema



### FASE MÓVIL (F.M.) (18).

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la fase móvil es muy importante.

La fase móvil es el transporte de la muestra por lo cual debe reunir las siguientes características:

1. Debe disolver la muestra.
2. No debe degradar o disolver la fase estacionaria.
3. Debe tener baja viscosidad.
4. Debe tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna. Un valor de factor de capacidad ( $K'$ ) entre 2 y 10 es adecuado.
5. Debe ser de alta pureza.
6. No debe ser corrosiva (No debe interaccionar con las partes internas del cromatografo, como, tuberías, valvulas, celdilla, etc.)

La fase móvil puede ser un disolvente o una mezcla de disolventes.

Los más comúnmente usados en cromatografía de líquidos de alta presión son:

- Para fase reversa: acetonitrilo, metanol, etanol y agua.
- Para fase normal: clorofomo, hexano y tolueno

### SISTEMA DE BOMBEO (18, 19 y 21).

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos de alta presión, están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían muy lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

1. Presión máxima de operación (400 bar).
2. Intervalos de volúmenes obtenibles entre 0.5 y 10 mL/min.
3. Reproducibilidad y constancia de flujo.
4. El flujo debe ser continuo.

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

#### SISTEMA DE INYECCIÓN (18 y 21).

La introducción de la muestra se realiza con una jeringa de capacidad muy pequeña (10 a 250  $\mu$ L). La muestra se deposita en una pequeña cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

Actualmente se emplean inyectores automáticos, es decir válvulas inyectoras, que realizan las funciones de un analista cuando eran inyectores manuales.

Los sistemas de inyección se fabrican de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable, el diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.

#### COLUMNA (18, 19 Y 21).

La columna junto con la fase móvil, son la parte vital de un sistema cromatográfico. En la columna es donde se va a llevar a cabo la separación de los compuestos de la mezcla.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones, el que comúnmente se utiliza es el acero inoxidable.

Los avances en tecnología de columnas pueden resumirse como sigue:

1. Elaboración de partículas de tamaño muy reducido ( $3\mu$ ).
2. Uniformidad del tamaño de partículas.
3. Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
4. Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

#### -Fases Estacionarias.

En cromatografía de líquidos de alta presión, las dimensiones de las partículas de los materiales empleados son muy pequeñas y muchas veces estas partículas tienen forma regular. A algunos de estos materiales se les llama pelliculares, y otros contienen fases líquidas químicamente unidas a la superficie del material.

Partículas de relleno poroso, gel de sílice y alúmina principalmente son más o menos grandes. Solo se utilizan materiales porosos cuyas partículas sean de tamaño menor a  $50\mu$ .

Otros tipos de materiales usados son los llamados adsorbentes pelliculares, también conocidos como adsorbentes de capa porosa, de porosidad superficial o de centro sólido.

La eficiencia de la columna está en función del diámetro, tamaño de partícula, velocidad de flujo, temperatura y tamaño de muestra (19).

Los parámetros cromatográficos que se utilizan más comunmente para evaluar las columnas cromatográficas son los siguientes:

- **NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N).**

Un Plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se determina como sigue:

$$N = 16 (Tr/Wb)^2$$

En donde:

Tr = tiempo de retención.

Wb = es el ancho del pico resultante de la triangulación del mismo con la línea base.

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna (19).

- **ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEÓRICO (AEPT).**

Se calcula de la siguiente manera:

$$AEPT = L/N$$

Donde:

L = longitud de la columna (m)

N = número de platos teóricos.

Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y, por tanto la columna será más eficiente.

- **FACTOR DE CAPACIDAD.**

$$K' = (T_1 - T_0) / T_0$$

Donde,  $T_1$  = tiempo de retención del compuesto de interés.

$T_0$  = tiempo de retención de un solvente no retenido.

- RESOLUCIÓN.

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenida entre dos compuestos.

$$R = 2(T_{r2} - T_{r1}) / (W_2 + W_1)$$

Donde:

$T_r$  = es el tiempo de retención de uno de los compuestos.

$W$  = es el ancho de la base del pico resultante de la triangulación del mismo.

Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa.

- SELECTIVIDAD ( $\alpha$ ).

La selectividad esta dada por la siguiente ecuación:

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

Donde  $K'_2$  = factor de capacidad del componente 2

$K'_1$  = factor de capacidad del componente 1

En donde valores elevados de  $\alpha$  significan mejores separaciones.

En forma práctica, se puede decir que  $\alpha$  es una medida de la afinidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

## PARÁMETROS QUE AFECTAN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

Existe un conjunto de parámetros que pueden determinar el máximo rendimiento del sistema cromatografico como son: tiempo de retención, velocidad de la fase móvil, resolución, eficiencia de la columna y concentración máxima que puede ser inyectada.

Todos estos parámetros pueden combinarse en infinidad de maneras, de modo que es posible atacar el problema de la optimización mediante varias teorías distintas muchas de las cuales no son viables en la práctica (25).

Los parámetros primordiales que definen la calidad del análisis son:

- Tiempo de análisis requerido.
- Presión, la cual condiciona la velocidad de la fase móvil y por tanto el flujo.
- Longitud y diámetro medio de las partículas de la columna

#### SISTEMAS DE DETECCIÓN (22).

Los detectores más utilizados para cuantificar activos en fluidos biológicos, cuando la separación es por cromatografía de líquidos, son: de luz ultravioleta y el de fluorescencia.

El detector es el que va a indicar la respuesta de la señal que se este obteniendo.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o al evaluar las cualidades de un determinado diseño deben tomarse en cuenta sus propiedades generales, tales como: respuesta, sensibilidad, ruido, linealidad y la estabilidad.

A continuación se mencionan algunos de los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos de alta presión.

a).-DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA.

b). -DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

#### A)-DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA.

Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

Hay tres tipos de detectores de luz ultravioleta.

- a). El de longitud de onda variable: que no solo es, de aplicación más variada y sensible, sino también más costoso.
- b). El fotómetro de luz ultravioleta, es relativamente insensible a los cambios de flujo y de temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro.
- c). El detector ultravioleta por arreglo de diodos. La diferencia de este con el detector ultravioleta convencional, es que este posee un fotomultiplicador ó fotodiodo que consiste generalmente de 211 elementos o diodos, cada uno con 50 $\mu$ m de amplitud que nos permite obtener un espectro completo desde 190a 600 nm. Realizando el barrido en 10 msec. Con este tiempo todos los 211 fotodiodos son leídos y generalmente se obtiene algo así como 20,000 datos puntuales por segundo. Este detector se usa generalmente en cromatografía de líquidos para determinar pureza de pico.

#### B).-DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Actualmente es el detector más sensible. En buenas condiciones es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos (10-12 picogramos), lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtro para seleccionar la radiación de excitación y la emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

#### SISTEMAS REGISTRADORES.

Su función principal es representar un registro gráfico de la señal dada por el detector. Las características deseables de los registradores son: la velocidad variable del papel y la respuesta rápida de la pluma.

Actualmente existen sistemas de almacenamiento de datos, donde se puede procesar toda la información cromatográfica a través de un procesador (computadora) soportada por un software ó paquete para cromatografía.

#### VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN CLAR (18).

| VENTAJAS                                                                                                                                                                                                                                | DESVENTAJAS                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Mayor velocidad de análisis.</li><li>2. Alta resolución.</li><li>3. Buena sensibilidad.</li><li>4. Automatización.</li><li>5. Amplio espectro de aplicaciones.</li><li>6. Exactitud.</li></ol> | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Instrumentación costosa.</li><li>2. Elevado costo de operación.</li><li>3. Personal capacitado.</li></ol> |

## **2.3 GENERALIDADES SOBRE BIODISPONIBILIDAD Y/O BIOEQUIVALENCIA.**

### **ALGUNOS TÉRMINOS Y PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS (6).**

#### **BIOFARMACIA.**

Es la rama de las ciencias farmacéuticas que se encarga del estudio de las relaciones entre las propiedades fisicoquímicas de un fármaco en una forma de dosificación y la respuesta observada después de la administración.

#### **FARMACOCINÉTICA.**

Es el estudio de la cinética de absorción, distribución, biotransformación y excreción de fármacos y algunas sustancias endógenas. El propósito es estudiar el tiempo, la concentración del fármaco, productos de biotransformación en diferentes tejidos y excreciones, además el construir modelos adecuados para interpretar éstos datos.

#### **BIODISPONIBILIDAD.**

Es el grado y la velocidad a la cual el principio activo contenido en un medicamento es asimilado por el cuerpo.

## **BIOEQUIVALENCIA.**

Es cuando dos formas farmacéuticas diferentes que contienen el mismo principio activo y son administradas en el mismo regimen de dosificación presentan la misma biodisponibilidad.

## **EQUIVALENTE TERAPÉUTICO.**

Son productos farmacéuticos que contienen idénticas cantidades de ingrediente activo (fármaco) en idéntica dosis, pero no necesariamente debe contener los mismos excipientes.

## **ALTERNATIVAS FARMACÉUTICAS.**

Son productos farmacéuticos que contienen el mismo ingrediente terapéutico o el precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma de dosificación.

## **PRODUCTOS FARMACÉUTICAMENTE BIOEQUIVALENTES.**

Pueden ser equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que presentan una velocidad de absorción y no muestran una diferencia significativa cuando son administrados a la misma dosis molar del ingrediente terapéutico a similares condiciones de experimentación.

Algunos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas pueden ser equivalentes hasta cierto punto, en cuanto a su absorción y hasta ahora pueden ser considerados bioequivalentes.

## MODELOS FARMACOCINÉTICOS.

Los modelos farmacocinéticos son utilizados para describir, interpretar y resumir el curso temporal de un fármaco en el organismo.

## PORQUE SE DEBEN DE REALIZAR ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD Y/O BIOEQUIVALENCIA.

En los últimos quince años y en diversos países, el tema de la biodisponibilidad de los medicamentos ha sido motivo de preocupación para las autoridades de salud; sobre todo en lo concerniente a seguridad y eficacia.

Nunca se puede estar seguro cuando diferentes productos farmacéuticos, que contienen la misma sustancia activa, van a ejercer el mismo efecto.

Numerosos estudios han demostrado que las preparaciones farmacéuticas aparentemente idénticas o químicamente equivalentes; por ejemplo, aquellas que contienen la misma cantidad de ingrediente activo con especificaciones precisas, no siempre producen los mismos resultados, esto es, no siempre poseen la misma biodisponibilidad (7).

Cuando se tienen productos genéricos y se intenta utilizarlos de manera intercambiable, debe definirse la biodisponibilidad y probarse la bioequivalencia de tales productos.

La biodisponibilidad esta dada, por la cantidad de fármaco intacto que pasa a la circulación general y por la velocidad a la cual esto ocurre, dos medicamentos son bioequivalentes si sus respectivas biodisponibilidades son semejantes. Partiendo de los resultados y del análisis estadístico desarrollado, se puede concluir la bioequivalencia de las formulaciones probadas (7 y 23).

En México, ya existen algunas guías para realizar estudios de bioequivalencia. Estas guías son recomendaciones que se proponen para efectuar este tipo de estudios. Por su naturaleza, las guías intentan incluir cualquier tipo de fármaco; sin embargo, cada caso debe ser considerado individualmente (7).

Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los estudios de biodisponibilidad están confinados a la medición cuantitativa de los fármacos en los fluidos biológicos. Por lo tanto, estas guías se refieren a las pruebas de biodisponibilidad utilizando datos farmacocinéticos. El empleo de datos farmacodinámicos debe basarse en modelos que hayan demostrado ser discriminatorios para las diferencias en velocidad y cantidad de absorción (23 y 24).

Se considera que los productos farmacéuticos, con el mismo principio activo, son bioequivalentes cuando su absorción (velocidad y cantidad) no difiere de una manera importante. Para el propósito de estas guías se acepta que la bioequivalencia refleja equivalencia terapéutica.

La forma más conveniente de demostrar bioequivalencia es efectuar un estudio comparativo de biodisponibilidad, de preferencia con el producto original o "innovador", con un producto cuya bioequivalencia esté establecida o con el que se haya demostrado una correlación "in vitro - in vivo". Estos productos en proceso de registro no deben diferir normalmente por más de  $\pm 20\%$  de la biodisponibilidad promedio; este requisito se aplica especialmente a la cantidad de fármaco absorbido. Sin embargo, el límite es arbitrario y existen otros parámetros que pudieran ser adecuados considerando factores como el índice terapéutico de un fármaco en particular.

Un producto farmacéutico puede ser equivalente al de referencia en cuanto a la cantidad de absorción, pero no en cuanto a su velocidad de absorción y a pesar de eso ser considerado bioequivalente porque las diferencias en la velocidad de absorción pueden no ser relevantes clínicamente (7).

Es necesario demostrar la biodisponibilidad de todos los fármacos en el ser humano, y sobre todo aquellos que aparecen en la bibliografía mundial con problemas de inequivalencia terapéutica comprobada o tengan un índice terapéutico estrecho.

Se consideran los siguientes criterios para identificar las sustancias medicamentosas que necesitan ser evaluadas mediante un estudio de biodisponibilidad, de acuerdo con la secretaría de salud (7).

- Productos que contienen una sustancia activa, clínicamente reconocida como de disponibilidad variable.
- Productos que contienen una sustancia cuya biodisponibilidad es incompleta por su poca solubilidad, o porque tienen que pasar primero por el hígado donde son biotransformadas primordialmente.
- Formas farmacéuticas orales de liberación controlada (sostenida).
- Productos que se promuevan como alternativas de formas farmacéuticas orales, incluidos los que se absorben por la piel y mucosas y los que se administran por medio de implantes intramusculares y subcutáneos.
- Productos que deben garantizar una respuesta terapéutica uniforme y sostenida, como son: anticoagulantes, antiarrítmicos, antidiabéticos, broncodilatadores, citostáticos, inmunosupresores, antiinfecciosos (antibióticos, antiparasitarios y antiviricos), hormonas y otros agente empleados en el tratamiento de las enfermedades endocrinas.

De acuerdo con la secretaría de salud los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia generalmente no se requieren cuando (7).

- El producto es de uso exclusivamente endovenoso, o por inhalación y que contiene la misma concentración de ingredientes activos que el ya registrado.
- Cuando el fármaco se destina para uso terapéutico local ( aún cuando éste no elimina la posibilidad de estudiar su paso a circulación general)
- Cuando el producto difiere solamente en relación a la cantidad de sustancia activa de otro que tiene la misma forma farmacéutica, la misma proporción de componente activo y aditivos , elaborado por el mismo fabricante, siempre y cuando la biodisponibilidad del primer producto haya sido demostrada y la farmacocinética sea lineal. Los dos productos deben reunir los requisitos de una prueba adecuada in-vitro (perfil de disolución).
- Cuando el producto haya sido reformulado en relación al colorante, edulcorante o preservativo y sea elaborado por el mismo fabricante, siempre y cuando la biodisponibilidad sea conocida y las dos versiones reúnan los requisitos de una prueba adecuada in-vitro (perfil de disolución).
- Soluciones, elixires y jarabes para administración oral que contengan el ingrediente activo en la misma concentración y dosis que el producto innovador y ningún otro ingrediente que pueda modificar significativamente su absorción.

En Estados Unidos de Norteamérica básicamente en FDA, ya existe un libro, llamado "Orange Book", donde vienen todos los activos que existen en la actualidad y ahí se indica si son o no susceptibles a un estudio de biodisponibilidad en base a diferentes características, como puede ser: la forma farmacéutica, o sus características fisicoquímicas y/o farmacológicas (25).

Los parámetros que se utilizan estadísticamente para determinar biodisponibilidad y/o bioequivalencia según los organismos regulatorios (24), como son: Food Drug Administration (FDA.), Canada y la Comunidad Económica Europea (EC) son:

- Area bajo la curva (AUC)
- Concentración plasmática máxima (C<sub>máx</sub>)
- Tiempo al que se alcanza la máxima concentración del analito en cuestión (t<sub>máx</sub>)

## 2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La ciencia farmacéutica es una disciplina dinámica, en que todos los días hay nuevas reglas para corregir los problemas del ayer. Esta es una dificultad para establecer o dirigir la validación de métodos. Sin embargo es muy importante validar los procedimientos asociados a los diferentes tipos de análisis para el estudio de fármacos (5).

La forma de validación de un método analítico dependerá de su futura aplicación, es decir, si éste va a ser utilizado en control de calidad, en pruebas de estabilidad o en análisis de fluidos biológico: Sin embargo, para todos ellos es recomendable contar con parámetros estadísticos que indiquen la exactitud, precisión, especificidad, linealidad, sesgo, susceptibilidad, límite de detección del método que se está evaluando (23, 27 y 28).

Es indispensable llevar a cabo la validación de los métodos analíticos, empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus productos de biotransformación en fluidos biológicos, para poder confiar en los resultados analíticos; sobre todo en estudios de biodisponibilidad y poder así determinar con toda certeza la disponibilidad biológica del o (los) principio(s) activo(s) contenido(s) en una forma farmacéutica.(9).

El éxito de un estudio de biofarmacéutico in-vivo involucra un análisis de datos farmacocinéticos dependiendo directamente de la sensibilidad y especificidad del método analítico empleado (29).

A continuación se presentan algunas definiciones y los parámetros estadísticos empleados en la validación de métodos en fluidos biológicos (7, 9, 23, 28, 30).

**Especificidad** es la capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material químico y biológico por analizar.

Por lo que se establece que para determinar la especificidad se debe verificar que los materiales endógenos al fluido biológico y a la forma farmacéutica, así como los productos de biotransformación no interfieran con el análisis y que no exista reactividad cruzada (9).

**Linealidad.** Es la cualidad del método analítico para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo determinado. Los parámetros estadísticos que se emplean para su evaluación son:

- Coeficiente de correlación ( $r$ ): es una medida de la variación lineal de las variables y mide el grado de asociación lineal entre ellas.
- Pendiente ( $m$ )
- Intercepto ( $y_0$ )

En fluidos biológicos, una calibración para ser lineal, no tiene que ser necesariamente una línea recta, es suficiente con que el coeficiente de correlación tenga un valor de  $1.0 \pm 0.01$ , esto es que incluya por lo menos dos nueves depues del punto decimal. El coeficiente de correlación se

presenta como una evidencia de la linealidad, el cual establece la relación entre las observaciones y los valores predeterminados (29).

Las curvas patrón que se elaboren para evaluar la linealidad deben de contener al menos seis niveles de concentración diferentes y el intervalo de concentraciones empleadas, debe de incluir a la concentración máxima esperada, así como el nivel más bajo el cual debe estar dentro del límite de cuantificación (9).

Repetibilidad (Precisión). Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia de determinaciones independientes realizadas por un solo analista, un mismo aparato y técnica (23). Los estadísticos mediante los cuales se determina el grado de repetición son:

- La media ( $\bar{x}$ ).
- La desviación estándar (DE).
- El coeficiente de variación (CV).

El criterio de aceptación para la precisión es no más del 15% de coeficiente de variación.

Exactitud. Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar y coeficiente de variación.

El criterio de aceptación para la exactitud es no más del 15% de coeficiente de variación.

Límite de detección. Es la cantidad mínima de la sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. En otras palabras el límite de detección es la concentración más baja del analito en cuestión que se puede diferenciar realmente del nivel de ruido (23 y 31).

Límite de cuantificación. Es la cantidad mínima de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas. Este es un parámetro de suma importancia sobre todo cuando se trata de validar métodos analíticos que van a ser utilizados en la cuantificación de fármacos para estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia, ya que se va a requerir determinar cantidades lo más pequeñas posibles con el fin de definir, lo más completamente posible, el perfil de absorción o eliminación del fármaco. (23 y 32).

Estabilidad de la muestra. Es la verificación de la muestra bajo las diferentes condiciones a las que puede estar sometida antes de ser analizada, con el fin de asegurar que el fármaco de interés en la muestra no ha sufrido algún tipo de degradación antes de ser analizado y obtener así datos confiables y precisos. El estadístico que se emplea para evaluar la estabilidad es el valor de coeficiente de variación. El criterio de aceptación para la estabilidad de la muestra es, no más del 15% de coeficiente de variación (9, 31 y 32).

Robustez del sistema cromatográfico. Es la susceptibilidad del sistema cromatográfico para aceptar pequeños cambios, en cuanto a la composición de la fase móvil, pH, o incluso cambio de la columna cromatográfica. Esto es, cuando hablamos de robustez nos referimos a la repetibilidad del método cuando se realizan pequeños cambios (5).

La robustez del sistema se realiza con el fin de evitar estar revalidando el método cada vez que se tengan que realizar ligeros cambios (5).

Adaptabilidad del sistema cromatográfico. Son los parámetros cromatográficos bajo los cuales se debe trabajar al aplicar el método analítico, como son : número de platos teóricos, resolución, factor de coe, y factor de capacidad.

Las investigaciones biofarmacéuticas y de estabilidad casi invariablemente empiezan con la medición de la concentración del fármaco. Una precondition para delinear conclusiones válidas de tales estudios, es que el procedimiento analítico mida realmente en términos cuantitativos y específicos la sustancia que se desea determinar (33 y 34).

La validez de un procedimiento cuantitativo para este tipo de estudios es juzgada generalmente en base a la exactitud, precisión, sensibilidad o límite de cuantificación y linealidad del método (29).

La exactitud denota el grado al cual determinado valor experimental concuerda con el valor absoluto o verdadero. Actualmente en la determinación de la exactitud se utilizan curvas de calibración y estándares internos (5).

La exactitud se expresa en términos de error:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{valor verdadero} - \text{valor experimental}}{\text{valor verdadero}} \times 100$$

En los análisis biofarmacéuticos o de estudios de estabilidad, un factor que contribuye muy significativamente a errores en las mediciones es la falta de especificidad del método. Este problema se presenta en estudios de biodisponibilidad cuando los productos de biotransformación del fármaco tienen respuestas similares a las del principio activo en el ensayo, y en los estudios de estabilidad cuando los productos de degradación responden en forma similar al principio activo en el ensayo (33 y 34).

El efecto de las interacciones del principio activo con los excipientes no puede ser ignorado en la metodología analítica, ya que frecuentemente estas interacciones originan valores falsos en las determinaciones cuantitativas.

Generalmente la validación en estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia se divide en dos fases, una que es previa al estudio, que es la que se trata en el presente trabajo y la otra fase es la que se realiza durante el estudio de las muestras de los voluntarios para determinar biodisponibilidad (9 y 31) y básicamente consisten en lo siguiente:

La primer fase consiste en la evaluación del método analítico antes del estudio de disponibilidad biológica, en donde se evalúa linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, así como las diferentes características del método con respecto a robustez, especificidad, etc.

La segunda fase consiste en la evaluación de la precisión del método durante el estudio de biodisponibilidad y básicamente es lo siguiente:

Se trabajan puntos de control de calidad, analizándolos de igual manera que las muestras de los voluntarios y se cuantifican de manera intercalada entre las muestras de los voluntarios.

Estos puntos de control de calidad no son otra cosa que fluido biológico limpio (el que se este utilizando para cuantificar el activo en cuestión que puede ser, plasma, suero, sangre, orina, saliva, etc) cargados de manera independiente a las curvas de calibración, con el analito de interés a tres niveles de concentración; bajo, medio, y alto.

**Nota:** un fluido biológico limpio es aquel que no contiene el fármaco por cuantificar o algún otro que interfiera con el mismo.

3

E S T A B L E C I M I E N T O  
D E L P R O B L E M A.

### 3. ESTABLECIMIENTO DEL PROBLEMA.

En 1977 la Food Drug Administrations (FDA) emite las regulaciones sobre estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia con la finalidad de incrementar la calidad y seguridad de los medicamentos. Apartir de entonces las autoridades mundiales de la salud toman cartas en el asunto y se empiezan a organizar una serie de foros y conferencias para discutir los lineamientos que se deben seguir para realizar los estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia, así como las características que debe cumplir el método analítico empleado en este tipo de estudios (9).

Para cumplir con la normatividad mundial con respecto a los métodos analíticos a utilizar en un estudio de biodisponibilidad y/o bioequivalencia; como es el revisar en la literatura todos los estudios de este tipo que se hayan realizado para él ó los fármacos de interes. Este caso no fue la excepción y se revisó todo lo referente a naproxeno sódico (antiinflamatorio no esterioide) y a clorhidrato de ambroxol (agente con actividad mucolítica) que son los dos activos presentes en la nueva formulación que se desea estudiar.

Se encontró que sean realizado muy pocos estudios de este tipo, para ambos fármacos. Y solo se han hecho de manera independiente, esto es, se ha desarrollado un método analítico para cada uno de los activos.

En el caso de la formulación estudiada (combinación de naproxeno sódico con clorhidrato de ambroxol) se pretendió cuantificar ambos activos con el mismo método analítico; pero debido a las características de cada uno de los activos esto fue imposible, por lo que se tuvo que desarrollar una metodología analítica para cuantificar cada uno de los activos de manera independiente. El fluido biológico que se eligió para realizar la cuantificación fue plasma.

Al revisar los estudios biofarmacéuticos sobre naproxeno sódico se encontró que existen varios métodos analíticos para la cuantificación del activo en plasma.

Entre los métodos reportados para la determinación del naproxeno sódico en plasma, donde se emplean técnicas cromatográficas, se encuentran los estudios realizados por Runkel y colaboradores (35) quienes utilizaron un método por cromatografía de gases, en donde se hace una esterificación previa

Otros métodos que también desarrollaron estos investigadores fueron por cromatografía de líquidos, donde se realiza una doble extracción.

El método de detección reportado para realizar la cuantificación en cromatografía de gases es el detector por ionización de flama (FID) y los métodos de detección reportados en cromatografía de líquidos son fluorometría, espectrofotometría ultravioleta y electroquímica ó amperométrico, como se puede ver en la siguiente tabla:

| MÉTODO        | DETECCIÓN                                                   | SENSIBILIDAD | REFERENCIA |
|---------------|-------------------------------------------------------------|--------------|------------|
| HPLC          | UV (254 *)                                                  | 40 ng/mL     | 36         |
| HPLC          | UV (229 *)                                                  | 2 ng/mL      | 37         |
| HPLC          | UV (230 *)                                                  | 1 µg/mL      | 38         |
| GC            | FID                                                         | -            | 35         |
| GC            | FID                                                         | 2 µg/mL      | 39         |
| HPLC          | UV (254 *)                                                  | 1 µg/mL      | 40         |
| FLUOROMÉTRICO | λ <sub>excitación</sub> 235 *<br>λ <sub>emisión</sub> 350 * | 0.1 µg/mL    | 40         |
| HPLC          | UV (340 *)                                                  | 1 µg/mL      | 41         |
| HPLC          | UV (240 *)                                                  | -            | 42         |
| HPLC          | UV                                                          | 1.5 µg/mL    | 34         |
| HPLC          | UV(254 y 370 *)                                             | -            | 43         |
| HPLC          | Amperométrica                                               | 10-20 ng/mL  | 44         |
| HPLC          | UV (293 *)                                                  | -            | 45         |
| HPLC          | UV (254 *)                                                  | 0.5 µg/mL    | 46         |

\* = nanómetros

El método analítico propuesto, en este trabajo para la cuantificación del naproxeno sódico en plasma es un método sencillo y práctico (47).

**Resulta importante la validación de los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, puesto que la validez y confianza de los resultados que se deriven de un análisis de muestras biológicas para un estudio de biodisponibilidad dependerá en gran medida de la calidad del método analítico utilizado, ya que al utilizar un método validado se puede afirmar con toda certeza que las concentraciones encontradas son las reales o las más cercanas a las reales. Por lo que el control de calidad de los procedimientos asociados al análisis biofarmacéutico del estudio de fármacos, tiene que ser bien establecido, considerando que el control de calidad de los procedimientos o método analítico no es otra cosa que la validación de los mismos.**

**Por todo lo anterior se infiere que la validación de los métodos analíticos es de vital importancia y es por ello que el objetivo del presente trabajo es adecuar y validar un método analítico para cuantificar naproxeno sódico en plasma. Este método servirá para cuantificar el activo en el plasma posterior a la administración oral de la nueva formulación (naproxeno sódico más clorhidrato de ambroxol) en cualquiera de sus dos presentaciones tabletas y/o suspensión.**

4

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

Se adecuó el método analítico para cuantificar Ketorolac en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución (47) (Método AMC #015 SYNTEX PALO ALTO, ADENDUM II), a las condiciones internas del laboratorio de Desarrollo Analítico en Syntex, México.

Para la cuantificación de naproxeno sódico en plasma, se seleccionó la columna para cromatografía de líquidos con la que se obtuvieran los mejores resultados (partiendo de la reportada en la metodología en la que se basó). Se seleccionó el estándar interno que mejor se adecuó a las condiciones de extracción y a las condiciones cromatográficas empleadas. Esto es que no interfiriera con el tiempo de retención del pico de interés y que presentará una buena resolución, además de todas las características que debe de cumplir una sustancia para considerarse estándar interno como son: una alta pureza, no interferencia y solubilidad semejante al activo de interés.

El método analítico utilizado como ya se mencionó es uno ya reportado en la literatura, para cuantificar Ketorolac, sólo que se realizaron las modificaciones pertinentes para cuantificar naproxeno sódico en plasma, tras una administración oral de naproxeno sódico, en una administración oral (tableta o suspensión) de una forma farmacéutica que posee una combinación de dos activos que son: naproxeno sódico y clorhidrato de ambroxol en las siguientes dosis:

| FORMA FARMACÉUTICA | HCl Ambroxol | Naproxeno Sódico |
|--------------------|--------------|------------------|
| Tabletas           | 30 mg/tab    | 275 mg/tab       |
| Suspensión         | 15 mg/5 mL   | 200 mg/5 mL      |

#### 4.1 MATERIAL

##### SOLVENTES:

- Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt .
- Acetato de etilo Reactivo Analítico, Mallinckrodt.
- Agua grado cromatográfico, Tecsiquim .
- Etanol grado Reactivo Analítico, Mallinckrodt.
- Hexano grado Reactivo Analítico, Baxter.
- Metanol grado cromatográfico, Mallinckrodt.

##### REACTIVOS:

- Acetato de sodio grado Reactivo Analítico., Merck.
- Acido acético glacial grado Reactivo Analítico., J.T. Baker.
- Acido Fosfórico al 85% grado Reactivo Analítico, J.T. Baker.
- Hidróxido de potasio Reactivo Analítico, J.T. Baker.
- Glucosa lote 81H0710 Sigma.
- Heparina
- Acido Cítrico R. A. Lote 513 Técnica Química S.A.
- Citrato trisódico dihidratado Merck.

## FLUIDO BIOLÓGICO:

Plasma Humano certificado (el certificado avala la calidad del plasma, esto es certifica que se le realizaron una serie de pruebas bioquímicas con el fin de verificar que no es posible una contaminación por la utilización de plasma infectado, como podría ser el caso de VIH, hepatitis y brucelosis entre otras).

## ESTANDARES:

- Naproxeno sódico, sustancia de referencia (Sustancia obtenida en SYNTEX Cuernavaca, Mor). Lote: C3JD232 Syntex DIFA.
- Propilparabeno sustancia de referencia interna, Lote: 76F0284 SIGMA.
- O-desmetilnaproxeno Lote: 8760-27B Syntex Research. Palo Alto California. USA
- Clorhidrato de Ambroxol R.A., Lote: 97F0635 SIGMA.

## CRISTALERIA:

- Matraces volumétricos de 500, 100, 50, 25 y 10 mL.
- Pipetas graduadas de 10 y 1 mL.
- Pipetas volumétricas de 25, 10, 4, 3, 2, 1 y 0.5 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 4 y 2 lt.
- Matraces Erlenmeyer con tapón esmerilado de 250, 150 y 125 mL.
- Probetas graduadas de 500 y 250 mL.
- Jeringa Hamilton de 250 µl.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Pipetas pasteur.
- Tubos de ensayo de (13 mm x 100 mm) y (15 mm x 126 mm).
- Viales para inyector automático Wisp.
- Microviales con adaptador para viales de inyector automático.
- Matraces Kitazato de 1 y 2 lt.

#### OTROS:

- Vasos de precipitados de 4 lt de plástico.
- Bulbos y perillas para pipetas.
- Gradillas para tubos de ensaye.
- Gradillas para viales.
- Guantes de látex.
- Mascarilla de seguridad para solventes (3M).

#### EQUIPO:

- Cromatógrafo de líquidos Waters, equipado con bomba isocrática Modelo 6000, inyector automático WISP 712D, detector de longitud de onda fija con apertura de 250 a 254 nm, modelo 440, Waters.
- Integrador modelo 3396 serie II, Hewlett-Packard.
- Columna Analítica, Adsorbosphere C18, 5 micras de 150 mm x 4.6 mm, Alltech.
- Balanza analítica Modelo 1712, Sartorius
- Baño de ultrasonido modelo B-52, Branson.
- Bomba de vacío y presión equipada con gradilla para evaporación, BARNANT.
- Campana de extracción. Alder (Equipos para Laboratorio).
- Cronómetro (Timer). Digital Timer Quartz. Whatman® Mini timer 99 minute.
- Mezclador. Maxi-Mix, Modelo 16700 Thermolyne.
- Agitador magnético Modelo PC-320 Corning. Laboratory Stirrer/Hot plate

- Embudo de filtración para solventes con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  Modelo OM-39 Millipore.
- Cámara de enfriamiento (-15° C) American.
- Micropipetas Finnpiptete digitales de 200-1000 $\mu\text{L}$  y de 50-200 $\mu\text{L}$ ,
- Labsystems

#### 4.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES.

##### Condiciones Cromatográficas

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Flujo .....               | 1.0 mL/min.       |
| Presión .....             | 1000 Psi          |
| Longitud de onda .....    | 254 nm            |
| Temperatura .....         | Ambiente          |
| Volumen de inyección .... | 5 $\mu\text{L}$ . |
| Velocidad de carta .....  | 0.4 cm/min.       |
| Tiempo de corrida .....   | 17 min.           |
| Atenuación .....          | 64 mV             |

### 4.3 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

#### PREPARACION DE SOLUCIONES.

- **Fase Móvil.**

La fase móvil empleada fué de Acetonitrilo:Agua en una proporción de 36:64 con 0.05 mL de ácido fosfórico para un litro de fase móvil.

- **Mezcla para reconstituir.**

Se preparó la siguiente mezcla:  
Acetonitrilo:Agua:Metanol, 18:37:45

- **Preparación de la solución buffer de acetatos pH= 3.0**

Se preparó una solución de acetato de sodio 0.5 M (se pesaron 10.3 g de acetato de sodio, se disolvieron y llevaron al aforo con agua en un matraz volumétrico de 250 mL)

- **Solución buffer de acetatos pH = 3.0.**

Se mezcló en un matraz erlenmeyer de 125 mL, 12 mL de la solución de acetato de sodio 0.5M, con 13.1 mL de ácido acético glacial y se verificó el pH, que resultó dentro del intervalo de  $3.0 \pm 0.5$

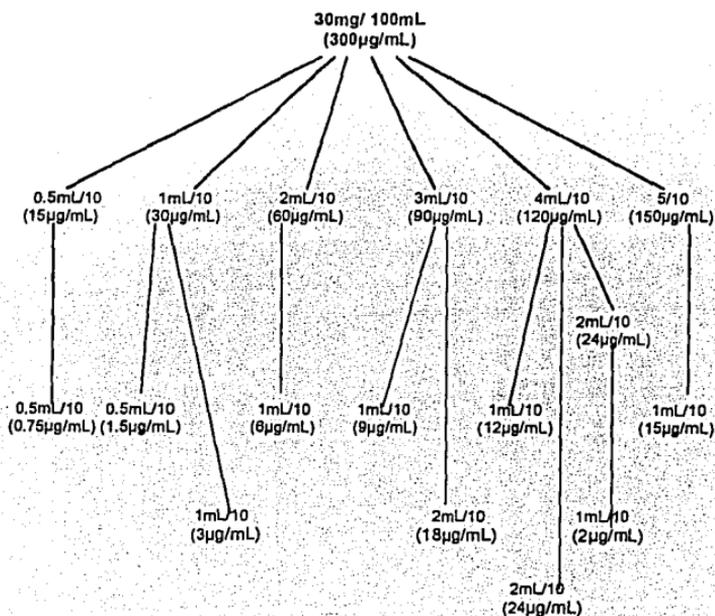
- **Preparación de la solución de estandar interno:**

Se pesó el equivalente a 25 mg de propilparabeno, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y llevó al volumen con una mezcla de metanol:agua 90:10, se tranferió una alícuota de 2mL a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó al volumen con la misma mezcla de metanol:agua 90:10, para obtener una concentración final de 20 µg/mL.

• **Preparación de plasma cargado con naproxeno sódico:**

a) Curvas para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación

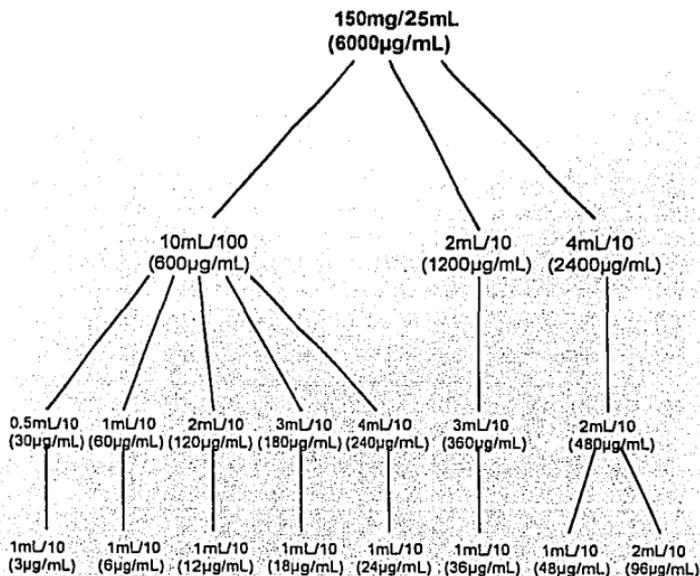
Para cada una de las curvas patrón se pesó aproximadamente 30 mg de naproxeno sódico sustancia de referencia, se disolvió y llevo al volumen en un matraz de 100 mL. Se realizarón las siguientes diluciones para lograr las concentraciones requeridas.



Nota: Todas las diluciones fueron realizadas con agua destilada a excepción de la última dilución que fue realizada con plasma limpio.

b) Curvas para determinar linealidad

Para cada una de las curvas patrón se pesó aproximadamente 150 mg de naproxeno sódico sustancia de referencia, se disolvió y llevó al volumen en un matraz volumétrico de 25 mL y se realizaron las siguientes diluciones para lograr las concentraciones requeridas.



Nota: Todas las diluciones fueron realizadas con agua destilada a excepción de la última dilución que fue realizada con plasma limpio.

## MÉTODO ANALÍTICO

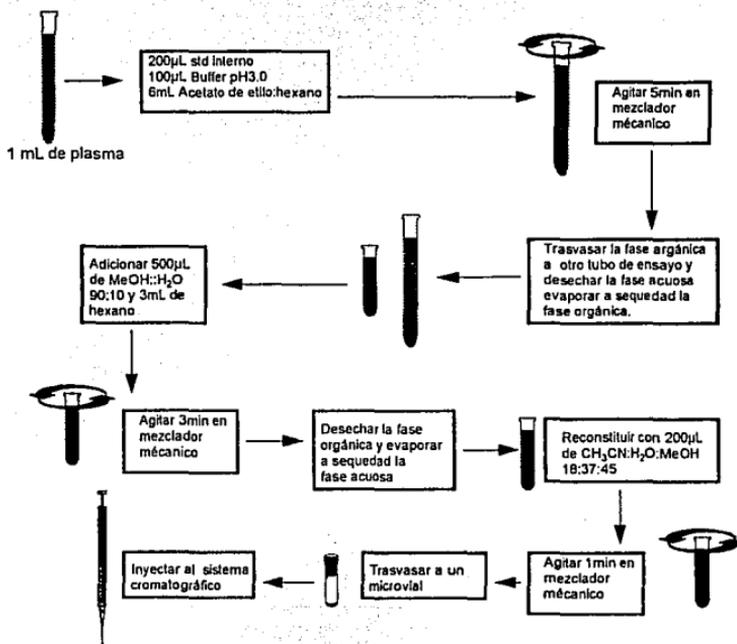
Proceso de extracción del naproxeno sódico de la matriz biológica (plasma).

A 1 mL de plasma se adicionó 200  $\mu$ L de una solución de propilparabeno como estándar interno (20  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L de un buffer de acetatos (pH=3) y 6 mL de una mezcla de acetato de etilo:hexano 30:70. Se agitó durante 5 min, con mixer, se dejó reposar durante 5 min. Se trasvasó la fase orgánica con pipeta pasteur a un tubo de ensayo, se evaporó a sequedad con aire y se reconstituyó con 500  $\mu$ L de una mezcla metanol:agua 90:10, se adicionaron 3 mL de hexano RA, se agitó en mixer por 3 min y se dejó reposar durante 3 min. Se desechó la fase superior (hexano) y se evaporó la fase metanólica a sequedad. Finalmente se adicionaron 200  $\mu$ L de acetonitrilo:agua:metanol, 18:37:45, y se inyectaron 5  $\mu$ L en el sistema cromatográfico.

Nota: el plasma utilizado debe estar previamente cargado con naproxeno sódico.

### DIAGRAMA DE FLUJO

Proceso de extracción del naproxeno sódico de la matriz biológica (plasma).



#### 4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

En la validación del método analítico se evaluaron las siguientes características: especificidad (incluyendo pureza de pico), linealidad, exactitud, precisión, estabilidad de la muestra, límite de detección y límite de cuantificación, repetibilidad del sistema, robustez del sistema cromatográfico, adaptabilidad del sistema cromatográfico, comparación de la cuantificación por áreas y por alturas de las señales cromatográficas.

##### 4.4.1 ESPECIFICIDAD.

La validación del método se inició probando la especificidad de la técnica seleccionada, es decir, se demostró que la respuesta es debida solamente al analito en cuestión, esto es, demostrar que no haya interferencia del plasma ni del principal producto de biotransformación (O-desmetilnaproxeno), así como de las sustancias adicionadas para la conservación del plasma como pueden ser los anticoagulantes; también se probó la no interferencia de los reactivos adicionados para la extracción del naproxeno sódico del plasma.

La especificidad del método también fue determinada para clorhidrato de ambroxol, que es un compuesto endógeno a la forma farmacéutica probada.

Cuando se está probando la especificidad del método se pueden presentar otras señales (debidas al metabolito, reactivos y anticoagulantes), sin embargo dichas señales no deben de interferir con los tiempos de retención de los picos de interés, como son; el del analito en cuestión y el del estándar interno.

También se verificó la pureza de los picos de interés, como son el del estándar interno, propilparabeno y naproxeno sódico en una muestra de plasma cargado, esto con el fin de cerciorarnos que no existen sustancias en la muestra que estén presentando una respuesta espectrofotométrica que interfiera en la cuantificación analítica de activo. Dicho análisis de pureza de pico se realizó en un cromatógrafo de líquidos que posee un detector por arreglo de diodos

Para probar la especificidad del método, se realizó lo siguiente:

- Se trabajaron como mínimo 3 muestras de plasma limpio (plasma limpio es aquel que no contiene el principio activo) con el proceso de extracción antes mencionado, sólo que sin adicionarle estándar interno, en su lugar sólo se adiciona el volumen correspondiente de la mezcla metanol:agua 90:10. Esto equivale a las muestras blanco de plasma.
- También se trabajaron muestras de plasma adicionado con el metabolito (O-desmetilnaproxeno), el estándar interno (propilparabeno), los anticoagulantes empleados (heparina, ácido cítrico, glucosa y citrato de sodio) y el clorhidrato de ambroxol (compuesto endógeno a la forma farmacéutica probada). Tratándose, con el procedimiento de extracción sin estándar interno, con el fin de verificar si presentan algún tipo de respuesta.
- Así mismo se trabajaron muestras, sólo que en lugar de plasma se utilizó el volumen correspondiente de agua, y se siguió el procedimiento de extracción, esto con el fin de probar si los reactivos empleados producían algún tipo de señal. Los reactivos probados fueron buffer de acetatos, mezcla de acetato de etilo:hexano 30:70, mezcla metanol:agua 90:10 y Hexano UV.
- Una muestra de plasma de un voluntario (al cual previamente se le había administrado una tableta con naproxeno sódico y clorhidrato de ambroxol) se trató con el procedimiento de extracción descrito y se inyectó.

- Para verificar la pureza de los picos de interés se trabajaron seis muestras de plasma previamente cargadas con naproxeno sódico a una concentración de 48  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se procedió de acuerdo al método analítico, posteriormente se inyectaron al cromatógrafo por arreglo de diodos el cual tiene un comando específico para realizar pureza de pico.

#### 4.4.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

El límite de detección (LD) y cuantificación (LC) fue determinado mediante la elaboración de dos curvas patrón en plasma en el siguiente intervalo de concentraciones: 0.75, 1.5, 2.4, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 18.0 y 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y utilizando 6 determinaciones del nivel del ruido.

La determinación del nivel de ruido del detector consistió en realizar seis mediciones en condiciones estándar de operación del ruido propio del instrumento. Las condiciones de integración utilizadas para determinar el nivel de ruido fueron las siguientes:

Atenuación (Att 2 $\uparrow$ ) = cero

Nivel de ruido (Threshold) = cero

Zero = 50

Velocidad de la carta (CH SP) = 1.0

Ensanchamiento del pico (Peak With) = 0.14 (es el PW de trabajo del método analítico empleado).

Se inyectó únicamente fase móvil al sistema cromatográfico, para realizar las determinaciones del ruido. Las mediciones se realizaron con instrumentos calibrados, obteniendo mediciones en milímetros.

Se utilizaron dos métodos para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación.

**El método I :**

Mediante las siguientes ecuaciones se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación.

$$LD = 3 Sb/S$$

$$LC = k Sb/S$$

Donde:

LD = Límite de detección.

LC = Límite de cuantificación.

3 = es un factor para el 99.9% del nivel de confianza

Sb= desviación estándar de las determinaciones del nivel de ruido

S= pendiente de la curva patrón.

k= 10 para 10% de DER (desviación estándar relativa). Es un factor indicativo de la precisión deseada en el punto más bajo (por ejemplo 10 para 10% de DER, 20 para 5% de DER).

El método II consistió en lo siguiente:

Los respuesta obtenida, tanto de las mediciones de nivel de ruido, así como los obtenidos de la curva patron, que son mediciones en milímetros se transforman a milivoltios y utilizando la siguiente tabla se realiza en ajuste de atenuaciones.

| Para integradores HP 3396A se tiene una escala total de detección de 150 mm solo en un rango de atenuación entre -8 y 36. |                 |                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| Atenuación                                                                                                                | mV/escala total | mAU/escala total |
| -3                                                                                                                        | 0.125           | 0.25             |
| -2                                                                                                                        | 0.25            | 0.5              |
| -1                                                                                                                        | 0.5             | 1                |
| 0                                                                                                                         | 1               | 2                |
| 1                                                                                                                         | 2               | 4                |
| 2                                                                                                                         | 4               | 8                |
| 3                                                                                                                         | 8               | 16               |
| 4                                                                                                                         | 16              | 32               |
| 5                                                                                                                         | 32              | 64               |
| 6                                                                                                                         | 64              | 128              |
| 7                                                                                                                         | 128             | 256              |
| 8                                                                                                                         | 256             | 512              |
| 9                                                                                                                         | 512             | 1024             |
| 10                                                                                                                        | 1024            | 2048             |

Una vez realizado el ajuste de atenuación y realizada la conversión a milivoltios se elaboró otro gráfico de concentración contra milivoltios para la curva de regresión.

Se consideró para el límite de detección 2 veces el nivel de ruido y para el límite de cuantificación 10 veces el nivel de ruido, se interpolo en el gráfico de regresión para el intervalo de confianza al 95% en el límite inferior.

Una vez que se determinó el límite de cuantificación, se realizo una precisión del mismo, para lo cual se trabajaron por separado 5 réplicas de la concentración considerada como mínima cuantificable y la relación de áreas se interpoló en el promedio de las cuatro curvas patrón que se trabajaron para evaluar la linealidad del sistema. Se determinó el coeficiente de variación de las 5 determinaciones.

#### 4.4.3 COMPARACIÓN DE ÁREAS VS ALTURAS.

La comparación estadística de la cuantificación de las señales cromatográficas por áreas contra la cuantificación por alturas, se realizó preparando muestras de plasma cargadas con naproxeno sódico a una concentración conocida e inyectando las mismas muestras al cromatógrafo e indicando al integrador que realice primero la cuantificación de las señales cromatográficas por áreas y luego por alturas. Se calculan los % de recobro y se realiza una prueba de ANADEVIA y una prueba de t para determinar si existe diferencia significativa entre un método de cuantificación por áreas y otro por alturas.

#### 4.4.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.

La linealidad del sistema se evaluó empleando 8 valores del intervalo esperado de concentración. Considerando como variable independiente (x) a la concentración y como variable dependiente (y) a la respuesta o factor de respuesta, el cual se calculo de la siguiente manera:

$$FR = (A_{N_xNa}) / (A_{interno})$$

Donde:

FR = Factor de respuesta.

$A_{N_xNa}$  = Área del pico de naproxeno sódico.

$A_{interno}$  = Área del pico del estándar interno (propilparabeno)

Considerando un error despreciable en (x).

#### Preparación de las curvas patrón.

Se pesó cuatro veces y de manera independiente, estándar de naproxeno sódico para lograr cuatro soluciones patrón: se realizaron las diluciones correspondientes, efectuando la última dilución en el plasma, procurando mantener constante el volumen de alicuota y se trabajó en el intervalo de concentraciones seleccionado, considerando, el punto mas bajo el límite de cuantificación (3  $\mu\text{g/mL}$ ), el punto medio, la concentración máxima reportada en la literatura (Cp máx) (48  $\mu\text{g/mL}$ ) y el punto alto dos veces el valor del Cp máx (96  $\mu\text{g/mL}$ ).

Se siguió el procedimiento de extracción de naproxeno sódico, para todos y cada uno de los diferentes niveles de concentración de las curvas patrón. Se inyectaron al sistema cromatográfico. Posteriormente se realizaron los gráficos de las concentraciones expresadas en unidades de masa/volumen en el eje de las abscisas (x) y la respuesta en el eje de las ordenadas (factor de respuesta) (y).

#### 4.4.5 EXACTITUD.

-Exactitud ó Repetibilidad del sistema:

La exactitud se determinó de la siguiente manera: Se trabajaron tres niveles de concentración 3, 12 y 24  $\mu\text{g/mL}$  de naproxeno sódico en plasma cada uno por sextuplicado, en total 18 muestras. El factor de respuesta obtenido para cada muestra, se interpoló en dos curvas de calibración adicionadas de naproxeno sódico. Se calculo el porcentaje de recobro, la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

#### 4.4.6 PRECISION.

-Precisión ó Repetibilidad del método:

Se trabajó con una mezcla de plasma cargado de una concentración equivalente a 40  $\mu\text{g/ml}$  con naproxeno sódico. Fue evaluado por dos analistas de manera independiente: cada analista trabajo seis réplicas de un mililitro cada muestra y dos curvas patrón con el mismo método de

extracción, durante dos días diferentes. Se interpolaron las muestras en las dos curvas patrón, que fueron preparadas en forma independiente por los analistas, para determinar la cantidad de fármaco presente en las seis réplicas. Se determinó la desviación estandar relativa de todos los datos, en dos días diferentes, analizando 24 datos en total.

#### ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

La adaptabilidad del sistema cromatográfico, se realiza con el fin de conocer los parámetros cromatográficos bajo los cuales se está trabajando, ya que son un indicativo de las condiciones en que se encuentra la columna cromatográfica y en general de todo el sistema cromatográfico. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Número de platos teóricos.
- Eficiencia.
- Resolución.
- Factor de coeio.
- Factor de capacidad.
- Selectividad.

Dichos parámetros se evaluarón con una muestra estándar de la curva de calibración correspondiente al punto medio, y con los mismos parámetros de integración, volumen de inyección y tiempo de corrida que indica el método, sólo que a velocidad de carta de 1 cm/min.

Para definir los parámetros cromatográficos óptimos, así como los intervalos permisibles; se evaluó la adaptabilidad del sistema cada vez que se corrian curvas patrón, mientras se adecuaba y validaba el método, con el fin de determinar los parámetros cromatográficos óptimos de trabajo.

#### 4.4.7 ESTABILIDAD.

Se probaron dos tipos de estabilidades; estabilidad a corto plazo ( en fase móvil) y estabilidad a largo plazo.

La estabilidad a corto plazo consistió en lo siguiente:

Se trabajó un nivel de concentración (57 µg/mL). Esto es, se cargó plasma con el naproxeno sódico, de una pesada independiente a las de las curvas de calibración donde se interpoló para determinar la concentración inicial del fármaco en el fluido biológico.

Se trabajó de forma independiente cada muestra con el procedimiento de ensaye, se envasó en microviales en las condiciones normales de trabajo listas para inyectarse al cromatografo, se determinó la concentración inicial, interpolando en el promedio de dos curvas de calibración previamente preparadas, y se inyectó por triplicado; el resto de las muestras se almacenaron de la siguiente manera 18 muestras se almacenaron a TA (temperatura ambiente), posteriormente se fueron inyectando las muestras por triplicado cada tiempo, hasta aproximadamente 96 horas. Se cálculo el coeficiente de variación.

La estabilidad a largo plazo consistió en lo siguiente:

Se trabajo un nivel de concentración (48 µg/mL). Para lo cual se seleccionó una cantidad de plasma para preparar las muestras y se adicionó el activo. La pesada del activo, fue independiente a las utilizadas en la elaboración de las curvas patrón, donde se interpolaron las muestras para determinar la concentración al tiempo cero.

Las muestras se dividieron en forma individual para realizar su análisis evaluando cuando les correspondiera según el tiempo de análisis. Las muestras fueron montadas en estabilidad a -15°C (condiciones de congelamiento), hasta el momento de su análisis.

Las muestras se analizarón de la siguiente manera: aproximadamente cada semana se tomarón tres muestras para ser analizadas. Esto por un lapso no menor de tres semanas. Se calculó el coeficiente de variación.

#### 4.4.8 ROBUSTEZ.

La robustez del sistema cromatográfico se determinó verificando el efecto que ejerce sobre el sistema cromatográfico la proporción de solventes en la fase móvil, la cantidad de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) y el cambio de columna.

El efecto de la fase móvil fue evaluado inyectando una muestra de plasma cargado con naproxeno sódico a la concentración plasmática máxima esperada, otra muestra que contenía únicamente propilparabeno y una que solo contenía el principal producto de biotransformación del naproxeno sódico (o-desmetilnaproxeno), se inyectaron estos debido a que son los que salen más próximos a el naproxeno sódico. La evaluación se realizó cambiando la proporción de los componentes de la fase móvil.

- Las fases móviles probadas fueron las siguientes con una cantidad de ácido fosfórico constante 0.05mL para un litro de fase móvil:
  - a Acetonitrilo:Agua, 36:64, fase móvil (fase de comparación).
  - b Acetonitrilo:Agua, 40:60, mas cantidad de acetonitrilo.
  - c Acetonitrilo:Agua, 45:55, mas cantidad de acetonitrilo..
  - d Acetonitrilo:agua, 30:70, menos cantidad de acetonitrilo.
  
- Efecto de la cantidad de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

Para evaluar el efecto de la cantidad de ácido fosfórico en la fase móvil se inyectaron las misma muestras que en el caso anterior.

La proporción de acetonitrilo: agua fué 36:64 y las cantidades de ácido fosfórico fuerón las siguientes:

- a 0.05 mL de ácido fosfórico a 1L de fase móvil (fase móvil de comparación).
- b 0.0 mL de ácido fosfórico a 1L de fase móvil.
- c 0.1 mL de ácido fosfórico a 1L de fase móvil.
- d 1.0mL de ácido fósforico a 1L de fase móvil.

• Efecto de la Columna:

El efecto de la columna se determinó con la misma muestra que se utilizó para evaluar el efecto de la fase móvil. La evaluación fue realizada probando diferentes columnas.

Las columnas probadas fueron las siguientes:

- a Columna Adsorbosphere C<sub>18</sub> 5 µ de 150 x 4.6 mm. Alltech. (columna de comparación).
- b Spherisorb ODS-2 de 5 µ de 150 x 4.6 mm, Alltech.
- c Pinkerton ISRP GFF II , 5 µ de 150 x 4.6 mm de LEACSA.
- d Water-Novapak, 5 µ de 150 x 4.6 mm, Waters.
- e Ultrasphere, 5 µ de 150 x 4.6 mm, Beckman.
- f Spherisorb C<sub>18</sub> 5 µ de 150 x 4.6 mm. Alltech.

Validación de un Método Analítico para Cuantificar Naproxeno Sódico en Plasma por CLAR en una combinación de Naproxeno Sódico con Clorhidrato de Ambroxol.

70

5

R E S U L T A D O S.

## 5. RESULTADOS

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

#### 5.1 ESPECIFICIDAD:

Como se puede comprobar en los cromatogramas, donde se prueba el principal producto de biotransformación O-desmetilnaproxen, el clorhidrato de ambroxol (fármaco endógeno a la forma farmacéutica que se desea probar), los anticoagulantes empleados, (heparina, ácido cítrico, glucosa y citrato de sodio), así como los reactivos utilizados en el método para la extracción del fármaco de interés, se puede observar que no hay señales que interfieran con los picos de interés; como son, la señal del propilparabeno (estándar interno) y la del naproxeno sódico.

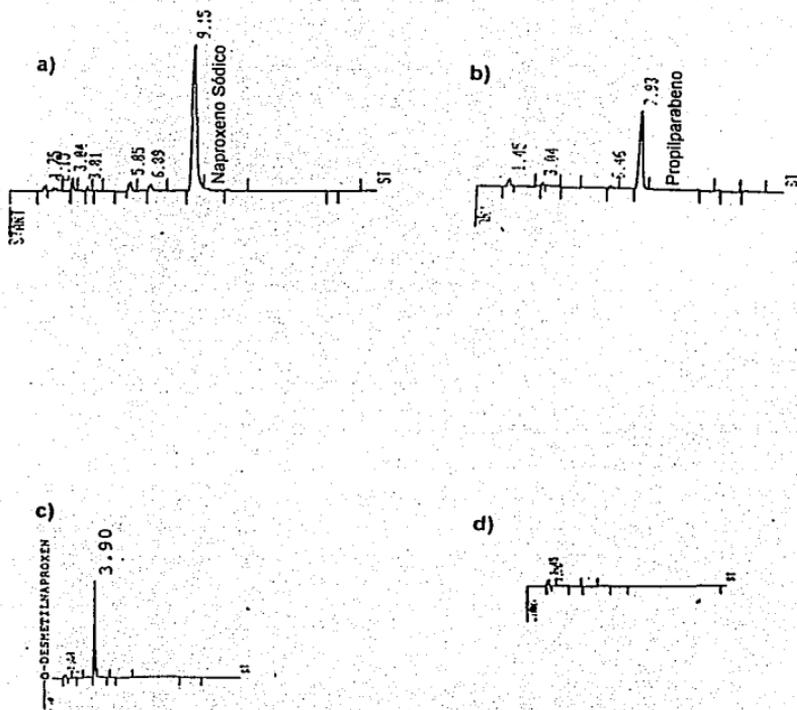


Figura 1  
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

- a) Naproxeno Sódico (24 $\mu$ g/mL), b) Propilparabeno (10 $\mu$ g/mL),  
c) O-desmetilnaproxeno (40 $\mu$ g/mL) y  
d) Clorhidrato de Ambroxol (20 $\mu$ g/mL)

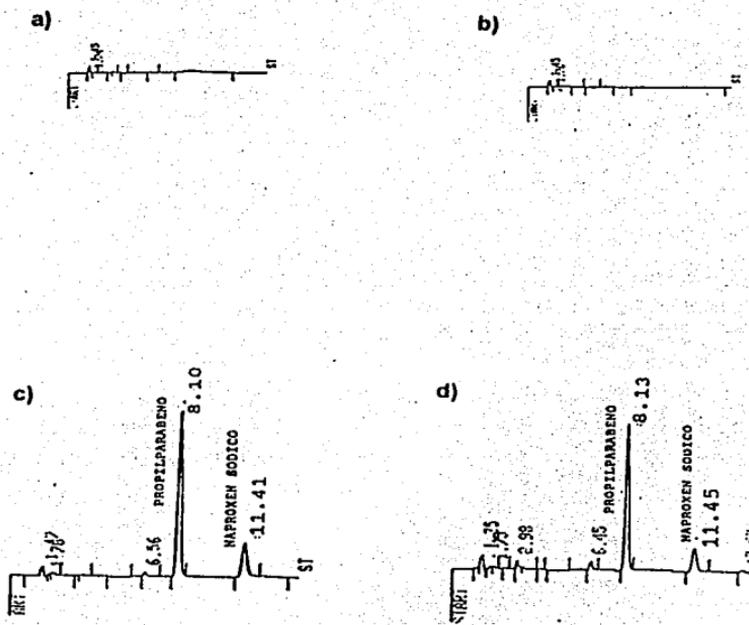


Figura 2

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

- a) Blanco de plasma, b) Blanco de reactivos,
- c) Muestra de plasma adicionada con Propilparabeno y naproxeno sódico y
- d) Muestra de un voluntario Sano.

Con respecto a la pureza de pico los resultados se puede observar que el pico para naproxeno sódico es puro puesto que presenta una comparación (rmatch) de 1000 que es lo que nos indica una pureza del pico de 100%, para el pico del propilparabeno (estandar interno) se encontro un match de 982, esto es 98.2% de pureza, por lo que este pico también se puede considerar puro.

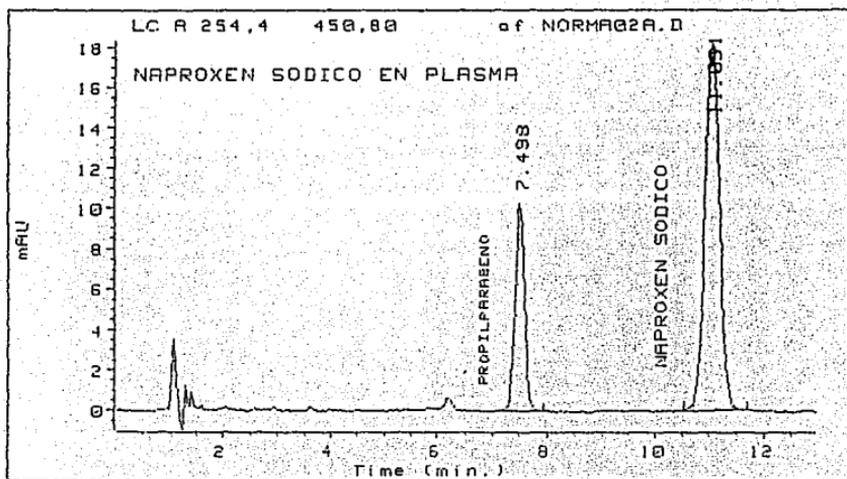


Figura 3

PUREZA DE PICO DE NAPROXENO SÓDICO Y EL ESTÁNDAR INTERNO (PROPILPARABENO) EN UNA MUESTRA DE PLASMA.

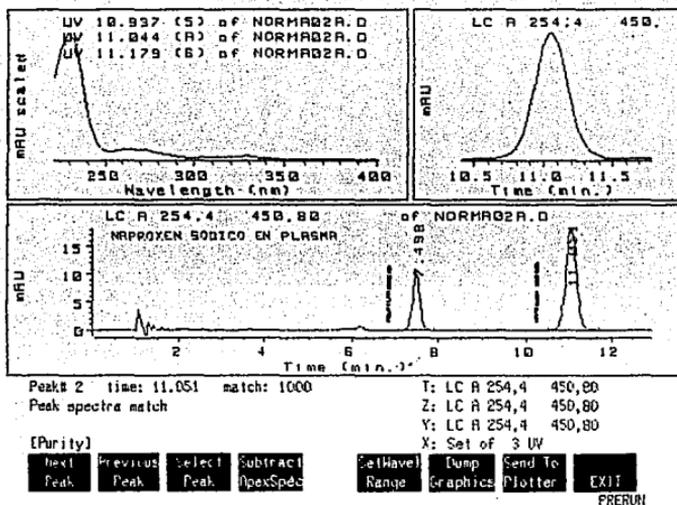


Figura 4

PUREZA DE PICO DE NAPROXENO SÓDICO Y EL ESTÁNDAR INTERNO (PROPILPARABENO) EN UNA MUESTRA DE PLASMA.

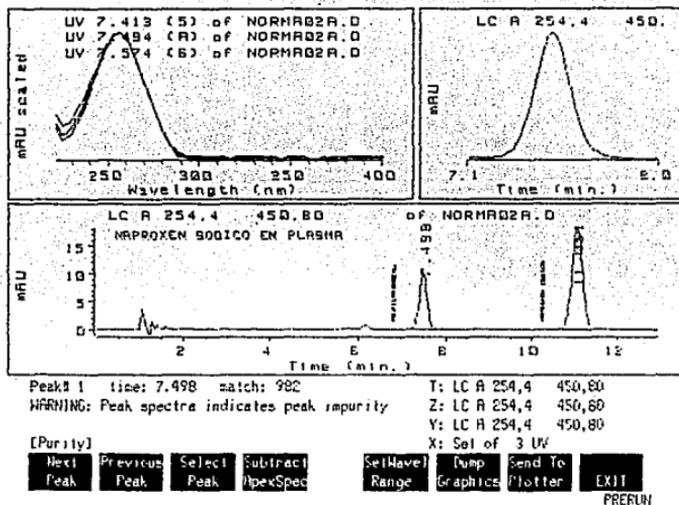


Figura 5

PUREZA DE PICO DE NAPROXENO SODICO Y EL ESTANDAR INTERNO (PROPILPARABENO) EN UNA MUESTRA DE PLASMA.

## 5.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinarán con los gráficos obtenidos de la curva patrón.

Tabla I

| CONCENTRACIÓN DEL NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA ( $\mu\text{g/mL}$ ) | RESPUESTA (ALTURA DEL PICO DE NAPROXENO SÓDICO) (mm)<br>CURVA 1 | RESPUESTA (ALTURA DEL PICO DE NAPROXENO SÓDICO) (mm)<br>CURVA 2 |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 0.7668                                                            | -                                                               | 1.40                                                            |
| 1.5336                                                            | 2.52                                                            | 3.02                                                            |
| 2.4538                                                            | 4.02                                                            | 5.77                                                            |
| 3.0250                                                            | 6.40                                                            | 6.81                                                            |
| 6.1347                                                            | 12.10                                                           | 12.30                                                           |
| 9.2020                                                            | 19.97                                                           | 18.89                                                           |
| 12.2694                                                           | 22.72                                                           | 21.32                                                           |
| 15.3360                                                           | 33.68                                                           | 32.80                                                           |
| 18.4041                                                           | 39.90                                                           | 40.01                                                           |
| 24.5388                                                           | 36.18                                                           | 54.33                                                           |

## CURVAS PATRON PARA EL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

Tabla II

| Promedio de las dos curvas patron para Límite de detección y Límite de cuantificación |                                                    |                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| CONCENTRACIÓN DEL NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )              | RESPUESTA ALTURA DE N <sub>x</sub> Na (milímetros) | RESPUESTA ALTURA DE N <sub>x</sub> Na (milivoltios) |
| 0.7668                                                                                | 1.400                                              | 0.5973                                              |
| 1.5336                                                                                | 2.770                                              | 1.1819                                              |
| 2.4538                                                                                | 4.895                                              | 2.0885                                              |
| 3.0250                                                                                | 6.505                                              | 2.7755                                              |
| 6.1347                                                                                | 12.200                                             | 5.2053                                              |
| 9.2020                                                                                | 18.430                                             | 7.8635                                              |
| 12.2694                                                                               | 22.020                                             | 9.3952                                              |
| 15.3360                                                                               | 33.240                                             | 14.1824                                             |
| 18.4041                                                                               | 39.955                                             | 17.0475                                             |
| 24.5388                                                                               | 45.255                                             | 19.3088                                             |

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Validación de un Método Analítico para Cuantificar Naproxeno Sódico en Plasma por CLAR en una combinación de Naproxeno Sódico con Clorhidrato de Ambroxol.

79

### MEDICIONES DEL NIVEL DE RUIDO

Tabla III

| # de Determinación | Nivel de ruido (milímetros) | Nivel de ruido (milivoltios) |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1                  | 3.73                        | 0.0249                       |
| 2                  | 3.78                        | 0.0252                       |
| 3                  | 3.75                        | 0.0250                       |
| 4                  | 3.88                        | 0.0259                       |
| 5                  | 3.86                        | 0.0257                       |
| 6                  | 3.97                        | 0.0265                       |
| promedio =         | 3.83                        | 0.0255                       |
| Sb ó DE =          | 0.0915                      | 6.10E-04                     |
| DER ó CV =         | 2.30                        | 2.39                         |

Metodo I para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). Se empleó el siguiente gráfico.

**LINEALIDAD PARA LD Y LC DE NAPROXENO  
SODICO EN PLASMA**

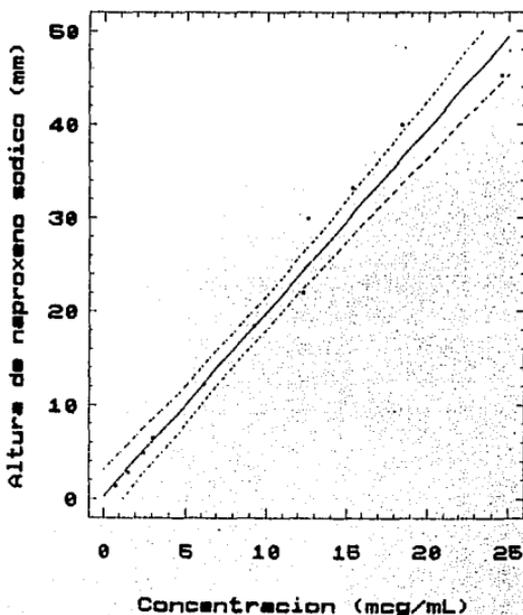


Figura 6

CURVA DE LA LINEALIDAD DE NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA PARA DETERMINAR EL LÍMITE DE DETECCIÓN Y EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Análisis estadístico de regresión para el gráfico de concentración contra la altura del pico de naproxeno en milímetros, para determinar el límite de detección y límite de cuantificación por el método I

Tabla IV

$$Y = 1.965X + 0.262$$

*Estadísticos de Regresión*

|                |        |
|----------------|--------|
| Regresión      | 0.9920 |
| R Cuadrada     | 0.9840 |
| Error Estandar | 2.1508 |
| Observaciones  | 10     |

|            | <i>Coefficientes</i> | <i>Error Estandar</i> | <i>t - Estadística</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Límite inferior al 95% de significancia</i> | <i>Límite superior al 95% de significancia</i> |
|------------|----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Intercepto | 0.2620               | 1.0727                | 0.2443                 | 0.8125              | -2.2117                                        | 2.7357                                         |
| pendiente  | 1.9650               | 0.0886                | 22.1866                | 3.63E-09            | 1.7608                                         | 2.1692                                         |

Validación de un Método Analítico para Cuantificar Naproxeno Sódico en Plasma por CLAR en una combinación de Naproxeno Sódico con Clorhidrato de Ambroxol.

82

Con el valor de la pendiente resultante del gráfico de concentración contra respuesta en mm y con la desviación estándar de las mediciones del nivel de ruido en mm y sustituyendo en las siguientes ecuaciones se obtuvo el LD y el LC

LÍMITE DE DETECCIÓN.

$$LD = 3 Sb/S$$

Sb = 0.0915 Ver tabla IV

S = 1.9650 Ver tabla VI

Sustituyendo:  $LD = 3(0.0915/1.9650) = 0.1396 \mu\text{g/mL}$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

$$LC = k Sb/S$$

k = 10

Sb = 0.0915 Ver tabla III

S = 1.9650 Ver tabla IV

Sustituyendo:  $LC = 10(0.0915/1.9650) = 0.4656 \mu\text{g/mL}$

Método II: para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). Se empleó el siguiente gráfico.

### LINEALIDAD PARA LD Y LC DE NAPROXENO SODICO EN PLASMA

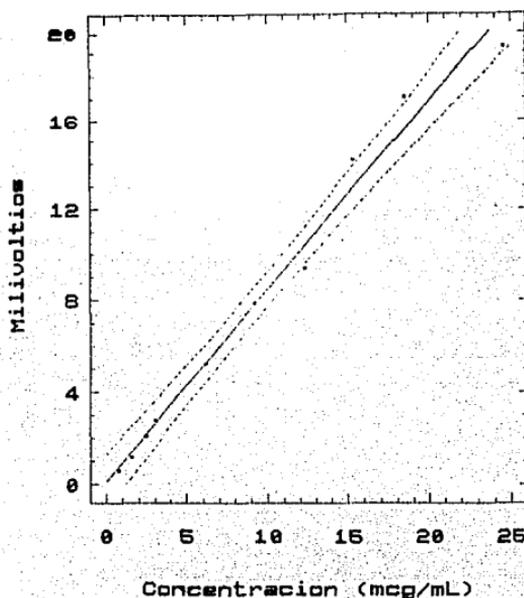


Figura 7

CURVA DE LA LINEALIDAD DE NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA PARA DETERMINAR EL LÍMITE DE DETECCIÓN Y EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Análisis estadístico de regresión para el gráfico de concentración contra la altura del pico de naproxeno en milivoltios, para determinar el límite de detección y límite de cuantificación por el método II

**Tabla V**

$$Y = 0.9084X + (-0.2718)$$

| <i>Estadísticos de Regresión</i> |                      |                       |                        |                     |                                                |                                                |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Regresión                        | 0.9964               |                       |                        |                     |                                                |                                                |
| R Cuadrada                       | 0.9928               |                       |                        |                     |                                                |                                                |
| Error Estandar                   | 0.6145               |                       |                        |                     |                                                |                                                |
| Observaciones                    | 10                   |                       |                        |                     |                                                |                                                |
|                                  | <i>Coefficientes</i> | <i>Error Estandar</i> | <i>t - Estadística</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Límite inferior al 95% de significancia</i> | <i>Límite superior al 95% de significancia</i> |
| Intercepto                       | -0.2718              | 0.3146                | -0.8628                | 0.4129              | -0.9973                                        | 0.4538                                         |
| pendiente                        | 0.9084               | 0.0273                | 33.2826                | E-09                | 0.8455                                         | 0.9714                                         |

Con los datos obtenidos para intervalo confianza para el límite inferior pendiente resultante del gráfico de concentración contra respuesta en milivoltios y con las mediciones del nivel de ruido en milivoltios y sustituyendo en las siguientes ecuaciones se obtuvo el LD y el LC

Cuando N es el nivel de ruido en milivots, y su valor es 0.0255 mV. Ver tabla III

Entonces:

LÍMITE DE DETECCIÓN.                      LD = 2 N      LD=0.051 mV

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.              LC = 10 N      LC=0.255 mV

Con el gráfico de regresión y para el límite inferior se obtuvo lo siguiente:

pendiente (m) = 0.8455  
intercepto (b) = -0.9973

Y con la ecuación de la recta se tiene:

$$Y = m X + b \quad \text{ó} \quad X = [(Y - b)] / m$$

Por tanto se obtienen los siguiente valores:

$$LD = [(0.051 - (-0.9973))] / 0.8455 = 1.23 \mu\text{g/mL}$$

$$LC = [(0.255 - (-0.9973))] / 0.8455 = 1.48 \mu\text{g/mL}$$

## PRECISIÓN PARA EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Determinación del coeficiente de variación para 5 replicas del límite de cuantificación considerado (3.0 µg/ mL).

Tabla VI

| DETERMINACIÓN     | CONCENTRACIÓN ENCONTRADA (µg/mL) |
|-------------------|----------------------------------|
| 1                 | 2.9225                           |
| 2                 | 2.9164                           |
| 3                 | 3.0772                           |
| 4                 | 3.1257                           |
| 5                 | 2.8891                           |
| PROMEDIO = 2.9862 |                                  |
| D.E. = 0.1074     |                                  |
| CV ó DER = 3.60%  |                                  |

### 5.3 COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS % DE RECOBROS OBTENIDOS POR ÁREAS Y POR ALTURAS.

La comparación estadística de los % de recobros obtenidos para las señales cromatográficas por áreas contra las de alturas, se muestran a continuación.

Tabla VII

| COMPARACION ÁREAS & ALTURAS. |                          |                            |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| %recobro<br>Alturas<br>NxNa  | %recobro<br>Area<br>NxNa | diferencia<br>altura-áreas |
| 86.76                        | 93.74                    | -6.98                      |
| 94.79                        | 94.42                    | 0.37                       |
| 92.62                        | 94.42                    | -1.80                      |
| 96.77                        | 98.31                    | -1.54                      |
| 101.48                       | 96.51                    | 4.97                       |
| 97.26                        | 98.81                    | -1.55                      |
| 96.41                        | 98.81                    | -2.40                      |
| 99.12                        | 107.27                   | -8.15                      |
| 105.27                       | 104.84                   | 0.43                       |
| 97.60                        | 92.32                    | 5.28                       |
| 90.59                        | 92.32                    | -1.73                      |
| 95.01                        | 96.80                    | -1.79                      |

**Análisis estadístico para la comparación de la respuesta en áreas contra la respuesta en alturas.**

**Hipótesis nula :**

- No existe variación entre una cuantificación por áreas y una cuantificación por alturas de naproxeno sódico en plasma con el método analítico propuesto.

**Hipótesis alternativa:**

- Sí existe variación entre una cuantificación por áreas y una cuantificación por alturas de naproxeno sódico en plasma con el método analítico propuesto.

**Tabla VIII**

**COMPARACION ÁREAS & ALTURAS.**

ANAEVA: Factor Simple

| Grupos    | Cantidad | Sumatoria | Promedio | Varianza |
|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| Columna 1 | 12       | 1153.68   | 96.14    | 23.53504 |
| Columna 2 | 12       | 1168.57   | 97.38083 | 21.95379 |

**ANAEVA**

Fuente de Variación

|               | Suma de Cuadrados | Grados de Libertad | Suma de Cuadrados media | F       | Probabilidad | F tablas |
|---------------|-------------------|--------------------|-------------------------|---------|--------------|----------|
| Entre Grupos  | 9.238004167       | 1                  | 9.23800                 | 0.40617 | 0.53050      | 4.30094  |
| En cada Grupo | 500.3770917       | 22                 | 22.74441                |         |              |          |
| Total         | 509.61510         | 23                 |                         |         |              |          |

Toma de decisión: Como  $F_{cal} < F_{tab}$  se acepta la hipótesis nula.

Conclusión: No hay variación entre una cuantificación por áreas y una cuantificación por alturas de naproxeno sódico en plasma con el método analítico propuesto.

Análisis estadístico para la comparación de la respuesta en áreas contra la respuesta en alturas.

Hipótesis nula :

- La varianza 1 es igual a la varianza 2.

Hipótesis alternativa:

- La varianza 1 y la varianza 2 son diferentes.

Tabla IX

| COMPARACION ÁREAS & ALTURAS:                              |            |            |
|-----------------------------------------------------------|------------|------------|
| Pueba de t, para dos muestras asumiendo varianzas iguales |            |            |
|                                                           | Variable 1 | Variable 2 |
| Promedio                                                  | 96.14      | 97.38083   |
| Varianza                                                  | 23.53504   | 21.95379   |
| Observaciones                                             | 12         | 12         |
| Grados de libertad                                        | 22         |            |
| t-calculada                                               | -0.63731   |            |
| t-tablas de una cola                                      | 1.71714    |            |
| t tablas de dos colas                                     | 2.07388    |            |

Donde:

Variable 1 = % recobre por Alturas

Variable 2 = % recobre por Áreas

TOMA DE DECISIÓN: Como  $t_{cal} < t_{tablas}$  se acepta la hipótesis nula.

Conclusión: No hay diferencia significativas entre las varianzas 1 y 2.

#### 5.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.

Los resultados obtenidos para las cuatro curvas patrón en fase móvil fueron los siguientes:

Tabla X

| CURVAS PATRON EN FASE MÓVIL PARA EVALUAR LINEALIDAD |                       |                                      |                     |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Concentración Naproxeno Sódico (µg/mL)              | Área Naproxeno Sódico | Área Estándar Interno Propilparabeno | Factor de Respuesta |
| 3.0420                                              | 682750                | 4972800                              | 0.1373              |
| 3.0416                                              | 650670                | 4798800                              | 0.1356              |
| 3.0422                                              | 638510                | 4635400                              | 0.1377              |
| 3.0420                                              | 632630                | 4715300                              | 0.1342              |
| 6.0840                                              | 1358500               | 4892400                              | 0.2777              |
| 6.0832                                              | 1612000               | 5757500                              | 0.2800              |
| 6.0844                                              | 1246700               | 4601200                              | 0.2710              |
| 6.0840                                              | 1173700               | 4267300                              | 0.2750              |
| 12.1680                                             | 2495800               | 4511500                              | 0.5532              |
| 12.1664                                             | 2809900               | 5057800                              | 0.5556              |
| 12.1688                                             | 2595000               | 4752300                              | 0.5461              |
| 12.1680                                             | 2522800               | 4625000                              | 0.5455              |
| 18.2520                                             | 3820800               | 4828400                              | 0.7913              |
| 18.2496                                             | 3973300               | 4937100                              | 0.8048              |
| 18.2532                                             | 3927600               | 4583700                              | 0.8569              |
| 18.2520                                             | 4260800               | 5530300                              | 0.7704              |
| 24.3360                                             | 5475000               | 4959700                              | 1.1039              |
| 24.3328                                             | 4619200               | 4223800                              | 1.0936              |
| 24.3376                                             | 5259600               | 4917000                              | 1.0697              |
| 24.3360                                             | 5048600               | 4590500                              | 1.0998              |
| 36.5040                                             | 7739700               | 4906200                              | 1.5775              |
| 36.4991                                             | 6793500               | 4158300                              | 1.6337              |
| 36.5064                                             | 7234400               | 4310400                              | 1.6784              |
| 36.5040                                             | 13971000              | 4404200                              | 3.1722              |
| 48.6720                                             | 10778000              | 4965000                              | 2.1708              |
| 48.6655                                             | 9084100               | 4244500                              | 2.1402              |
| 48.6752                                             | 9403500               | 4262800                              | 2.2059              |
| 48.6720                                             | 4766700               | 4401200                              | 1.0835              |
| 97.3440                                             | 20215000              | 4579800                              | 4.4139              |
| 97.3310                                             | 18219000              | 4152700                              | 4.3873              |
| 97.3505                                             | 20293000              | 4631600                              | 4.3814              |
| 97.3440                                             | 9851400               | 4495300                              | 2.1915              |

### LINEALIDAD EN FASE MÓVIL

Tabla XI

| CURVAS PATRÓN EN FASE MÓVIL<br>PROMEDIOS |                        |
|------------------------------------------|------------------------|
| conc.corregida<br>(µg/mL)                | factor de<br>respuesta |
| 3.0420                                   | 0.1362                 |
| 6.0839                                   | 0.2759                 |
| 12.1678                                  | 0.5501                 |
| 18.2517                                  | 0.8059                 |
| 24.3356                                  | 1.0917                 |
| 36.5034                                  | 1.2224                 |
| 48.6712                                  | 1.9001                 |
| 97.3424                                  | 3.8435                 |

Factor de Respuesta = (Área de propilparabeno) / (Área de naproxeno sódico)

Ver la grafica promedio de las cuatro curvas en fase móvil en la figura 8

Análisis estadístico de regresión para el gráfico de concentración contra el factor de respuesta, para determinar linealidad en fase móvil

Tabla XII

$$Y = 0.03856X + 0.04018$$

**Estadísticos de Regresión**

|                |        |
|----------------|--------|
| Regresión      | 0.9964 |
| R Cuadrado     | 0.9928 |
| Error Estandar | 0.1098 |
| Observaciones  | 8      |

|            | <i>Coefficientes</i> | <i>Error Estandar</i> | <i>t-Estadística</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Límite inferior al 95% de significancia</i> | <i>Límite superior al 95% de significancia</i> |
|------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Intercepto | 0.0405               | 0.0587                | 0.7145               | 0.4981              | -0.0982                                        | 0.1791                                         |
| Pendientes | 0.0386               | 0.0013                | 28.7728              | 1.6E-08             | 0.0353                                         | 0.0418                                         |

**LINEALIDAD DE NAPROXENO SODICO EN  
FASE MOVIL**

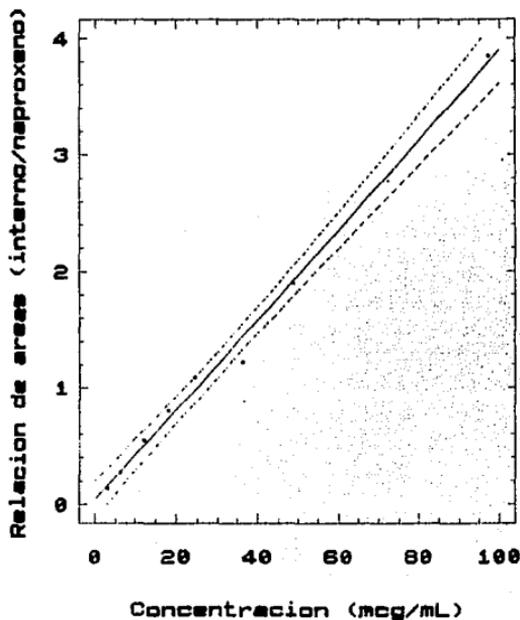


Figura 8

**CURVA QUE REPRESENTA LA LINEALIDAD PARA NAPROXENO SÓDICO  
EN FASE MÓVIL.**

Los resultados obtenidos para las cuatro curvas patrón en plasma se muestran a continuación.

Tabla XIII

| CURVAS PATRÓN EN PLASMA, PARA EVALUAR LINEALIDAD. |                       |                                      |                     |
|---------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Concentración Naproxeno Sódico (µg/mL)            | Área Naproxeno Sódico | Área Estándar Interno propilparabeno | factor de respuesta |
| 3.0432                                            | 488260                | 2752700                              | 0.1774              |
| 3.0432                                            | 571700                | 3186200                              | 0.1794              |
| 3.0420                                            | 453000                | 2881400                              | 0.1572              |
| 3.0424                                            | 426030                | 2582300                              | 0.1650              |
| 6.0864                                            | 881900                | 3091700                              | 0.2852              |
| 6.0864                                            | 806490                | 3212000                              | 0.2511              |
| 6.0840                                            | 711760                | 2600600                              | 0.2737              |
| 6.0848                                            | 822590                | 2943200                              | 0.2795              |
| 12.1729                                           | 1171100               | 1881200                              | 0.6225              |
| 12.1729                                           | 1669200               | 2962600                              | 0.5634              |
| 12.1680                                           | 1524500               | 2818500                              | 0.5409              |
| 12.1696                                           | 1445800               | 1994900                              | 0.7247              |
| 18.2593                                           | 2252200               | 1900200                              | 1.1852              |
| 18.2593                                           | 2415500               | 2898000                              | 0.8335              |
| 18.2520                                           | 2289700               | 3010500                              | 0.7606              |
| 18.2544                                           | 2474200               | 3032300                              | 0.8159              |
| 24.3457                                           | 2743300               | 2278800                              | 1.2038              |
| 24.3457                                           | 3234500               | 2603100                              | 1.2426              |
| 24.3360                                           | 2906000               | 1331300                              | 2.1828              |
| 24.3392                                           | 3013500               | 2508000                              | 1.2016              |
| 36.5186                                           | 4440000               | 2161800                              | 2.0538              |
| 36.5186                                           | 4453700               | 1801900                              | 2.4717              |
| 36.5040                                           | 4475600               | 2240000                              | 1.9980              |
| 36.5089                                           | 4871400               | 2689300                              | 1.8114              |
| 48.6915                                           | 4185300               | 1684100                              | 2.4852              |
| 48.6915                                           | 5576800               | 2108500                              | 2.6449              |
| 48.6720                                           | 6099600               | 1881200                              | 3.2424              |
| 48.6785                                           | 6213100               | 2208900                              | 2.8128              |
| 97.3829                                           | 10777000              | 2208900                              | 4.8789              |
| 97.3829                                           | 12078000              | 2408400                              | 5.0149              |
| 97.3440                                           | 9064400               | 1624000                              | 5.5815              |
| 97.3570                                           | 12747000              | 2787200                              | 4.5734              |

LINEALIDAD EN PLASMA

Tabla XIV

| CURVA PATRÓN EN PLASMA<br>PROMEDIOS DE CUATRO CURVAS                |                        |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Concentración<br>Naproxeno<br>Sódico<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Factor de<br>respuesta |
| 3.0427                                                              | 0.1698                 |
| 6.0854                                                              | 0.2724                 |
| 12.1709                                                             | 0.6129                 |
| 18.2563                                                             | 0.8988                 |
| 24.3417                                                             | 1.4577                 |
| 36.5125                                                             | 2.0837                 |
| 48.6834                                                             | 2.7963                 |
| 97.3667                                                             | 5.0122                 |

Factor de Respuesta = (Área de propilparabeno) / (Área de naproxeno sódico)

Ver la grafica promedio de las cuatro curvas en plasma en la figura 9

### LINEALIDAD PARA NAPROXENO SODICO EN PLASMA

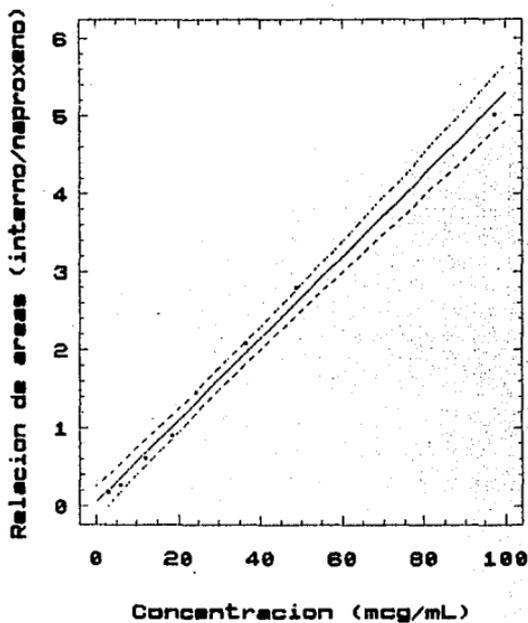


Figura 9

CURVA QUE REPRESENTA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA.

Análisis estadístico de regresión para el gráfico de concentración contra el factor de respuesta, para determinar linealidad en plasma.

Tabla XV

$$Y = 0.05244X + 0.04751$$

**Estadísticos de Regresión**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Regresión Múltiple | 0.99683 |
| R Cuadrada         | 0.99366 |
| Error Estandar     | 0.14009 |
| Observaciones      | 8       |

|            | Coefficientes | Error Estandar | t calculada | Probabilidad | Límite inferior al 95% de significancia | Límite superior al 95% de significancia |
|------------|---------------|----------------|-------------|--------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Intercepto | 0.04751       | 0.07231        | 0.65703     | 0.53216      | -0.12943                                | 0.22445                                 |
| pendiente  | 0.05244       | 0.00171        | 30.66344    | 1.01E-08     | 0.04825                                 | 0.05662                                 |

Para la variabilidad del método intra-día se trabajaron 4 curvas patrón de manera independiente por el mismo analista, cada día de análisis, durante dos días diferentes y se determinó así el coeficiente de variación para cada nivel de concentración, como se pueden ver en las tablas XVI y XVII.

### VARIABILIDAD DEL MÉTODO INTRA-DIA

Tabla XVI

| DIA 1                              |                                             |                                             |                                             |                                             |                                            |            |
|------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|------------|
| Concentración adicionada. (mcg/mL) | Corrida 1<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 2<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 3<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 4<br>Relación de áreas de los picos | Promedio de Relación de áreas de los picos | % CV ó DER |
| 3                                  | 0.1365                                      | 0.1657                                      | 0.118                                       | -                                           | 0.1546                                     | 10.25      |
| 6                                  | 0.2951                                      | 0.2804                                      | 0.3489                                      | 0.2582                                      | 0.2956                                     | 13.05      |
| 12                                 | 0.5917                                      | 0.5481                                      | 0.5595                                      | 0.5516                                      | 0.5627                                     | 3.54       |
| 18                                 | 0.8183                                      | 0.8297                                      | 0.8897                                      | 0.7742                                      | 0.8280                                     | 5.74       |
| 24                                 | 1.1126                                      | 1.1337                                      | 1.0313                                      | 1.0556                                      | 1.0833                                     | 4.41       |
| 36                                 | 1.4133                                      | 1.5226                                      | 1.7296                                      | 1.5138                                      | 1.5448                                     | 8.60       |
| 48                                 | 2.1972                                      | 1.9868                                      | 2.0999                                      | 1.8719                                      | 2.0390                                     | 7.02       |
| 96                                 | 4.3133                                      | 4.5262                                      | 4.0561                                      | 4.0620                                      | 4.2394                                     | 5.32       |

VARIABILIDAD DEL MÉTODO INTRA-DIA

Tabla XVII

| DIA 2                            |                                             |                                             |                                             |                                             |                                            |            |
|----------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|------------|
| Concentración adicional (mcg/mL) | Corrida 1<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 2<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 3<br>Relación de áreas de los picos | Corrida 4<br>Relación de áreas de los picos | Promedio de Relación de áreas de los picos | % CV ó DER |
| 3                                | 0.1774                                      | 0.1794                                      | 0.1592                                      | 0.1650                                      | 0.1698                                     | 6.19       |
| 6                                | 0.2852                                      | 0.2510                                      | 0.2737                                      | 0.2795                                      | 0.2724                                     | 5.50       |
| 12                               | 0.6225                                      | 0.5634                                      | 0.5409                                      | 0.7247                                      | 0.6129                                     | 13.40      |
| 18                               | -                                           | 0.8335                                      | 0.7606                                      | 0.8159                                      | 0.8033                                     | 4.74       |
| 24                               | 1.2038                                      | 1.2426                                      | -                                           | 1.2016                                      | 1.2160                                     | 1.90       |
| 36                               | 2.0538                                      | 2.4717                                      | 1.9980                                      | 1.8114                                      | 2.0837                                     | 13.37      |
| 48                               | 2.4852                                      | 2.6449                                      | 3.2424                                      | 2.8128                                      | 2.7963                                     | 11.66      |
| 96                               | 4.8789                                      | 5.0149                                      | 5.5815                                      | 4.5734                                      | 5.0122                                     | 8.42       |

### 5.5 EXACTITUD DEL MÉTODO.

Los resultados que muestran la evaluación de la exactitud del método se encuentran en las siguientes tablas.

Tabla XVIII

| NIVEL | CANTIDAD ADICIONADA (µg/mL) | CANTIDAD RECUPERADA (µg/mL) | RECUBRO (%) |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1     | 3.0320                      | 4.0806                      | 134.5838    |
| 1     | 3.0320                      | 3.3036                      | 108.9588    |
| 1     | 3.0320                      | 3.3238                      | 109.6255    |
| 1     | 3.0320                      | 3.5973                      | 118.6459    |
| 1     | 3.0320                      | 2.8274                      | 93.2525     |
| 1     | 3.0320                      | 3.9553                      | 130.4530    |
| 2     | 12.1280                     | 11.8222                     | 97.4785     |
| 2     | 12.1280                     | 14.1209                     | 116.4324    |
| 2     | 12.1280                     | 12.6462                     | 104.2724    |
| 2     | 12.1280                     | 13.3419                     | 110.0090    |
| 2     | 12.1280                     | 12.0794                     | 99.5995     |
| 2     | 12.1280                     | 15.3995                     | 126.9747    |
| 3     | 24.2560                     | 23.7844                     | 97.9735     |
| 3     | 24.2560                     | 24.5002                     | 101.0069    |
| 3     | 24.2560                     | 28.5961                     | 117.8927    |
| 3     | 24.2560                     | 28.3879                     | 117.0344    |
| 3     | 24.2560                     | 30.0328                     | 123.8160    |
| 3     | 24.2560                     | 23.6631                     | 97.5555     |

Parámetros estadísticos tomando en cuenta el % de recobro para los tres niveles de concentración.

MEDIA = 111.4203 µg/mL

D.E. = 12.49

C.V ó DER = 11.21 %

Parámetros estadísticos para el % de recobro por nivel.

Tabla XIX

| NIVEL | MEDIA (µg/mL) | D.E.  | % CV ó DER |
|-------|---------------|-------|------------|
| 1     | 115.92        | 15.29 | 13.19      |
| 2     | 109.13        | 11.16 | 10.23      |
| 3     | 109.21        | 11.66 | 10.66      |

## 5.6 PRECISION

La precisión se determinó con muestras de plasma adicionadas con naproxeno sódico a una concentración de 40 µg/mL µg/mL. Por dos analistas durante dos días diferentes, los resultados se muestran en las siguientes tablas.

### PRECISIÓN EN MUESTRAS DE PLASMA ADICIONADAS CON NAPROXENO SÓDICO 40 µg/mL

Tabla XX

|                   | %<br>RECUBRO<br>DÍA<br>1 | %<br>RECUBRO<br>DÍA<br>2 |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| ANALISTA<br><br>1 | 114.3693                 | 72.9217                  |
|                   | 107.3330                 | 89.1009                  |
|                   | 106.7334                 | 80.7842                  |
|                   | 108.9218                 | 97.4765                  |
|                   | 116.4078                 | 79.7669                  |
|                   | 113.1284                 | 76.6939                  |
| ANALISTA<br><br>2 | 118.6511                 | 89.1231                  |
|                   | 114.9088                 | 85.7187                  |
|                   | 109.7974                 | 90.0806                  |
|                   | 111.8408                 | 105.4383                 |
|                   | 108.8083                 | 88.6562                  |
|                   | 114.5253                 | 89.5765                  |

n = 24  
D.S. = 14,3456  
C.V. = 14.38%

CSS/3: GENERAL ANADEVA/MANADEVA  
(24 casos con 4 variables)

DISEÑO: 2 para ANADEVA, con efectos fijos  
Variable dependiente: 1 variable: Concentración Naproxeno  
de Sódico  
Entre 1 ANALISTA (2): 1 2  
2 DIA (2): 1 2

Tabla XXI

PRECISIÓN EN MUESTRAS DE PLASMA ADICIONADAS CON  
NAPROXENO SÓDICO 40 µg/mL

| css/3: general MANADEV A<br>Resumen de todos los Efectos.<br>Diseño: 1-ANALISTA, 2-DIA |              |               |             |              |                  |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|-------------|--------------|------------------|--------------|
| Efecto                                                                                 | gL<br>Efecto | SCM<br>Efecto | gL<br>Error | SCM<br>Error | F <sub>cal</sub> | Probabilidad |
| 1                                                                                      | 1            | 3702.351      | 20          | 38.9714      | 95.0018          | 0.000000     |
| 2                                                                                      | 1            | 157.529       | 20          | 38.9714      | 4.0422           | 0.058055     |
| 12                                                                                     | 1            | 74.241        | 20          | 38.9714      | 1.9050           | 0.182751     |

| css/3: general MANADEV A<br>Efecto Principal: ANALISTA<br>1-ANALISTA, 2-DIA |                      |    |          |                  |              |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|----|----------|------------------|--------------|
| prueba<br>una<br>variable                                                   | Suma de<br>Cuadrados | gL | SCM      | F <sub>cal</sub> | probabilidad |
| Efecto                                                                      | 3702.351             | 1  | 3702.351 | 95.00179         | 0.000000     |
| Error                                                                       | 779.428              | 20 | 38.971   |                  |              |

| css/3: general MANADEV A<br>Promedio |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| ANALISTA DIA                         | Concentración de Naproxeno Sódico |
| 1                                    | 111.9521                          |
| 2                                    | 87.1115                           |

ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

La adaptabilidad del sistema cromatográfico se evaluó durante 18 días y los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla XXII

| DIA | PROPIPARABENO                           | NAPROXENO SODICO                        | RESOLUCION       |
|-----|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|
| 1   | N= 11712 T=0.80<br>K <sub>1</sub> =5.76 | N=11018 T=0.85<br>K <sub>2</sub> =8.45  | R=8.8<br>α=1.47  |
| 2   | N= 11176 T=0.72<br>K <sub>1</sub> =5.43 | N=8826 T=0.78<br>K <sub>2</sub> =7.69   | R=6.6<br>α=1.42  |
| 3   | N= 12001 T=0.74<br>K <sub>1</sub> =5.30 | N=9660 T=0.97<br>K <sub>2</sub> =7.60   | R=7.93<br>α=1.43 |
| 4   | N= 6484 T=0.84<br>K <sub>1</sub> =5.09  | N=8352 T=0.86<br>K <sub>2</sub> =7.23   | R=6.46<br>α=1.42 |
| 6   | N= 7283 T=0.79<br>K <sub>1</sub> =5.19  | N=7781 T=0.86<br>K <sub>2</sub> =7.38   | R=6.55<br>α=1.42 |
| 6   | N= 6303 T=0.75<br>K <sub>1</sub> =5.15  | N=5992 T=0.83<br>K <sub>2</sub> =7.32   | R=5.86<br>α=1.42 |
| 7   | N= 8207 T=0.73<br>K <sub>1</sub> =4.86  | N=8928 T=0.77<br>K <sub>2</sub> =6.56   | R=6.67<br>α=1.35 |
| 8   | N= 7539 T=0.73<br>K <sub>1</sub> =4.86  | N=8699 T=0.68<br>K <sub>2</sub> =6.93   | R=6.78<br>α=1.43 |
| 9   | N= 5268 T=0.82<br>K <sub>1</sub> =4.99  | N=8650 T=0.78<br>K <sub>2</sub> =7.14   | R=6.32<br>α=1.43 |
| 10  | N= 10571 T=0.74<br>K <sub>1</sub> =4.91 | N=10685 T=0.71<br>K <sub>2</sub> =7.01  | R=7.77<br>α=1.43 |
| 11  | N= 12548 T=0.76<br>K <sub>1</sub> =4.89 | N=9938 T=0.74<br>K <sub>2</sub> =6.98   | R=7.67<br>α=1.43 |
| 12  | N= 16941 T=0.76<br>K <sub>1</sub> =4.86 | N=8671 T=0.75<br>K <sub>2</sub> =6.92   | R=7.92<br>α=1.42 |
| 13  | N=7315 T=0.68<br>K <sub>1</sub> =4.77   | N=7022 T=0.75<br>K <sub>2</sub> =6.75   | R=6.18<br>α=1.42 |
| 14  | N=7370 T=0.83<br>K <sub>1</sub> =4.60   | N=8388 T=0.88<br>K <sub>2</sub> =6.79   | R=6.52<br>α=1.41 |
| 15  | N= 10100 T=0.71<br>K <sub>1</sub> =5.03 | N=8834 T=0.73<br>K <sub>2</sub> =7.22   | R=7.44<br>α=1.44 |
| 16  | N= 7527 T=0.74<br>K <sub>1</sub> =4.86  | N=11160 T=0.77<br>K <sub>2</sub> =6.92  | R=7.25<br>α=1.42 |
| 17  | N= 14170 T=0.92<br>K <sub>1</sub> =8.52 | N=12880 T=0.93<br>K <sub>2</sub> =12.34 | R=9.65<br>α=1.45 |
| 18  | N= 11572 T=0.96<br>K <sub>1</sub> =8.14 | N=11528 T=1.02<br>K <sub>2</sub> =11.62 | R=8.57<br>α=1.42 |

Nota: N = número de platos teóricos  
 T = factor de coeio  
 K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> = factor de capacidad.  
 R = resolución  
 α = selectividad

### 5.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Los resultados de la estabilidad de la muestra tanto en condiciones de almacenamiento como en muestras ya tratadas, listas para inyectarse al cromatógrafo de líquidos, se muestran a continuación.

#### ESTABILIDAD DE NAPROXENO SÓDICO EN PLASMA TEMPERATURA DE CONGELACIÓN -15°C

Tabla XXIII

| TIEMPO (días) | % RECUPERADO DE NAPROXENO SÓDICO |
|---------------|----------------------------------|
| 10            | 91.18                            |
| 21            | 113.40                           |
| 32            | 113.94                           |

Análisis inicial 48 µg/mL.

$$\begin{aligned}x &= 106.17 \\DE &= 12.9874 \\CV &= 12.23 \% \\n &= 3\end{aligned}$$

#### ESTABILIDAD DE MUESTRAS TRATADAS EN FASE PARA RECONSTITUIR

Tabla XXIV

| TIEMPO (horas) | % RECUPERADO DE NAPROXENO SÓDICO |
|----------------|----------------------------------|
| 24             | 100.69                           |
| 84             | 98.07                            |
| 96             | 99.83                            |

Análisis inicial 57.65 µg/mL.

$$\begin{aligned}x &= 99.53 \\DE &= 1.3355 \\CV &= 1.34 \% \\n &= 3\end{aligned}$$

## 5.8 ROBUSTEZ.

La robustez del sistema se evaluó verificando el efecto que puede ejercer el cambio en la proporción de fase móvil, el cambio en la cantidad de ( $H_3PO_4$ ) ácido fosfórico y el cambio en la columna cromatográfica, los resultados se muestran en las siguientes tablas.

### 5.8.1 EFECTO DE LA PROPORCIÓN DE FASE MÓVIL

Efecto de la proporción de fase móvil sobre los parámetros cromatográficos, calculados para naproxeno sódico en plasma y propilparabeno (estándar interno).

TABLA XXV

| PROPORCIÓN                                                                                     | PROPIPARABENO                              | NAPROXENO SÓDICO                          |                    | OBSERVACIONES                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|
| CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>36:64<br>pH = 3.2<br>con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | N= 5594<br>T=1.00<br>K' <sub>1</sub> =4.51 | N=5916<br>T=1.08<br>K' <sub>2</sub> =6.56 | R=5.95<br>α = 1.45 | Buena separación, picos simétricos.                |
| CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>40:60<br>pH = 3.2<br>con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | N= 9877<br>T=1.17<br>K' <sub>1</sub> =3.89 | N=7405<br>T=1.00<br>K' <sub>2</sub> =5.42 | R=6.14<br>α = 1.39 | Buena separación, picos un poco coleados y anchos. |
| CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>45:55<br>pH = 3.2<br>con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | N= 7021<br>T=0.83<br>K' <sub>1</sub> =2.5  | N=5196<br>T=1.00<br>K' <sub>2</sub> =3.21 | R=3.57<br>α = 1.28 | No hay buena separación de picos. Coeluyen.        |
| CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>30:70<br>pH = 3.2<br>con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> |                                            |                                           |                    | Tarda demasiado tiempo en eluir más de 20 minutos. |

Nota: N = número de platos teóricos  
T = factor de retención  
K'<sub>102</sub> = factor de capacidad.  
R = resolución  
α = selectividad

### 5.8.2 EFECTO DE LA CANTIDAD DE ÁCIDO FOSFÓRICO ( $H_3PO_4$ ) EN LA FASE MÓVIL.

Efecto de la cantidad de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) con la misma proporción de  $CH_3CN : H_2O$  36 : 64, sobre los parámetros cromatográficos calculados para naproxeno sódico en plasma y propilparabeno (estándar interno).

Tabla XXVI

| CANTIDAD DE $H_3PO_4$                                 | PROPIPARABENO                    | NAPROXENO SÓDICO                |                           | OBSERVACIONES                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $CH_3CN:H_2O$<br>36:64<br>con 0.05 mL<br>de $H_3PO_4$ | N= 5594<br>T=1.00<br>$K'_1=4.51$ | N=5916<br>T=1.08<br>$K'_2=6.56$ | R=5.95<br>$\alpha = 1.45$ | Buena separación, picos simétricos                                                                             |
| $CH_3CN:H_2O$<br>36:64<br>con 0.0 mL<br>de $H_3PO_4$  |                                  |                                 |                           | No hay separación de picos, eluyen casi al mismo tiempo.                                                       |
| $CH_3CN:H_2O$<br>36:64<br>con 0.1 mL<br>de $H_3PO_4$  | N= 7545<br>T=1.00<br>$K'_1=6.03$ | N=8516<br>T=1.33<br>$K'_2=9.45$ | R=8.62<br>$\alpha = 1.57$ | Buena separación, picos simétricos un poco anchos, sin embargo tarda mucho tiempo en eluir el naproxeno sódico |
| $CH_3CN:H_2O$<br>36:64<br>con 1.0 mL de $H_3PO_4$     | N= 8293<br>T=1.00<br>$K'_1=6.27$ | N=7353<br>T=0.94<br>$K'_2=9.96$ | R=8.87<br>$\alpha = 1.59$ | Tarda demasiado tiempo en eluir el naproxeno sódico, además los picos son un tanto anchos.                     |

Nota: N = número de platos teóricos  
T = factor de coeloc  
 $K'_{1,2}$  = factor de capacidad.  
R = resolución  
 $\alpha$  = selectividad

### 5.8.3 EFECTO DE LA COLUMNA.

Efecto de la columna sobre los parámetros cromatográficos calculados para naproxeno sódico en plasma y propilparabeno (estándar interno).

Tabla XXVII

| COLUMNA                                         | PROPIPARABENO                               | NAPROXENO SÓDICO                           |                           | OBSERVACIONES                                                                       |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Adsorbosphere<br>C18 5 $\mu$<br>serie: 94049184 | N= 7306<br>T=1.25<br>K' <sub>1</sub> =5.07  | N=8132<br>T=1.17<br>K' <sub>2</sub> =7.53  | R=7.45<br>$\alpha$ = 1.49 | Buena separación,<br>picos simétricos                                               |
| Spherisorb<br>ODS 2 5 $\mu$<br>serie: 140295    | N= 4647<br>T=1.13<br>K' <sub>1</sub> =4.83  | N=4736<br>T=1.33<br>K' <sub>2</sub> =7.24  | R=5.87<br>$\alpha$ = 1.50 | Buena separación,<br>picos un poco<br>colegados y anchos.                           |
| Pinkerton<br>serie: 100120                      | N= 10733<br>T=1.40<br>K' <sub>1</sub> =0.42 | N=6113<br>T=1.00<br>K' <sub>2</sub> =0.61  | R=2.74<br>$\alpha$ = 1.45 | No hay buena<br>separación de<br>picos. Coeluyen.                                   |
| Water-Novapak<br>serie: T31102P07               | N= 6546<br>T=1.33<br>K' <sub>1</sub> =4.42  | N=7081<br>T=1.38<br>K' <sub>2</sub> =6.51  | R=6.71<br>$\alpha$ = 1.47 | Buena separación,<br>picos un poco<br>colegados                                     |
| Ultrasphere<br>serie: 1UE0443                   | N= 7508<br>T=1.25<br>K' <sub>1</sub> =5.38  | N=6666<br>T=2.13<br>K' <sub>2</sub> =7.68  | R=6.40<br>$\alpha$ = 1.43 | Buena separación,<br>pero los picos son<br>demasiado anchos<br>y un poco colegados. |
| Spherisorb<br>C18 5 $\mu$<br>serie: 129500      | N= 8812<br>T=0.88<br>K' <sub>1</sub> =3.95  | N=10677<br>T=1.13<br>K' <sub>2</sub> =5.23 | R=5.65<br>$\alpha$ = 1.32 | Picos bien resueltos<br>y simétricos                                                |

Nota: N = número de platos teóricos  
T = factor de coelección  
K'<sub>1,2</sub> = factor de capacidad.  
R = resolución  
 $\alpha$  = selectividad

6

D I S C U S I Ó N  
D E  
R E S U L T A D O S

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El método analítico resultó ser específico para cuantificar naproxeno sódico en plasma, ya que se puede comprobar que no hay señales que presente el principal metabolito (o-desmetilnaproxeno), el otro fármaco inherente a la forma farmacéutica (clorhidrato de ambroxol), así como las sustancias endógenas del fluido biológico y los reactivos adicionados para la extracción del activo desde la matriz biológica. Estas son las sustancias que en determinado momento pudiesen interferir con los picos de interés que son los producidos por naproxeno sódico y el estándar interno propilparabeno. Para cumplir así con lo estipulado en la literatura (5, 9 y 31).

En lo referente a la pureza de pico se encontró que el pico para en analito en cuestión (naproxeno sódico) es puro ya que se obtuvo una comparación (match) de 1000 que es el que indica una pureza del 100% de la señal. Para la señal producida por el estándar interno (propilparabeno) se obtuvo en match de 982, lo que indica una pureza de 98.2% por lo que se puede considerar que la señal también es pura, ya que se encuentra dentro de los límites permisibles de exactitud que son del 97 al 103%.

La cuantificación del naproxeno sódico puede realizarse por áreas y/o por alturas de las señales cromatográficas, ya que no existe diferencia significativa, calculando por áreas o por alturas como se comprobó estadísticamente mediante un análisis de ANADEVa con el programa computacional EXCELL<sup>R</sup> y mediante una prueba de t considerando varianzas iguales.

El límite de detección se determinó mediante dos métodos distintos:

**Método I.** Con el método de la pendiente se encontró un límite de detección de 0.125 µg/mL.

**Método II.** Con este método se encontró un valor de 1.23 $\mu\text{g/mL}$  para el límite de detección.

Ambos resultados indican que el método es sumamente sensible puesto que detecta cantidades muy pequeñas de naproxeno sódico, bajo las condiciones de operación de éste método analítico. Al compararlo con otros métodos reportados en literatura (29 y 31) se observa que este método presenta una sensibilidad aceptable.

El límite de cuantificación al igual que el límite de detección se determinó con dos métodos diferentes:

**Método I.** Con el método de la pendiente (32), se obtuvo un resultado de 0.4189 $\mu\text{g/mL}$  para el límite de cuantificación.

**Método II.** Con este método se obtuvo un resultado de 1.48  $\mu\text{g/mL}$  para límite de cuantificación.

Con ambos métodos se tiene un límite de cuantificación bastante bajo; no obstante, no hay que olvidar que ambos son métodos meramente estadísticos.

Sin embargo al observar los cromatogramas obtenidos por las señales de naproxeno sódico producidas por concentraciones abajo de 3  $\mu\text{g/mL}$  es un tanto difícil diferenciarlas de la línea base e incluso hay ocasiones en que el integrador no las reproduce de igual manera, es por ello que se probó la reproducibilidad para una concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$ , analizando por quintuplicado, que es lo indican las autoridades correspondientes (31) y calculando el coeficiente de variación. El cual resultó ser aceptable ya que es menor a 15% que es lo que se estipula para muestras biológicas (6 y 31).

Se consideró el valor de 3  $\mu\text{g/mL}$  ya que se encuentra dentro del rango de cuantificación del método, además que con ambos métodos se obtuvo un valor más bajo, entonces se puede asegurar que el método puede cuantificar cantidades de activo desde 3  $\mu\text{g/mL}$ .

La linealidad se evaluó en el fluido biológico donde se pretende cuantificar el fármaco durante el estudio de bioequivalencia.

El método analítico resultó lineal, ya que cumple satisfactoriamente con los requisitos de linealidad para fluidos biológicos (5, 6, 9 y 31), como son: un coeficiente de correlación que por lo menos incluya dos nueves después del punto decimal (0.99) y el intervalo de confianza al 95% para el intercepto incluya al cero. Con respecto al valor de la pendiente las autoridades regulatorias correspondientes no han estipulado que esta debe incluir la unidad, ya que solo se está realizando el gráfico de concentración contra la respuesta obtenida (5).

También se evaluó la linealidad en fase móvil, sin embargo al observar los resultados de linealidad y compararlos con los obtenidos en plasma, no se observa que exista una gran diferencia, ya que también el coeficiente de correlación incluye dos nueves después del punto y el intervalo de confianza para el intercepto incluye el cero (5).

Con respecto a la variabilidad del método intra-día se observa que la variabilidad no es significativa, ya que el coeficiente de variación obtenido es inferior al 15%, que es lo que piden las autoridades regulatorias (6 y 29).

El método analítico resultó ser exacto debido a que el coeficiente de variación obtenido cumple con el requisito de ser menor al 15% (6 y 31).

Para evaluar estadísticamente la precisión se realizó un análisis de ANADEVIA, considerando un efecto anidado, con ayuda del programa computacional CSS/3<sup>R</sup>. Al observar los resultados se encontró que, que si hay diferencia significativa entre analista y entre días, sin embargo se puede afirmar que el método es preciso, ya que al observar el coeficiente de variación obtenido para todos los datos de ambos analistas durante los dos días es menor a 15% que es lo que solicitan las autoridades correspondientes para afirmar si un método para cuantificar un activo en fluidos biológicos es preciso (6 y 31).

La muestra resultó ser estable, tanto en condiciones de almacenamiento (menos 15° C), como una vez tratada, esto es, lista para inyectarse, ya que los coeficientes de variación obtenidos están por debajo del 15% (6 y 31).

La adaptabilidad del sistema cromatográfico se evaluó con los resultados obtenidos durante los 18 días en que se determinaron los parámetros cromatográficos bajo los cuales se estaba trabajando. Por lo que se puede afirmar que los parámetros cromatográficos que se deben cumplir para considerar al sistema estable y adecuado para realizar la cuantificación del activo son:

| PROPILPARABENO | NAPROXENO SÓDICO |
|----------------|------------------|
| N= 5260        | N = 5990         |
| T = 0.73       | T = 0.71         |
| K' = 4.8       | K' = 6.5         |

En la robustez del sistema se evaluó el efecto que se puede ocasionar al cambiar la proporción de Acetonitrilo : Agua y la cantidad de ácido fosfórico en la fase móvil e incluso al cambiar de columna, encontrando lo siguiente:

La variación de la proporción de acetonitrilo en la fase móvil afecta considerablemente los parámetros cromatográficos (ver tabla XXV). Si el acetonitrilo se disminuye, los picos de interés (propilparabeno y naproxeno sódico) se retienen por más de 20 minutos. Conforme se aumente la cantidad de acetonitrilo se disminuye considerablemente la resolución entre las señales cromatográficas, además de que resultan más anchas y un poco coledas.

Al variar la cantidad de ácido fosfórico adicionado a la fase móvil ocurre lo siguiente: al aumentar el ácido fosfórico, los picos de interés coeluyen, y al disminuir el ácido fosfórico el pico de naproxeno tarda demasiado en eluir, además de que resultan picos un tanto anchos, por lo que se observa que La cantidad de ácido fosfórico óptima es 0.05 mL para un litro de fase móvil.

Con todas las columnas probadas la tendencia fue que las señales de naproxeno sódico y del propilparabeno resultaban en algunos casos anchas y coledas o casi no se resolvían. Sin embargo se observa que hay una columna que puede sustituir a la que se indica en el método analítico, y que proporciona resultados muy similares a los que señala el método analítico. Esta es la columna Spherisorb C<sub>18</sub> 5  $\mu$  de 150 x 4.6 mm, de Alltech.

7

C O N C L U S I O N E S .

## 7. CONCLUSIONES.

- Se adecuó el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar naproxeno sódico en plasma en presencia de clorhidrato de ambroxol.
- Se validó el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar naproxeno sódico en plasma a través de su especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Y se demostró que la muestra tiene una estabilidad de 32 días, siendo un requisito indispensable para estudios de Biodisponibilidad y/o Bioequivalencia, tener una estabilidad prolongada.
- Se cumplió con los objetivos establecidos en el presente trabajo, ya que el método validado cumple las requisiciones que estipulan las autoridades de salud correspondientes.

8

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

## 8. BIBLIOGRAFIA.

1. Remington's. Pharmaceutical Sciences. Mark Publishing Company 17th Edition. 1985. pp 3-26
2. Chapman G. Kenneth. Pharmaceutical Technology. Nov. 1991.
3. Villafuerte R.L. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 22(1)22-37(1991).
4. Karnes H. Thomas and March Clark. Pharmaceutical Research 10(10):1420-1426(1993).
5. Karnes Thomas H., Gerald Shiu and Vinod P. Shah. Validation of Bioanalytical Methods. Pharmaceutical Research 8(4) 421-426 (1991).
6. International Open Conference. Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence. L'Hotel, Toronto, Canada. Junio 15-18, 1992.
7. Guías Generales de Validación "Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud". Secretaría de Salud. pp 1-8
8. Shrikant V. Dighe. Current Bioavailability and Bioequivalence requirements and regulations. Clin. Res. Practics & Drugs Reg. AFFAIRS. 2(4), 401-421 (1984).
9. Vinod P. Shah. Analytical Methods used in Bioavailability Stuiies: a Regulatory Viewpoint. Clin. Res. Practics & Drug Res AFFAIRS, 5(1), 51-60 (1987).

10. Dr. Dennis Hurley. Curso de Estudios de Bioequivalencia. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey - Campus Estado de México 18-22 Octubre 1993.
11. Monografía del Naxén, "Naxen 500 el Antiinflamatorio", Syntex División Farmacéutica, México, 1984.
12. Naproxen: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy and Use. *Drugs* 9:326-363(1975)
13. Flanax. Regs. Nos. 86776 y 87042. Literatura exclusiva para médicos. Syntex, S.A. Div. Farmacéutica, México, D.F.
14. The Merck. Index Eleventh Edition. Centennial Edition. USA 1989. pp 6330
15. Tesis de Licenciatura Aristeo Muñiz Granados " Estudio Comparativo de dos Métodos Analíticos específicos para la determinación cuantitativa de la sal del ácido (d)-2- (6-Metoxi-2'-Naftil) propionico en tabletas, cápsulas, soluciones y suspensiones". Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México 1982.
16. Naprosyn "Clinical and Technical Review ". Medical Services Department Syntex Laboratories, Inc. Palo Alto California pp 51-56
17. Guidance Naproxen Tablets in vivo Bioequivalence and in vitro Dissolution. Division of Bioequivalence in the Office of Generic Drugs. The Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. pp.1-10. Jun. 1992.
18. Curso de Introducción a la Cromatografía de líquidos de Alta Resolución. Perkin Elmer de México, S.A. de C.V. México 1989.

- 19 Hamilton & Sewell. Introduction to high performance Liquid Chromatography 1a. Edición. Chapman and Hall London (1977) pp.1-36
- 20 Touchstone J.C. & Dobbins. Practice of Thin Layer Chromatography 1a. Edición John Wiley & Sons. Inc. New York (1979) pp 1-4,101-132 y 301-307.
21. Tesis de Licenciatura., Ector Luis Rasgado. "Desarrollo y Validación de un método analítico para determinar Naproxeno en granulados", ENEP, Zaragoza, México, D.F. 1992 pp15-60
22. Q.F.B. Alberto Camacho Martínez. Curso sobre Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, Impartido en ENEP- Zaragoza. Mayo 1992.
23. Current Concepts for Validation of Compendial Assays (Pharmaceutical Manufacturers Association, Quality Control Section, Compendial Assay Validation Committee). Pharmacopeial Forum. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Mar.-Apr.1986 pp. 1241-1245.
24. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. 21 Internacional Open Conference CH.I (4-1-1992).
25. CANIFARMA. Disposiciones de FDA para Estudios de Biodisponibilidad y/o Bioequivalencia México 1994.
26. Tesis de Maestría Guadalupe Clara Espinoza Martínez "Estudio de Bioequivalencia para tabletas de Tartrato de Metoprolol". Facultad de Química. Estudios de Posgrado. México 1995.
27. USP-XXII, Seventeenth edition, United States Pharmacopeial Convention, Inc., United States, 1990 pp.918,1710-1712.

28. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. 1988.
29. Aaron Leon, Toon Stephen and Rowland Malcom. Validation of Assay Methodology Used in Pharmacokinetics Studies. *Journal of Pharmacological Methods* 17, 337-346 (1987)
30. Selection of High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis. III<sup>a</sup>. Method Validation. *Journal of Chromatography*, 464(1989)265-278.
31. Vinod P. Shah, Kamal K. Midha, Shrikant Dighe, Iain J. McGilveray, Jerome P. Skelly, Avraham Yacobi. Analytical Methods Validation : Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *Pharmaceutical Research* 9(4) 588-592 (1992).
32. Karnes Thomas, Shiu Gerald and Shah Vinod P. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research*. Vol 8 No. 4 (421-426)1991.
33. Morozowich T. GLC and HPLC determination of Therapeutic Agents. Vol. I Marcel Decker, Inc New York (1978) Capítulo 4.
34. Vree B. Tom, Biggelaar-Martea Van Den Magdalena, Verwey-Van Wissen Corrien P.W.G.M. Pharmacokinetics of naproxen, its metabolite o-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* Vol.14, 491-502 (1993).
35. Runkel R., Sevelius H. Segre E. & Bloomfield S.S. Bioavailability of Naproxen Sodium and its relationship to Clinical Analgesic Effects. *B. J. Clin. Pharmac.* (1980). 10, 259-263.

36. Nielsen-Kudsk F. HPLC-determination of some antiinflammatory, weak analgesic and uricosuric drugs in human blood plasma and its applicatios to pharmacokinetics. *Acta Pharmacol Toxicol.* (1980). 47,267-273.
37. Upton R.A., Buskin J.N., Guentert T.W., Williams R.L. Riegelman S. Convenient and Sensitive High-performance liquid chromatography assay for ketoprofen, naproxen and other allied drugs in plasma or urine. *J. Chromatog.* (1980). 190, 119-128.
38. Broquaire M, Rovei V, Braithwaite R. Quantitative Determination of Naproxen in plasma by a simple High-performance Liquid Chromatographic Method. *J. Chromatog.* (1981). 224, 43-49.
39. Desager J.P., Vanderbist M., Harvengt C. Naproxen plasma levels in volunteers after single-dose administration by oral and rectal routes. *J. Clin. Pharmacol* (1976), April 189-193.
40. Van Loenhout J.W.A., Van Ginneken C.A.M., Ketelaars H.C.J., Kimenai P M., Tan Y. & Gribnau F.W.J: A High-performance Liquid Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Naproxen and des-methyl-naproxen in biological samples. University Hospital St. Radboud, Geer Grootplein Zuid 6, 6525 G.A. Nijmegen (The Netherlands) 1982.
41. Basilio R, de Rodríguez C.R.G. Román F. Garzón A. Determinación de Naproxén Sódico en Plasma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. *Rev. Mex. C. Farmaceuticas.* 1984. pp 16-19.
42. Levine Barry & Caplan Yale H. Simultaneous Liquid-Chromatographic Determination of Five nonsteriodal anti-inflammatory drugs in plasma or blood. *Clin. Chem.* (Winston-Salem, N.C. 1985, 31(2), 346-347.

43. Tom B.Vree Magdalena & Van Den Bieggelaar Martea. Pharmacokinetics of naproxen, its metabolite o-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. *Biopharmaceutics and drug disposition* 14, 491-502 (1993).
44. Lapique F. Netter P., Bannwarth B., Trechot P. & Gillet P. Identification and simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1989, 496(2), 301-320.
45. Kazemifasd Amir G., Moore Douglas. Liquid Chromatography with amperometric detection for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in plasma. *J. Chromatogr.* (1990). 533, 125-132.
46. Shinozuka Tatsuo, Terada Masaru Takei, Setsuko Kuroda Naohito . Determination of anti-inflammatory drugs by HPLC (II). *Hochudoku* (1992), 10(2) 126-127.
47. Hoeylandsjaer, Audum, Aarbakke, Jarle. An improved microscale HPLC assay for naproxen plasma levels. *Acta Phamacol. Toxicol* (1983), 52(1), 78-80.
48. Método Analítico para cuantificar Ketorolac en plasma humano por Cromatografía de líquidos de alta resolución. *Syntex Palo Alto AMC # 015 Addendum II.*