



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE QUÍMICA.

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR DEXTROMETORFÁN Y DEXTRORFÁN
EN ORINA POR CLAR, APLICADO A ESTUDIOS DE
FENOTIPO METABOLIZADOR EN POBLACIÓN
MEXICANA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA.**

PRESENTA:

CINDY SELENE RAMÍREZ DÍAZ.



MÉXICO, D. F.



2002.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. HELGI HELEN JUNG COOK.
VOCAL: M. en C. SOFIA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO.
SECRETARIO: M. en F. LIZ JANNET MEDINA REYES.
1er. SUPLENTE: M. en C. JOSÉ MANUEL MORALES HERNÁNDEZ.
2do. SUPLENTE: M. en F. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**

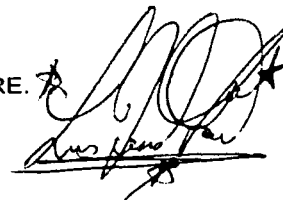
ASESOR DEL TEMA:

M. en F. LIZ JANNET MEDINA REYES.



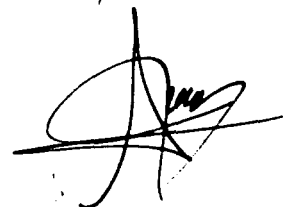
SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en F. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE.



SUSTENTANTE:

CINDY SELENE RAMÍREZ DÍAZ.



A mis padres...

*Porque este trabajo es suyo,
y por ser el motor de mi existencia.*

Quiero agradecer:

A DIOS por darme la vida.

A MIS PADRES por el apoyo brindado, cariño, regaños, educación, confianza y sobre todo por ser mis padres. A ti mamá gracias por todo y cuentas conmigo siempre y a ti papá por todo tu tiempo.

A MIS HERMANOS Marlene, José y Juanito por todos los momentos que hemos vivido y compartido juntos, los quiero mucho y siempre estaremos juntos, esperando ser un ejemplo para ustedes.

A MIS AMIGAS Nadheisa, Maricela y Paty por su verdadera amistad, por sus consejos y regaños y siempre dispuestas a ayudarme, cuentan conmigo siempre.

A Liz y Luis por sus consejos, apoyo, orientación, confianza y sobre todo su amistad.

A Maribel (comadre) por sus grandes consejos y por escucharme y estar afí en los momentos más difíciles, recuerda que eso nunca lo voy a olvidar y tu amistad tampoco.

A César (caeser) gracias por hacerme reír en los momentos de tristeza, tu apoyo sin condiciones, sabes en mí siempre tendrás a una amiga, Grauff!!!.

A Diego por brindarme tu ayuda y compañía.

A Abraham por tus enseñanzas y consejos, confianza y sabes que puedes contar conmigo.

A Elisa por tu amistad y por tus cartas que me hicieron reflexionar en muchas cosas.

A Macotela por esos momentos agradables que juntos vivimos y por tu gran apoyo y amistad, aunque me siagas enojar.

A Oly por tu apoyo y ayuda, así como tus consejos, gracias.

A Miguel Angel por tu cariño, amor, ternura, tiempo y sobre todo comprensión, te quiero mucho chiquito, eres muy lindo!.

¡Gracias! Mary, César, Elisa, Diego, Miguel, Macotela, Yery, Diana, Yessica, Vero y Homero por esos momentos agradables y felices que pase en su compañía.

A Martín por su cariño, comprensión, paciencia y amistad que nunca voy a olvidar, gracias por esos momentos felices.

A mis Maestros de la Facultad por sus conocimientos transmitidos durante la carrera.

Al Profesor Lino Joel por su confianza, amistad y enseñanzas.

A mis Voluntarios por todo el apoyo y confianza ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis amigos que no necesito nombrar, mil gracias por todo.

Cindy Selene

(La Chiniswinis).

"No le pida nunca nada a la vida. Espere... Y algún día la vida le dará una sorpresa maravillosa"

Alejandro Casona.

"En todas las cosas de la vida se encuentra placer si se sabe saborearlas"

Angel Ganivet.

RESUMEN

RESUMEN.

El presente trabajo tuvo como finalidad optimizar y validar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia, capaz de cuantificar dextrometorfán y su metabolito, dextrorfán, para ser utilizado en la determinación del fenotipo metabolizador del CYP2D6.

El método optimizado se basó en una extracción sólido-líquido, con cartuchos Bond-Elut, lográndose obtener muestras más limpias que en el método por extracción líquido-líquido anteriormente utilizado. El estudio se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Waters Millenium, equipado con un detector de fluorescencia. El análisis de las muestras se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones cromatográficas: se utilizó una columna Spherisorb fenilo de Waters de 250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 μ m, una fase móvil consistente en ACN:Buffer de fosfatos 0.01 M pH 3.5 (40:60 v/v) y velocidad de flujo de 1.2 mL/min.

Los resultados muestran que el método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.012 a 25 μ g/mL, tanto para dextrometorfán como para dextrorfán, preciso (repetible y reproducible) tanto en un día como en varios días, exacto, sensible y estable en congelación durante por lo menos 30 días, por lo que es confiable para cuantificar dextrometorfán y su metabolito dextrorfán en orina, siendo éste método más sensible y selectivo que aquél en donde se utiliza un método de extracción líquido-líquido y detección U.V. para la extracción de la muestra.

El método analítico validado será utilizado para determinar la relación entre la concentración de dextrometorfán con respecto a dextrorfán en muestras de orina provenientes de voluntarios sanos, la cual determinará las características de la población con respecto a su fenotipo metabolizador.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.	2
2. GENERALIDADES.	5
2.1 Monografía del dextrometorfán (DMT).	5
2.1.1 Propiedades físicas y químicas.	6
2.1.1.1 Origen.	6
2.1.1.2 Grupo químico.	6
2.1.1.3 Nombre químico.	6
2.1.1.4 Formula empírica.	6
2.1.1.5 Peso molecular.	6
2.1.1.6 Descripción.	6
2.1.1.7 Solubilidad.	6
2.1.1.8 Constante de Disociación pKa.	6
2.1.2 Acciones e indicaciones terapéuticas.	7
2.1.3 Farmacodinamia.	7
2.1.4 Farmacocinética.	8
2.1.5 Efectos adversos y secundarios.	8
2.1.6 Contraindicaciones.	9
2.1.7 Presentación de formas farmacéuticas orales.	9
2.1.8 Dosis y vías de administración.	10
2.1.9 Alteraciones de las pruebas de laboratorio.	10
2.1.10 Precaución y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad.	10
2.1.11 Sobredosificación o ingesta accidental. Manifestaciones y manejo (antídotos).	11

ÍNDICE

2.2	Vías metabólicas del dextrometorfán.	11
2.3	Polimorfismo oxidativo de CYP2D6.	13
2.4	Validación de métodos bioanalíticos.	15
2.4.1	Linealidad.	16
2.4.2	Precisión.	17
2.4.2.1	Repetibilidad.	17
2.4.2.2	Reproducibilidad intralaboratorio.	18
2.4.3	Exactitud.	18
2.4.4	Límite de cuantificación.	19
2.4.5	Límite de detección.	19
2.4.6	Selectividad.	19
2.4.7	Recuperación absoluta.	20
2.4.8	Estabilidad de la muestra analítica.	20
2.5	Métodos analíticos para determinación de dextrometorfán y dextrorfán en fluidos biológicos.	20
3.	PARTE EXPERIMENTAL.	23
3.1	Optimización y validación del método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en orina.	23
3.1.1	Materiales, equipos e instrumentos.	23
3.1.2	Reactivos.	24
3.1.2.1	Sustancias de referencia.	25
3.1.3	Preparación de soluciones.	25
3.1.4	Preparación de la curva patrón.	27
3.1.5	Optimización de la fase móvil.	29
3.1.6	Optimización del método de extracción.	29
3.1.7	Optimización de las condiciones del detector de	

ÍNDICE

fluorescencia.	30
3.2 Validación del método analítico para cuantificar dextrometorfán y dextrorfán en orina.	30
3.2.1 Validación del sistema.	30
3.2.1.1 Linealidad y precisión del sistema.	30
3.2.2 Validación del método.	31
3.2.2.1 Linealidad del método.	31
3.2.2.2 Precisión del método.	31
3.2.2.2.1 Repetibilidad del método.	32
3.2.2.2.2 Reproducibilidad del método.	32
3.2.2.3 Exactitud del método.	32
3.2.2.4 Límite de cuantificación.	33
3.2.2.5 Límite de detección.	33
3.2.2.6 Selectividad.	33
3.2.2.7 Recuperación absoluta o recobro.	34
3.2.2.8 Estabilidad.	34
3.3 Uso del método para determinar el fenotipo metabolizador en voluntarios sanos.	36
3.3.1 Producto comercial empleado en el estudio.	36
3.3.2 Voluntarios.	36
3.3.3 Criterios de exclusión.	37
3.3.4 Protocolo de estudio.	37
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	40
4.1 Optimización del método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dextrometorfán en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución. (CLAR)	40

ÍNDICE

4.2	Validación del método analítico para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).	43
4.2.1	Validación del sistema.	43
4.2.1.1	Linealidad y precisión del sistema.	43
4.2.2	Validación del método.	47
4.2.2.1	Linealidad del método.	47
4.2.2.2	Precisión y exactitud del método.	52
4.2.2.2.1	Repetibilidad.	52
4.2.2.2.2	Reproducibilidad.	53
4.2.2.3	Recuperación absoluta.	55
4.2.2.4	Selectividad.	56
4.2.2.5	Límite de cuantificación.	58
4.2.2.6	Límite de detección.	58
4.2.2.7	Estabilidad.	58
4.3	Empleo del método para determinar el fenotipo metabolizador de voluntarios sanos.	71
5.	CONCLUSIONES.	76
6.	BIBLIOGRAFÍA.	78
7.	APÉNDICE I.	83
8.	APÉNDICE II.	84
9.	APÉNDICE III.	85

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Criterios de la antimoda para la aceptación del fenotipo metabolizador CYP2D6.	14
Tabla 2.	Métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizadas para la determinación y cuantificación de dextrometorfán y dexrorfán en orina y/o plasma.	21
Tabla 3.	Preparación de la curva patrón conteniendo dextrometorfán y dexrorfán en fase móvil u orina.	28
Tabla 4.	Condiciones cromatográficas.	41
Tabla 5.	Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrometorfán.	44
Tabla 6.	Linealidad del sistema para cuantificar dexrorfán.	46
Tabla 7.	Linealidad del método para cuantificar dextrometorfán.	48
Tabla 8.	Linealidad del método para cuantificar dexrorfán.	50
Tabla 9.	Repetibilidad para dextrometorfán.	52
Tabla 10.	Repetibilidad para dexrorfán.	53
Tabla 11.	Reproducibilidad para dextrometorfán.	54
Tabla 12.	Reproducibilidad para dexrorfán.	54
Tabla 13.	Recobro absoluto para dextrometorfán.	55
Tabla 14.	Recobro absoluto para dexrorfán.	56
Tabla 15.	Estabilidad de la muestra procesada para dextrometorfán.	59
Tabla 16.	Estabilidad de la muestra procesada para dexrorfán.	59

ÍNDICE

Tabla 17.	Estabilidad de dextrometorfán a temperatura ambiente.	60
Tabla 18.	Estabilidad de dextrorfán a temperatura ambiente.	61
Tabla 19.	Estabilidad de las muestras en refrigeración para dextrometorfán.	62
Tabla 20.	Estabilidad de las muestras en refrigeración para dextrorfán.	63
Tabla 21.	Estabilidad de dextrometorfán en congelación.	64
Tabla 22.	Estabilidad de dextrorfán en congelación.	65
Tabla 23.	Tabla comparativa de métodos analíticos para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en muestras de orina.	66
Tabla 24.	Tabla de resultados de los voluntarios que participaron en el estudio.	73

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Estructura química del Dextrometorfán (DMT).	6
Figura 2.	Vías metabólicas del dextrometorfán.	12
Figura 3.	Esquema de extracción para cuantificar dextrometorfán y dextrorfán en orina.	42
Figura 4.	Gráfica de linealidad del sistema para dextrometorfán.	45
Figura 5.	Gráfica de linealidad del sistema para dextrorfán .	47
Figura 6.	Gráfica de linealidad del método para dextrometorfán en orina.	49
Figura 7.	Gráfica de linealidad del método para dextrorfán en orina.	51
Figura 8.	Selectividad del método.	57
Figura 9.	Esquemas de comparación de los métodos de extracción empleados (líquido-líquido/ U.V.) y (sólido-líquido/ Fluorescencia).	70
Figura 10.	Esquemas de comparación de los metabolizadores lentos o pobres y metabolizadores rápidos o extensos.	74

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La O-desmetilación de dextrometorfán a dextrorfán se lleva a cabo por el CYP2D6. Debido a su perfil de seguridad ya que con una dosis única se logra determinar el fenotipo metabolizador de un individuo, el dextrometorfán es utilizado como un fármaco de prueba para identificar individuos con deficiencias en la oxidación de fármacos del tipo debrisoquina.

El laboratorio de Neuropsicofarmacología del INNN, en conjunto con la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), llevan a cabo un proyecto relacionado con el establecimiento del fenotipo y genotipo metabolizador del CYP2D6 en población mexicana, para lo cual es necesario determinar la concentración de dextrometorfán y su metabolito, dextrorfán en orina; sin embargo, el método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) que hasta la fecha era utilizado, no presentaba la sensibilidad y selectividad requeridas para éste tipo de análisis, razón por la cual en el presente estudio se buscó optimizar y validar un método por CLAR que resolviera ambos problemas.

De acuerdo a lo anterior, se requería de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que pudiera detectar dosis mínimas del fármaco y que además fuera selectivo, por lo que se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- Optimizar un método analítico para cuantificar dextrometorfán y su metabolito, dextrorfán, empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección por fluorescencia.
- Validar el método optimizado de acuerdo a los criterios de aceptación de la NOM 177-SSA-1-1998.

- Demostrar que el método se puede utilizar para determinar el fenotipo metabolizador de CYP2D6 en sujetos sanos.

GENERALIDADES

2. GENERALIDADES.

2.1. MONOGRAFÍA DEL DEXTROMETORFÁN (DMT).

El dextrometorfán (*d*-3-metoxi-N- metilmorfinano) es el *d*-isómero del análogo de la codeína levorfanol; sin embargo a diferencia del *l*-isómero, carece de propiedad analgésica o de potencial de adicción y no actúa en los receptores opioides. Se ha observado su eficacia en pacientes con tos patológica en estudios controlados, siendo semejantes a la codeína. En dosis terapéuticas no inhibe la actividad ciliar y sus efectos antitusivos persisten durante cinco a seis horas. Su toxicidad es baja, pero las dosis demasiado altas pueden producir depresión del SNC.⁽¹⁾

Se utiliza en forma de bromhidrato, polvo cristalino ligeramente soluble en agua, que posee un olor suave. Es un derivado del morfinano y éter metílico del levorfanol, analgésico y antitusivo. Puesto que el dextrometorfán carece de la actividad analgésica, del riesgo de adicción y de otras propiedades del levorfanol, este par de isómeros constituyen un buen ejemplo para mostrar la importancia de la estereoquímica en la acción de los fármacos.⁽¹⁾

2.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

En la figura 1 se muestra la estructura química del Dextrometorfán (DMT).

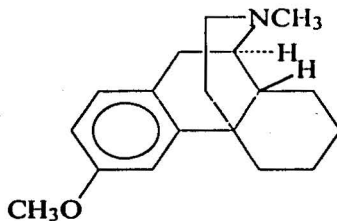


Figura 1. Estructura química del Dextrometorfán (DMT).

- 2.1.1.1. *Origen:* Dextroisómero metilado del análogo codeínico del levorfanol.
- 2.1.1.2. *Grupo químico:* Derivado no opiáceos del morfinano.
- 2.1.1.3. *Nombre químico:* Morfinano, 3-metoxi-17-metil-, (9 α , 13 α , 14 α)- bromhidrato, monohidratado.
- 2.1.1.4. *Fórmula empírica:* C₁₈ H₂₅ NO. HBr. H₂O.
- 2.1.1.5. *Peso molecular:* 370.33 g/mol.
- 2.1.1.6. *Descripción:* Cristales casi blancos o polvo cristalino, con olor débil, funde a unos 126°C con descomposición., pH de 5.2 a 6.5.
- 2.1.1.7. *Solubilidad:* un gramo es soluble en alrededor de 65 mL de agua; completamente soluble en alcohol o cloroformo e insoluble en éter.
- 2.1.1.8. *Constante de disociación:* pka: 8.3 ^(2,3)

2.1.2. ACCIÓN E INDICACIONES TERAPÉUTICAS.

El bromhidrato de dextrometorfán, es un fármaco antitusivo sin acción sedante, que a diferencia de los opiáceos y los sucedáneos, no produce efectos narcóticos ni adicción; su acción farmacodinámica la ejerce directamente sobre el centro de la tos, por su rápido y eficaz efecto sintomático para el tratamiento de las afecciones respiratorias de origen bacteriano. Está indicado en los procesos respiratorios que cursan con aumento de las secreciones bronquiales y de su adherencia, como la bronquitis aguda, bronquitis crónica, neumonía y bronconeumonía; en los procesos de las vías respiratorias altas como la sinusitis, síndrome sino-bronquial y en general, en aquellos procesos donde sea necesario sedar la tos y obtener efecto mucolítico.⁽⁴⁾

2.1.3. FARMACODINAMIA.

El dextrometorfán suprime el reflejo tusígeno por acción directa sobre el centro de la tos en el bulbo raquídeo, pero no causa analgesia o adicción y poca o ninguna depresión del SNC. No tiene acción expectorante. El tratamiento se dirige a aliviar la frecuencia de la tos sin abolir el reflejo tusígeno no protector. En dosis terapéuticas, el medicamento no presenta actividad ciliar, ni efecto hipnótico.⁽²⁾

2.1.4. FARMACOCINÉTICA.

Al administrarse por vía oral el dextrometorfán se absorbe con facilidad totalmente en el tracto gastrointestinal, presentando un inicio de acción rápida, observándose ésta a los 20 o 30 minutos de su ingestión.

Después de su administración oral en humanos se metaboliza ampliamente en el hígado mediante N-desalquilación y/o desmetilación a dextorfán (3-hidroxi-17-metilmorfina), 3-hidroximorfina, 3-metoximorfina, y conjugados en la posición del grupo 3-hidroxilo. Se ha reportado una gran variabilidad en el metabolismo de dextrometorfán y se conoce que el metabolismo de este fármaco esta bajo el mismo control genético que el polimorfismo oxidativo de debrisoquina. Su vida media plasmática es de 11 horas promedio; sin embargo, la variabilidad es muy grande debidos a la existencia de metabolizadores rápidos y lentos. ⁽⁵⁻⁷⁾

El dextrometorfán se excreta principalmente en la orina una vez transformado a sus principales metabolitos; cerca de 7 a 10% se excreta en las heces. ⁽²⁾

2.1.5. EFECTOS ADVERSOS Y SECUNDARIOS.

A dosis terapéuticas no se presenta ninguna reacción adversa y/o secundaria; mientras que a dosis por arriba de las recomendadas, podría ocasionar náuseas, diarrea, irritación gástrica, constipación, vértigo, somnolencia y vómito. En algunos casos puede presentarse hiperactividad, confusión mental, somnolencia, depresión del sistema

GENERALIDADES

nervioso, dificultad intensa para respirar y resequedad de la boca, alucinaciones visuales y auditivas. Su uso prolongado puede causar abuso y dependencia.⁽⁸⁾

2.1.6. CONTRAINDICACIONES.

El uso conjunto con inhibidores de la MAO, puede causar náuseas, hipotensión, excitación y coma por lo que no debe administrarse a pacientes que lleven menos de dos semanas de haber descontinuado los inhibidores de la MAO.⁽⁸⁾

No debe administrarse junto con medicamentos tranquilizantes y debe usarse con precaución cuando se presentan cuadros clínicos como asma o deterioro de la función hepática, también en aquellas enfermedades respiratorias en las cuales hay secreciones espesas, porque este fármaco puede deteriorar la movilización de las secreciones.

No se han reportado problemas por el uso de dextrometorfán durante el embarazo y la lactancia; sin embargo, el médico debe considerar la relación riesgo-beneficio.^(2,4)

2.1.7. PRESENTACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS ORALES

- * Bromhidrato de dextrometorfán. Tabletas de disolución bucal.
- * Bromhidrato de dextrometorfán. Jarabe.
- * Bromhidrato de dextrometorfán. Comprimidos masticables.

GENERALIDADES

* Dextrometorfán, polistirex. Suspensión oral de liberación prolongada.⁽⁸⁾

2.1.8. *DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.*

Adultos: Oral de 10 a 20 mg cada cuatro horas o 30 mg a intervalos de seis a ocho horas dependiendo de la necesidad. La descripción usual límite para adultos es de 120 mg al día.

Niños: La dosis usual para niños de dos a seis años es de 2.5 a 5 mg cada cuatro horas y para niños de seis a doce años es de 5 a 10 mg cada cuatro horas o 15 mg a intervalos de seis a ocho horas, dependiendo de la necesidad. No exceder de 60 mg en 24 horas⁽⁸⁾

2.1.9. *ALTERACIONES DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO.*

El dextrometorfán puede alterar y elevar los resultados de la amilasa sérica y transaminasa pirúvica.⁽⁸⁾

2.1.10. *PRECAUCIONES Y RELACIÓN CON EFECTOS DE CARCINOGENESIS, MUTAGENESIS, TERATOGENESIS Y SOBRE LA FERTILIDAD.*

No se ha reportado ningún efecto con dextrometorfán.⁽⁸⁾

2.1.11. SOBREDOSIFICACIÓN O INGESTA ACCIDENTAL: MANIFESTACIONES Y MANEJO (ANTÍDOTOS).

Cuando se excede la dosis recomendada puede presentarse mareo, nerviosismo y dificultad respiratoria. En algunos casos de sobredosificación puede presentarse más excitación que depresión. El antídoto específico Naloxona ha sido utilizado con éxito para tratar la sobredosificación con dextrometorfán.⁽⁸⁾

2.2. VÍAS METABÓLICAS DEL DEXTROMETORFÁN.

La O-desmetilación de dextrometorfán a dextrorfán se lleva a cabo por el CYP2D6, mientras que la formación de 3-metoximorfina y 3-hidroximorfina, se lleva a cabo en menor proporción también por el CYP2D6 y CYP3A4 respectivamente. Debido a las características de su metabolismo y a su perfil de seguridad, se ha sugerido que el dextrometorfán puede ser un fármaco de prueba superior para identificar individuos con deficiencias en la oxidación de fármacos del tipo debrisoquina.⁽⁹⁻¹²⁾

En la figura 2 se muestra la estructura química del dextrometorfán (DMT) y sus metabolitos, así como sus vías metabólicas.

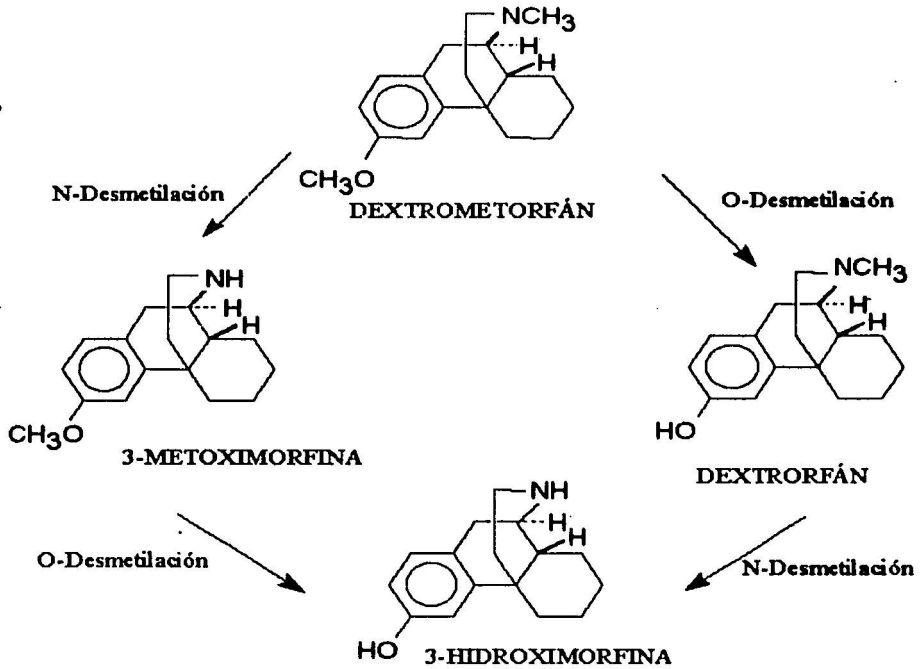


Figura 2. Vías metabólicas del dextrometorfán.

2.3. POLIMORFISMO OXIDATIVO DE CYP2D6.

Se ha propuesto que se puede establecer el fenotipo metabolizador de un individuo basándose en las concentraciones urinarias del fármaco y su metabolito, después de la administración de una dosis determinada de un marcador. Esto es útil para predecir el régimen de dosificación de un fármaco, aún si su índice terapéutico es estrecho. Las características ideales de un marcador son:

- 1) seguridad en un amplio rango de poblaciones
- 2) fácil administración
- 3) reproducibilidad en la asignación del fenotipo y
- 4) alto grado de especificidad para la enzima de interés.⁽¹³⁾

El CYP2D6 es la enzima que caracteriza mejor la expresión polimórfica de las enzimas del citocromo P450 en humanos. La debrisoquina se metaboliza en su mayor parte por CYP2D6, motivo por el cual, hasta hace poco tiempo, se utilizó como el fármaco de elección para establecer el polimorfismo genético de ésta enzima en estudios clínicos, encontrándose individuos metabolizadores extensos (EM), metabolizadores pobres (PM) y metabolizadores ultraextensos (UEM). Actualmente se han utilizado otros fármacos para establecer el fenotipo metabolizador, entre los que se encuentran esparteína, dextrometorfán, y más recientemente propafenona.

GENERALIDADES

Durante los últimos años, se ha observado que la O-desmetilación de dextrometorfán a dextrorfán es un método relativamente seguro y útil para determinar el fenotipo de CYP2D6 "in vivo" e "in vitro".^(14,15)

En la tabla 1 se presentan los criterios de aceptación para establecer el fenotipo del citocromo P-450 CYP2D6.

Tabla 1. Criterios de la antimoda para la aceptación del fenotipo metabolizador CYP2D6.

FÁRMACO PRUEBA Y PRODUCTO	CRITERIO DE ASIGNACIÓN DEL FENOTIPO
DEBRISOQUINA → 4-HIDROXIDEBRISOQUINA	PM=ME ≥ 12.6, UEM=ME ≤ 0.5
DEXTROMETORFÁN → DEXTRORFÁN	PM=ME ≥ 0.3
ESPARTEÍNA → 2-y-DEHIDROESPARTEÍNA	PM=ME ≥ 0.2

A continuación se presentan diferentes ejemplos de fármacos que se metabolizan por CY2D6.⁽¹⁶⁾

Antiarrítmicos: Encainida, Esparteína, Flecainida, Perhexilina, Propafenona.

Antidepresivos: Amitriptilina, Citalopram, Clomipramina, Desipramina, Fluoxetina, Fluvoxamina, Imipramina, Maprotilina, Mianserina, Nortriptilina, Paroxetina.

Bloqueadores β-adrenérgicos: Bufuralol, Metoprolol, Timolol, Propranolol.

GENERALIDADES

Neurolépticos: Haloperidol, Perfenazina, Risperidona, Thioridazina, Remoxiprida, Zuclopenthixol.

Misceláneos: Codeína, Debrisoquina, Dextrometorfán, Nicotina, Fenformina.

2.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.

La validación es la evidencia experimental documentada que incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica, es adecuado para cumplir con el propósito para el cual fue diseñado.⁽¹⁷⁾

Antes de emplear un método para un análisis de muestras, el analista debe obtener suficientes datos que evalúen el desempeño y la capacidad del método para conseguir resultados confiables, esto se lleva a cabo mediante la validación del método.⁽¹⁷⁾

Los parámetros de validación son establecidos por organismos regulatorios como la FDA, CEE, NOM, etc., y en general, son los siguientes: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, estabilidad de la muestra analítica y recuperación absoluta, entre otros.⁽¹⁷⁾

La NOM-177-SSA-1-1998 ⁽¹⁷⁾, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, recomienda validar un método analítico bajo los siguientes criterios:

2.4.1. LINEALIDAD.⁽¹⁷⁾

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se evalúa tanto la linealidad del sistema como la del método. De acuerdo a las especificaciones, el sistema se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99 y el error relativo debido a la regresión no mayor del 2%.

El coeficiente de correlación se obtiene mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en donde se utiliza la siguiente fórmula:

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

Donde: r = coeficiente de correlación

x = concentración

y = respuesta

Para calcular el error relativo debido a la regresión se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Error relativo} = (S_y/x) / y$$

$$S_y/x = \frac{\sum y^2 - \text{pendiente}(\sum xy) - \text{ordenada}(\sum y)}{n-2}$$

Donde: S_y/x = varianza

y = respuesta promedio

y = respuesta

x = concentración

n = número de datos

2.4.2. PRECISIÓN.⁽¹⁷⁾

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, evaluando repetibilidad y reproducibilidad.

2.4.2.1. REPETIBILIDAD.⁽¹⁷⁾

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para considerar un método repetible, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%. El cálculo del coeficiente de variación se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$C. V. = S_x / x$$

$$S_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - x)^2}$$

Donde: S_x = Desviación estándar

\bar{x} = concentración promedio

x = concentración

n = número de datos

2.4.2.2. REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO.⁽¹⁷⁾

Es la precisión de un método analítico en donde se expresa la variación obtenida entre las determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como los días, equipo, columnas o analistas. Un método es reproducible siempre y cuando el coeficiente de variación no sea mayor al 15%.

2.4.3. EXACTITUD.⁽¹⁷⁾

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina mediante la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel de la curva, con respecto a la concentración nominal de la muestra y para calcularla se emplea la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desv. absoluta} = 100 \times \frac{(\text{Conc. nominal} - \text{Conc. experimental promedio})}{\text{Conc. nominal}}$$

Para que el método se considere como exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración deben encontrarse dentro del 15% del valor nominal de concentración.

2.4.4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.⁽¹⁷⁾

Se define como la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse, cumpliendo con la exactitud y precisión establecidas en el método. Se establece que tiene validez como límite de cuantificación cuando el valor promedio de las cinco repeticiones se encuentran dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 20%.

2.4.5. LÍMITE DE DETECCIÓN.⁽¹⁷⁾

Se define como la mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Como límite de detección se considera aquella concentración cuya respuesta es de 2 a 4 veces la señal del ruido de fondo.

2.4.6. SELECTIVIDAD.⁽¹⁷⁾

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto de interés, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

2.4.7. RECUPERACIÓN ABSOLUTA.⁽¹⁷⁾

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Se evalúa determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración, el cual debe ser consistente en cada nivel dentro del rango de concentraciones.

2.4.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.⁽¹⁷⁾

Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta, el cual debe ser menor al 15%.

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DEXTROMETORFÁN Y DEXTRORFÁN EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Se han reportado diferentes métodos analíticos para la cuantificación de dextrometorfán y/o dextrorfán en fluidos biológicos, los métodos que se incluyen son: espectrometría de fluorescencia, radioinmunoanálisis, cromatografía de gases-líquidos, cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de capa fina. De los métodos antes mencionados, la cromatografía de líquidos de alta resolución ha sido el método más comúnmente empleado debido a su alta sensibilidad y a los sencillos métodos de extracción.

GENERALIDADES

En la tabla 2 se describen algunos métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente publicados para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán.

Tabla 2. Métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizados para la determinación y cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en orina y/o plasma.

Columna	Fase Móvil	Detector	λ del detector (nm)	Tiempo total del análisis (min)	Solvente utilizado en la extracción
Spherisorb-fenilo; 5 μ m.	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01M, pH 4.0 (45:55v/v). ⁽¹⁸⁾	Ultravioleta	280	15	Hexano y alcohol n-butílico
Novapack phenyl; 15X0.46 cm.	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01M, pH 4.0 (40:60v/v). ⁽¹⁹⁾	Ultravioleta y Fluorescencia	U.V. a 484 Fluorescencia a 280 y 310	10	Hexano: butanol (95:5v/v)
Selectosil (phenomene x); 4.6 μ m X 150 mm.	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos 0.01M, pH 3.0 (30:70v/v). ⁽²⁰⁾	Fluorescencia	280 y 305	20	10 mL de Hexano con trietilamina al 0.1%
Spherisorb-fenilo; 5 μ m.	Acetonitrilo: buffer de fosfatos 0.01M, pH 4.0 (35:65 v/v). ⁽²²⁾	U.V.-Visible	280	23	10 mL de diclorometano

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se dividió en dos partes:

1. Optimización y validación del método analítico para cuantificar dextrometorfán y dextrorfán en orina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).
2. Análisis de las muestras de voluntarios sanos para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán.

3.1. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DEXTROMETORFÁN Y DEXTRORFÁN EN ORINA.

El método analítico empleado fue el descrito por Wenk et.al.,⁽²¹⁾ con algunas modificaciones que posteriormente se mencionarán:

3.1.1. MATERIALES, EQUIPOS E INSTRUMENTOS.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters Millennium que consta de:
 - o Bomba cuaternaria con desgasificador modelo 600 controlled Waters.
 - o Detector de fluorescencia scanning modelo 474 Waters.
 - o Inyector automático modelo 717 plus Waters.
 - o Paquete de integración Millennium versión 32.

- Centrífuga Marathon modelo 26 KM.
- Centrífuga Sorvall modelo SS-3.
- Agitador Vortex Thermolyne modelo 37600.
- Balanza analítica OHAUS modelo AS-120.
- Potenciómetro OAKTON.
- Parrilla con calentamiento/agitación VWR Scientetic modelo 220.
- Repetidora Eppendorf Repeater plus.
- Micropipeta Eppendorf de 100 a 1000 μ L.
- Micropipeta Eppendorf de 10 a 100 μ L.
- Ultrasonido Fisher Scientific modelo FS20.
- Equipo para filtración Milipore con membrana de 0.45 mm.
- Manifold o equipo de extracción con cartuchos Bond-Elut.

3.1.2. REACTIVOS.

- Acetonitrilo, grado HPLC J.T. Baker.
- Metanol, grado HPLC Mallinckrodt.
- Agua desionizada, grado HPLC.
- Fosfato monobásico de potasio R.A. Mallinckrodt.
- Carbonato de sodio R.A. J.T. Baker.
- Ácido fosfórico R.A. Merck.
- Ácido clorhídrico R.A. J.T. Baker.
- Enzima b-glucoronidasa (105 000 unidades/mL) SIGMA.
- Acetato de sodio R.A. J.T. Baker.

3.1.2.1. SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

- Dextrometorfán clorhidrato donado por la Facultad de Química, UNAM, lote 47R50
- Dextrorfán-D tartrato Research Biochemicals International RBI. Lote 10 CM-IX-13

3.1.3. *PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.*

Solución estándar de Dextrometorfán (DMT).

Pesar con exactitud 10 mg de estándar de dextrometorfán, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con una mezcla acetonitrilo:agua (40:60v/v). Esta solución tiene una concentración de 1000 µg/mL de dextrometorfán (solución patrón A). De la solución patrón A transferir 1 mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo:agua (40:60v/v) (100 µg/mL, solución patrón B). De la solución anterior tomar 1 mL transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo:agua (40:60v/v) (10 µg/mL, solución patrón C).

Solución estándar de Dextrorfán (DT).

Pesar con exactitud 10 mg de estándar de dextrorfán, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con una mezcla acetonitrilo:agua (40:60v/v). Esta solución tiene una concentración de 1000 µg/mL de dextrorfán (solución patrón A). De la solución patrón A transferir 1

mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo:agua (40:60v/v) (100 µg/mL, solución patrón B). De la solución anterior tomar 1 mL transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo:agua (40:60v/v) (10 µg/mL, solución patrón C).

Solución enzimática de β-glucuronidasa (683 unidades/mL)

Tomar 65 µL de una solución comercial de enzima β-glucuronidasa de 105 000 U/mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2 M a pH de 5.0. Esta solución tiene una concentración final de 683 U/mL.

Solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2M pH 5.

Pesar 1.36 g de acetato de sodio, transferirlo a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.0 con ácido O-fosfórico al 85%.

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.01M pH 3.5.

Transferir a un matraz volumétrico de 1 L, 1.36 g de fosfato monobásico de potasio, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar el pH a 3.5 con ácido O-fosfórico al 85%, filtrar la solución al vacío a

través de una membrana millipore de 0.45 mm y desgasificar por sonicación al vacío durante 15 minutos.

3.1.4. *PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.*

La curva de calibración consistió de siete concentraciones: 0.012, 0.025, 0.1, 1, 5, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ tanto para dextrometorfán como para dextorfán, y tres puntos de control de calidad, cuyos valores se encontraban dentro del intervalo, pero no pertenecían a los valores establecidos para la curva de calibración. A estos se les asignaron valores de concentraciones de 0.05, 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$.

En la tabla 3 se esquematiza la preparación de los puntos correspondientes a la curva de calibración y puntos control conteniendo dextrometorfán y dextorfán en orina.

Tabla 3. Preparación de la curva patrón conteniendo dextrometorfán y dextrofán en fase móvil u orina.

Conc. de DMT y DT ($\mu\text{g/mL}$)	Alicuota de stock de DMT (μL).	Alicuota de stock de DT (μL).	Solución stock empleada para DMT ($\mu\text{g/mL}$)	Solución stock empleada para DT ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de ACN:Agua (40:60 v/v) u orina
0.012	12	12	C	C	10
0.025	25	25	C	C	10
0.05	5	5	B	B	10
0.1	10	10	B	B	10
0.5	50	50	B	B	10
1	100	100	B	B	10
5	50	50	A	A	10
8	80	80	A	A	10
10	100	100	A	A	10
25	250	250	A	A	10

El método analítico empleado se basó en el descrito por Wenk ⁽²¹⁾, con algunas modificaciones que a continuación se mencionan:

- Debido a que la λ de emisión no se encuentra reportada y presenta λ 228 nm de excitación se realizó un cambio en la λ de excitación y de emisión de 280 y 310 nm respectivamente.
- Se adecuó la fase móvil: metanol:acetonitrilo:buffer de fosfatos 0.01M pH 3.5 (20:25:55v/v) por una constituida en buffer de fosfatos:acetonitrilo 0.01M pH 3.5 (60:40 v/v).
- Se modificó la velocidad de flujo de 1.0mL/min. por una de 1.2mL/min.

- Se precisó el rango de concentraciones de la curva de calibración de 0.10 a 25 µg/mL por un rango de 0.012 a 25 µg/mL y la omisión de un estándar interno.

3.1.5. OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL.

La elección de la fase móvil se enfocó a aquella que definiera una mejor y mayor sensibilidad, una simetría ≤ 2.0 y una $R \geq 2.0$, para garantizar la separación aceptable de los picos y una adecuada integración y cuantificación de los mismos, la fase móvil empleada fue Buffer de fosfatos 0.01 M pH 3.5 / ACN (60:40v/v) y los cambios de la fase móvil realizados fueron en el pH y en la proporción de la misma manejando un rango de pH de 3.5 a 4 y una proporción de fase (65:35v/v) y (60:40v/v).

3.1.6. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El criterio para la selección del método de extracción se enfocó en aquel que ofreciera una mayor respuesta en términos de altura o áreas de pico, menor presencia de impurezas y repetibilidad en los resultados. Este método se basó en lo descrito por Wenk y colaboradores y consistió en realizar modificaciones en los volúmenes o alícuotas adicionadas de las soluciones empleadas para extraer. ⁽²¹⁾

3.1.7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Se evaluaron aquellas condiciones que proporcionaran una mayor respuesta de los pico de interés, así como una mayor sensibilidad para detectar cantidades mínimas del fármaco y su metabolito, se probaron cambios en la longitud de onda de emisión y de excitación en un rango de 230 a 330, así como variación en la ganancia, atenuación, tipo de filtro, esto último con respecto al detector, los cuales no se señalaron en el artículo.

3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR DEXTROMETORFÁN Y DEXTORFÁN EN ORINA.

Una vez obtenidas las condiciones analíticas del método, se realizó la validación del método.

3.2.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

3.2.1.1. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se determinó preparando, a partir de pesadas independientes, 2 curvas patrón de dextrometorfán (DMT) y dextroanfán (DT), en el intervalo de concentraciones de 0.012 a 25 µg/mL, de acuerdo a lo descrito en la tabla 3. Se graficó el área contra la concentración correspondiente y para cada curva se determina, por ajuste

de mínimos cuadrados, el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

La precisión del sistema se evaluó a partir de los datos de linealidad, de los cuales se obtuvo, para cada curva, el error debido a la regresión y el % C.V. del factor de respuesta.

3.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

3.2.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon 3 curvas patrón de dextrometorfán y dextrorfán en orina a partir de pesadas independientes, en el intervalo de concentraciones de 0.012 a 25 $\mu\text{g/mL}$, (tabla 3). Las muestras se procesaron de acuerdo a lo establecido después de optimizar el método y se inyectaron al cromatógrafo. Se graficó el área de dextrometorfán y dextrorfán contra la concentración correspondiente y para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

3.2.2.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO.

La precisión se determinó evaluando la repetibilidad o precisión intradía y reproducibilidad o precisión interdía.

3.2.2.2.1. Repetibilidad del Método.

Este parámetro se determinó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se analizaron por quintuplicado tres niveles de concentración 0.05, 0.5 y 8 µg/mL que corresponden a las concentraciones baja, media y alta del rango de concentraciones evaluado respectivamente. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de cada concentración.

3.2.2.2.2. Reproducibilidad del Método.

Para evaluar la reproducibilidad del método, se prepararon por duplicado los niveles de concentraciones correspondientes a 0.05, 0.5 y 8.0 µg/mL, en tres días continuos de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipo y laboratorio. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de cada concentración.

3.2.2.3. EXACTITUD DEL MÉTODO.

Se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel de la curva, con respecto a la concentración nominal de la muestra.

3.2.2.4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

El límite de cuantificación se estableció como la concentración más baja del fármaco que puede ser cuantificada con exactitud y precisión bajo las condiciones normales de operación. Se evaluó preparando por quintuplicado muestras de dextrometorfán y dextrorfán en orina a la concentración de 0.012 µg/mL. Se determinó el porcentaje de desviación absoluta y el coeficiente de variación.

3.2.2.5. LÍMITE DE DETECCIÓN.

El límite de detección se determinó haciendo diluciones del último punto de la curva hasta que la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica presentara una señal de ruido tres veces mayor.

3.2.2.6. SELECTIVIDAD.

Se evaluó analizando un pool de orina proveniente de voluntarios y muestras conteniendo diferentes fármacos de uso común. Ni la matriz biológica ni los productos de degradación, ni el tolueno, ni la β-glucoronidasa deben interferir con los picos de interés, así como tampoco la respuesta que pudieran dar los fármacos utilizados (ácido acetil salicílico y paracetamol).

3.2.2.7. RECUPERACIÓN RELATIVA O RECOBRO.

El recobro absoluto se evaluó preparando por triplicado muestras de concentraciones de 0.05, 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$, conteniendo tanto dextrometorfán como dextrorfán, en orina y en acetonitrilo:agua (40:60v/v). Los resultados de concentración obtenida en la matriz biológica, se compararon con los resultados de los mismos puntos preparados en acetonitrilo:agua 40:60 v/v, y se calculó el porcentaje de recobro a cada nivel de concentración. El porcentaje no necesariamente debe ser del 100%, pero si debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

3.2.2.8. ESTABILIDAD.

La prueba de estabilidad tuvo como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento y ésta se llevó a cabo, evaluando tres niveles de concentración en orina (0.05, 0.5 y 8 $\mu\text{g/mL}$), bajo las siguientes condiciones:

a) Estabilidad de la muestra procesada.

Para evaluar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por duplicado las concentraciones antes mencionadas, las cuales se procesaron de acuerdo al método de extracción propuesto. Las muestras fueron inyectadas al tiempo cero y después de 24 horas de procesadas,

comparándose la concentración recuperada promedio de las últimas con respecto a las de su valor inicial.

b) Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Para determinar la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, se prepararon por duplicado muestras control de dextrometorfán y dexrotrfán, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron e inyectaron a los tiempos 0, .24 y 48 horas. Las muestras se consideraron estables si la concentración recuperada promedio se encontraba dentro del límite del $\pm 15\%$ del valor original.

c) Estabilidad de la muestra en refrigeración a 5°C.

La estabilidad de las muestras en refrigeración se evaluó preparando por duplicado muestras control de dextrometorfán y dexrotrfán en orina, las cuales se mantuvieron en refrigeración a 5°C. Las muestras se procesaron y analizaron al tiempo 0 y a los 3 y 5 días después se comparó la concentración recuperada promedio del tiempo 0 con las obtenidas el resto de los días.

d) Estabilidad de la muestra en congelación.

Se evaluó la estabilidad de la muestra en congelación, preparando por duplicado muestras control de dextrometorfán y dexrotrfán en orina, las cuales se dividieron en dos partes iguales y se almacenaron en congelación a -70°C. La primera parte de las muestras se descongelaron, procesaron y analizaron a los 5 días, y el resto de las muestras a los 30 días de su

preparación. Las muestras se consideraron estables si la concentración recuperada promedio se encontraba dentro del límite del $\pm 15\%$ del valor original.

3.3. USO DEL MÉTODO PARA DETERMINAR EL FENOTIPO METABOLIZADOR EN VOLUNTARIOS SANOS.

Una vez validado el método, se reclutaron 12 voluntarios a los cuales se les determinó el fenotipo metabolizador para CYP2D6.

3.3.1. PRODUCTO COMERCIAL EMPLEADO EN EL ESTUDIO.

ROMILAR jarabe, frasco de 100 mL, Laboratorios ROCHE, México, conteniendo 0.300 g de Bromhidrato de Dextrometorfano.

3.3.2. VOLUNTARIOS.

En el estudio participaron 12 voluntarios sanos, de los cuales 4 eran del sexo femenino y 8 del sexo masculino, con edades comprendidas entre 21 a 52 años de edad.

A los participantes se les informó de la naturaleza y los fines del estudio mediante un protocolo con las indicaciones a seguir para la realización del mismo, mencionando las indicaciones y usos del fármaco y los posibles riesgos o efectos secundarios; así mismo, se les proporcionó un

cuestionario donde se requerían las características genealógicas de cada voluntario así como sus datos personales (Apéndice II). Cada uno de los voluntarios firmó una hoja dando su consentimiento (Apéndice I) para participar en dicho estudio.

3.3.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Quedaron excluidos del estudio aquellos sujetos que:

- a) Hubieran tomado algún medicamento 3 días previos al estudio.
- b) Presentaran hipersensibilidad al medicamento.
- c) Tuvieran alguna enfermedad hepática, renal o asociada a problemas de desarrollo.
- d) Padezieran úlcera gástrica o asma.

3.3.4. PROTOCOLO DEL ESTUDIO.

Cada uno de los participantes se ajustó al siguiente protocolo:

Antes de la administración del fármaco los voluntarios debían vaciar completamente la vejiga.

El día del estudio cada voluntario ingirió 10 mL de jarabe ROMILAR de ROCHE, equivalente a 30 mg de dextrometorfán, con un vaso de agua. El volumen del jarabe se midió con el vaso dosificador incluido en el producto farmacéutico.

PARTE EXPERIMENTAL

Después de la administración, se le pidió a cada voluntario coleccionar toda la orina correspondiente a 8 horas posteriores a la administración, en un frasco de vidrio color ámbar.

Se midió el volumen total de orina y se tomó una alícuota de 30 o 40 mL, la cual se centrifugó, se decantó y posteriormente se le adicionó tolueno para conservar las muestras, las cuales se congelaron a -70°C hasta el momento de su análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

**RESULTADOS
Y
ANÁLISIS
DE
RESULTADOS**

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR DEXTROMETORFÁN Y DEXTRORFÁN EN ORINA.

La fase móvil de elección consistió de una mezcla de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.01M pH 3.5/acetonitrilo en proporción (60:40v/v) a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min, ya que fue la que permitió obtener mejores parámetros cromatográficos de resolución, K' y simetría de picos.

En la tabla 4 se presentan las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de la muestra después de la optimización del método:

Tabla 4. Condiciones cromatográficas.

Detector	Fluorescencia
Longitud de onda	280 nm excitación y 310 nm emisión
Columna	Spherisorb fenilo, 4.6 x 250 mm I.D., con un tamaño de partícula de 5 μ m
Fase móvil	Acetonitrilo:Buffer de fosfatos 0.01M pH 3.5 (40:60 v/v)
Velocidad de flujo	1.2 mL/min.
Volumen de inyección	20 μ L
Temperatura de análisis	Ambiente
Tiempo de corrida	13 minutos

Para la selección del método de extracción se consideró aquel que nos permitiera tener una cantidad mayor de recobro tanto del fármaco como de su metabolito, así como la mínima presencia de impurezas procedentes de las muestras urinarias. El método de extracción final se muestra en la figura 3.

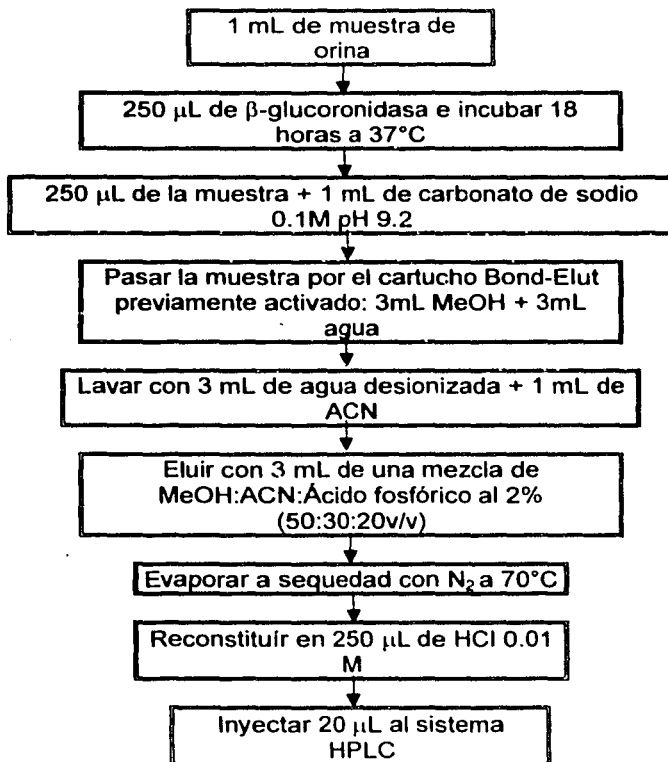


Figura 3. Esquema de extracción para cuantificar dextrometorfán y dextrorfán en orina.

4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DEXTROMETORFÁN Y DEXTRORFÁN EN ORINA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Los criterios para validar el método analítico se basaron en los lineamientos especificados por diversos organismos internacionales (NOM 177-SSA-1 1998).⁽¹⁷⁾

4.2.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

4.2.1.1. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos a partir de dos curvas de calibración en fase (ACN:Agua 40:60v/v) conteniendo dextrometorfán y/o dextrorfán y en las figuras 4 y 5 se muestran las curvas correspondientes. Se observa que el sistema es lineal en el rango de concentraciones de 0.012 a 25 µg/mL. El error relativo debido a la regresión fue menor al 2% en ambos casos y el C.V. % del factor de respuesta fue de 0.52 y 0.29% para dextrometorfán y dextrorfán respectivamente.

Tabla 5. Linealidad del sistema para la cuantificación de dextrometorfán (DMT).

Concentración (µg/mL)	Curva 1 áreas	Curva 2 áreas	Factor de respuesta 1	Factor de respuesta 2
0.012	4885.0	4862.0	407083.3	405166.7
0.025	10147.0	10169.5	405880.0	406780.0
0.1	40584.5	40470.5	405845.0	404705.0
1	400036.6	400176.5	400036.6	400176.5
5	2026953.5	2023584.0	405390.7	404716.8
10	4054253.0	4051987.0	405425.3	405198.7
25	10130540.5	10116706.0	405221.6	404668.2
Coefficiente de correlación (r)	1.0000	1.0000	-	-
Pendiente (m)	405285.2	404753.1	-	-
Ordenada al origen (b)	-687.919	-338.8	-	-
%error relativo	0.1012	0.1254	-	-
% C.V. del factor de respuesta	-	-	-	0.5157

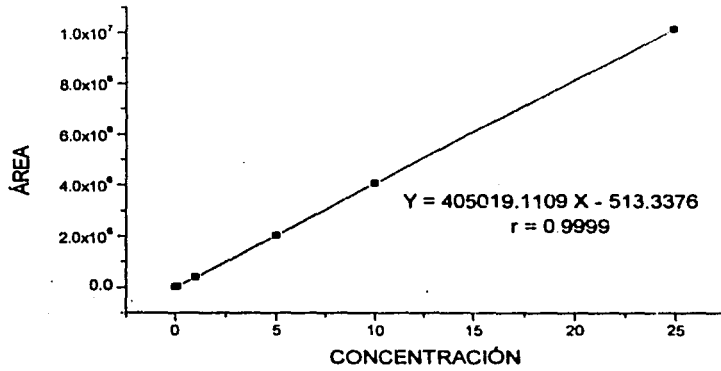


Figura 4. Linealidad del sistema para dextrometorfán en solución.

Tabla 6. Linealidad del sistema para cuantificar dextrorfan (DT).

Concentración (µg/mL)	Curva 1 áreas	Curva 2 áreas	Factor de respuesta 1	Factor de respuesta 2
0.012	6113.9	6179.0	509491.7	514916.7
0.025	12895.5	12833.0	515820.0	513320.0
0.1	51247.0	51287.0	512470.0	512870.0
1	512245.0	515953.0	512245.0	515953.0
5	2561767.0	2571257.0	512353.4	514251.4
10	5123646.0	5153069.0	512364.6	515306.9
25	12825811.0	12962615.5	513032.4	518504.6
Coefficiente de correlación (r)	1.0000	1.0000	-	-
Pendiente (m)	512992.1	514426.8	-	-
Ordenada al origen (b)	-1318.5	-1683.2	-	-
%error relativo	0.0924	0.1569	-	-
% C.V. del factor de respuesta	-	-	-	0.2930

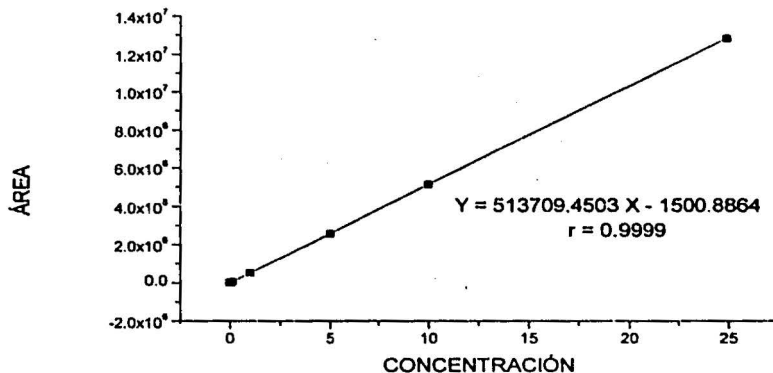


Figura 5. Linealidad del sistema para dextrorfán en solución

4.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

4.2.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

En las tablas 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos de tres curvas de calibración en orina conteniendo dextrometorfán y dextrorfán respectivamente en un rango de concentraciones de 0.012 a 25 $\mu\text{g/mL}$, y en las figuras 6 y 7 se muestran las curvas obtenidas.

Tabla 7. Linealidad del método para cuantificar dextrometorfán (DMT).

Concentración (µg/mL)	Curva 1 áreas	Curva 2 áreas	Curva 3 áreas	Promedio
0.012	4356.0	4291.5	4256.0	4301.2
0.025	9635.0	9911.0	9654.5	9733.5
0.1	38543.0	39108.0	38837.0	38829.3
1	387364.0	399623.2	387283.0	391423.4
5	1942679.0	1973162.2	1941816.0	1952552.4
10	3871145.0	3994652.0	3870840.5	3912212.5
25	9702316.0	9933175.0	9702026.0	9779172.3
r	1.0000	0.9999	1.0000	0.9999
m	388023.9	397514.2	388010.4	391182.8
b	-871.4	197.6	-981.4	-551.7

Conc. nominal (µg/mL)	Conc. recuperada 1 (µg/mL)	Conc. Recuperada 2 (µg/mL)	Conc. Recuperada 3 (µg/mL)	Promedio	Desv. estándar	% C.V.	% D.E.A. (exactitud)
0.012	0.013	0.010	0.013	0.012	0.002	14.81	3.52
0.025	0.027	0.024	0.027	0.026	0.002	6.20	5.23
0.1	0.102	0.098	0.103	0.101	0.002	2.47	0.69
1	1.001	1.005	1.001	1.002	0.002	0.24	0.20
5	5.009	4.963	5.007	4.993	0.026	0.52	0.14
10	9.979	10.049	9.979	10.002	0.040	0.40	0.02
25	25.007	24.988	25.007	25.000	0.011	0.04	0.00

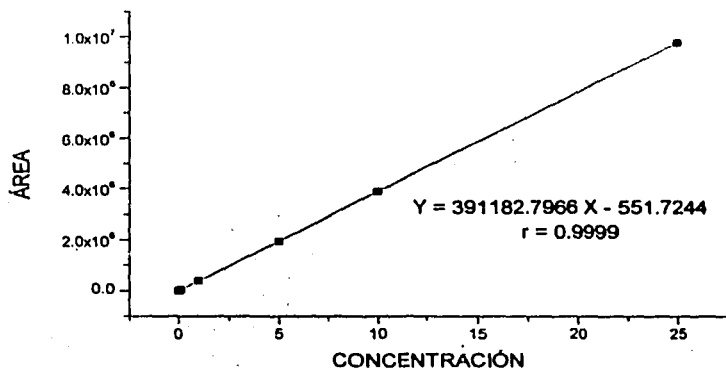


Figura 6. Linealidad del método para dextrometorfán en orina

Tabla 8. Linealidad del método para cuantificar dextrorfán (DT).

Concentración (µg/mL)	Curva 1 áreas	Curva 2 áreas	Curva 3 áreas	Promedio
0.012	3842.0	3618.0	3860.0	3773.3
0.025	7245.0	7099.0	7210.0	7184.6
0.1	29645.0	28899.0	29388.0	29310.6
1	293819.0	284349.0	293620.0	290596.0
5	1450167.5	1441252.0	1451052.5	1447490.7
10	2909148.0	2853775.0	2909148.0	2890690.3
25	7262148.0	7156210.0	7262748.0	7227035.7
r	1.0000	1.0000	1.0000	0.9999
m	290482.0	286174.3	290508.0	289054.7
b	922.6	407.2	914.3	748.0

Conc. nominal (µg/mL)	Conc. recuperada 1 (µg/mL)	Conc. recuperada 2 (µg/mL)	Conc. recuperada 3 (µg/mL)	Promedio	Desv. estándar	% C.V.	% D.E.A. (exactitud)
0.012	0.010	0.011	0.010	0.010	0.001	6.22	12.75
0.025	0.022	0.023	0.022	0.022	0.001	4.32	10.91
0.1	0.099	0.100	0.098	0.099	0.001	0.78	1.18
1	1.008	0.992	1.008	1.003	0.009	0.91	0.27
5	4.989	5.035	4.992	5.005	0.026	0.51	0.10
10	10.012	9.971	10.011	9.998	0.023	0.23	0.02
25	24.997	25.005	24.997	25.000	0.005	0.02	0.00

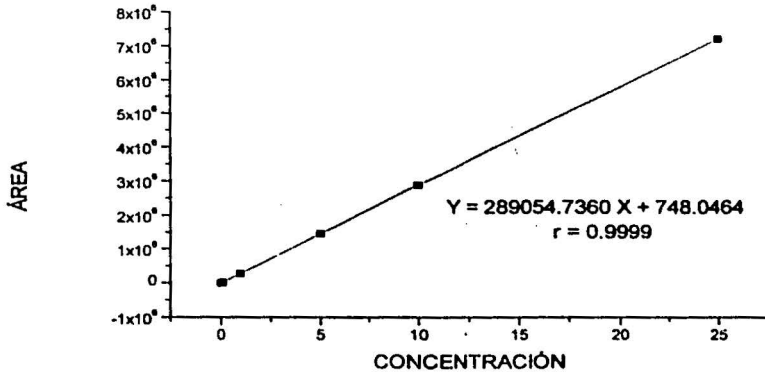


Figura 7. Linealidad del método para dextrorfán en orina

Al graficar el promedio de las áreas respecto a la concentración, el método se comportó de manera lineal en el intervalo de concentraciones de 0.012 a 25 $\mu\text{g/mL}$ tanto para dextrorfán como para dextrometorfán, presentando un coeficiente de correlación 0.9999 o mejor, en ambos casos.

4.2.2.2. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.

4.2.2.2.1. Repetibilidad.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la repetibilidad tanto para dextrometorfán como para dextroanfán, se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 9. Repetibilidad para dextrometorfán (DMT).

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.05	0.5	8.0
RÉPLICA	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
1	0.0490	0.5058	7.9345
2	0.0506	0.5031	8.0562
3	0.0497	0.4982	8.0538
4	0.0498	0.5078	7.9935
5	0.0516	0.4841	7.9900
Promedio	0.0501	0.4998	8.0056
Desv. Estándar	0.0010	0.0095	0.0508
% C.V.	1.98	1.90	0.64
% Desv. Absoluta	0.28	0.04	0.07

Tabla 10. Repetibilidad para dextrorfán (DT).

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.05	0.5	8.0
RÉPLICA	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
1	0.0448	0.5096	8.0062
2	0.0454	0.5067	7.9528
3	0.0448	0.4991	7.9366
4	0.0458	0.4979	8.0760
5	0.0452	0.5112	8.0268
Promedio	0.0452	0.5049	7.9997
Desv. Estándar	0.0004	0.0061	0.0565
% C.V.	0.8849	1.20	0.71
% Desv. Absoluta	9.60	0.98	0.004

Los resultados obtenidos muestran que el coeficiente de variación va de 0.64 a 1.98% para dextrometorfán y de 0.71 a 1.20% para dextrorfán, mientras que la desviación absoluta con respecto al valor nominal varía de 0.04 a 0.28% para dextrometorfán y de 0.004 a 9.60% para dextrorfán. En ambas pruebas el % C.V. fue menor al límite máximo del $\pm 15\%$.

4.2.2.2.2. Reproducibilidad.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad tanto para dextrometorfán como para dextrorfán, se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente.

Tabla 11. Reproducibilidad del dextrometorfán (DMT).

Concentración nominal (µg/mL)		0.05	0.5	8.0
DÍA	RÉPLICA	Concentración recuperada (µg/mL)		
1	1	0.0490	0.4978	8.0718
	2	0.0492	0.4906	8.0995
2	1	0.0483	0.5018	8.0247
	2	0.0494	0.5078	8.0793
3	1	0.0484	0.4961	8.1004
	2	0.0503	0.5115	7.6238
Promedio		0.0491	0.5009	7.9999
Desv. estándar		0.0007	0.0077	0.1863
% C.V.		1.49	1.55	2.33
% Desv. absoluta		1.80	0.19	0.001

Tabla 12. Reproducibilidad del dextroanfán (DT).

Concentración nominal (µg/mL)		0.05	0.5	8.0
DÍA	RÉPLICA	Concentración recuperada (µg/mL)		
1	1	0.0444	0.5006	7.9876
	2	0.0451	0.5102	8.1206
2	1	0.0453	0.5154	8.1196
	2	0.0452	0.5013	8.1130
3	1	0.0463	0.5056	8.0107
	2	0.0478	0.4940	7.6469
Promedio		0.0457	0.5045	7.9997
Desv. estándar		0.0012	0.0076	0.1825
% C.V.		2.63	1.51	2.28
% Desv. absoluta		8.63	0.90	0.003

De los resultados obtenidos se observa que el coeficiente de variación va de 1.49 a 2.33% para dextrometorfán y de 1.51 a 2.63% para dextrorfán, mientras que la desviación absoluta con respecto al valor nominal va de 0.001 a 1.80% para dextrometorfán y de 0.003 a 8.63% para dextrorfán. Considerando que el límite de variación permitido para establecer como preciso y exacto un método analítico aplicado a fluidos biológicos es del 15%, se considera que el método es preciso y exacto.

4.2.2.3. RECUPERACIÓN ABSOLUTA.

En las tablas 13 y 14 se muestra el porcentaje de recobro tanto para dextrometorfán como para dextrorfán en orina, evaluados por triplicado tanto en la matriz biológica como en solución.

Tabla 13. Recobro absoluto para dextrometorfán (DMT).

Tipo de muestra	Muestras extraídas de orina (µg/mL)			Muestras en fase no extraídas (µg/mL)		
	0.05	0.5	8	0.05	0.5	8
Concentración recuperada (µg/mL)	0.0534	0.4794	7.5534	0.0532	0.5040	7.9970
	0.0581	0.5208	8.2126	0.0563	0.4978	7.9546
	0.0524	0.4699	7.4157	0.0545	0.4916	8.0488
<i>Promedio</i>	<i>0.0546</i>	<i>0.4900</i>	<i>7.7272</i>	<i>0.0547</i>	<i>0.4978</i>	<i>8.0001</i>
% recobro				99.82	98.44	96.59

Tabla 14. Recobro absoluto para dextrofrán (DT).

Tipo de muestra	Muestras extraídas de orina ($\mu\text{g/mL}$)			Muestras en fase no extraídas ($\mu\text{g/mL}$)		
	0.05	0.5	8	0.05	0.5	8
Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	0.0447	0.4813	7.8199	0.0469	0.4985	7.9488
	0.0469	0.4964	8.0806	0.0475	0.4785	7.9036
	0.0467	0.5121	8.2759	0.0465	0.5068	8.1484
<i>Promedio</i>	<i>0.0461</i>	<i>0.4966</i>	<i>8.0588</i>	<i>0.0470</i>	<i>0.4946</i>	<i>8.0003</i>
% recobro				98.09	100.40	100.74

De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto para dextrometorfán como para dextrofrán, el recobro absoluto fue constante en el rango de concentraciones estudiado y resultó mayor del 95% para ambos fármacos, obteniéndose un % de recobro para dextrometorfán del 96.59 al 99.82% y del 98.09 al 100.74% para dextrofrán.

4.2.2.4. SELECTIVIDAD.

En la figura 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a la evaluación de selectividad, en ella se observa que ni los componentes de la matriz biológica, ni el tolueno, utilizado para la conservación de las muestras, la β -glucoronidasa, utilizada para la hidrólisis enzimática, no interfirieron en el análisis de dextrometorfán y dextrofrán. Los fármacos empleados para el estudio (ácido acetil salicílico y paracetamol) no interfieren con la señal de los fármacos de interés.

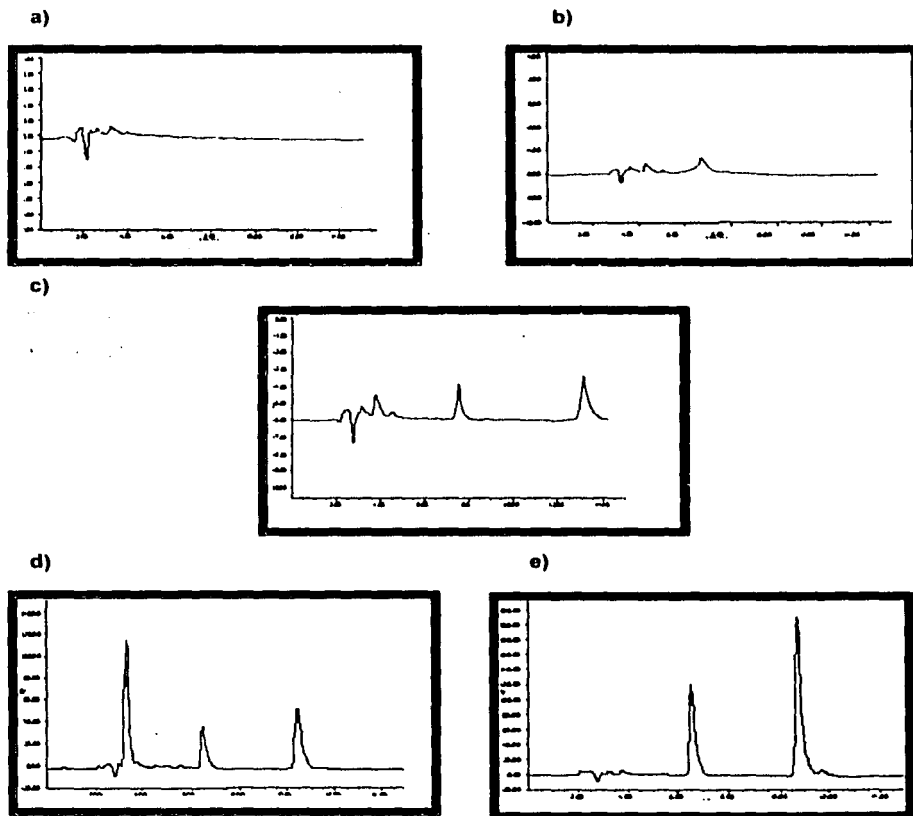


Figura 8. Selectividad del método: **a)** Blanco de orina; **b)** Muestra de orina con ácido acetil salicílico; **c)** Muestra de orina con paracetamol; **d)** Muestra de orina con DMT y DT, con tolueno; **e)** Muestra de orina con DMT y DT, sin tolueno y con β -glucuronidasa.

4.2.2.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Se consideró 0.012 µg/mL como la cantidad mínima cuantificable presentando una desviación absoluta con respecto al valor nominal y un coeficiente de variación menor al 20%.

4.2.2.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.

El límite de detección correspondió a la concentración de 0.006 µg/mL, señal tres veces mayor a la del ruido, concentración que se puede detectar pero no cuantificar.

4.2.2.7. ESTABILIDAD.

a) Estabilidad de la muestra procesada.

En las tablas 15 y 16 se observan los resultados correspondientes a la cuantificación de las muestras procesadas, reconstituidas con HCl 0.01M y mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas, tanto para dextrometorfán como para dextrorfán.

Tabla 15. Estabilidad de la muestra procesada para dextrometorfán (DMT).

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal (µg/mL)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0554	0.5244	7.9670
	2	0.0553	0.5210	7.9120
	Promedio	0.0554	0.5227	7.9395
24 horas	1	0.0564	0.5224	8.0501
	2	0.0580	0.5217	8.2934
	Promedio	0.0572	0.5221	8.1718
	% Desv. absoluta	3.34	0.12	2.93

Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada para dextrorfán (DT).

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal (µg/mL)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0490	0.5246	8.2887
	2	0.0528	0.5082	8.6350
	Promedio	0.0509	0.5164	8.4619
24 horas	1	0.0496	0.5292	8.3731
	2	0.0499	0.5368	8.8336
	Promedio	0.0498	0.5330	8.6034
	% Desv. absoluta	2.26	3.22	1.67

b) Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

En las tablas 17 y 18 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de las muestras mantenidas a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas después de su preparación.

Tabla 17. Estabilidad de dextrometorfán (DMT) a temperatura ambiente.

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0534	0.4794	7.5534
	2	0.0559	0.5184	7.8443
	Promedio	0.0547	0.4989	7.6989
24 horas	1	0.0541	0.5195	7.8120
	2	0.0562	0.5077	7.7573
	Promedio	0.0552	0.5136	7.7847
	% Desv. absoluta	0.92	2.95	1.12
48 horas	1	0.0538	0.5140	7.7964
	2	0.0560	0.5244	7.7746
	Promedio	0.0549	0.5192	7.7855
	% Desv. absoluta	0.46	4.07	1.13

Tabla 18. Estabilidad de dextrorfán (DT) a temperatura ambiente.

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0447	0.4813	7.8199
	2	0.0481	0.5268	8.2079
	Promedio	0.0464	0.5041	8.0139
24 horas	1	0.0457	0.5306	8.1532
	2	0.0454	0.5048	8.1830
	Promedio	0.0456	0.5177	8.1681
	% Desv. absoluta	1.83	2.71	1.92
48 horas	1	0.0484	0.5167	8.0974
	2	0.0482	0.5032	8.0899
	Promedio	0.0483	0.5100	8.0937
	% Desv. absoluta	4.10	1.17	0.99

c) Estabilidad de la muestra en refrigeración a 5°C.

En las tablas 19 y 20 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de las muestras conservadas en refrigeración a 5°C durante 3 y 5 días después de su preparación.

Tabla 19. Estabilidad de las muestras en refrigeración para dextrometorfán (DMT).

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0534	0.4794	7.5534
	2	0.0559	0.5184	7.8443
	Promedio	0.0547	0.4989	7.6989
3 días	1	0.0548	0.5061	7.8422
	2	0.0537	0.5030	7.7855
	Promedio	0.0543	0.5046	7.8139
	% Desv. absoluta	0.73	1.13	1.49
5 días	1	0.0552	0.5061	7.6802
	2	0.0538	0.5118	7.7258
	Promedio	0.0545	0.5090	7.7030
	% Desv. absoluta	0.28	2.01	0.05

Tabla 20. Estabilidad de las muestras en refrigeración para dextrorfan (DT).

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal (µg/mL)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0447	0.4813	7.8199
	2	0.0481	0.5268	8.2079
	Promedio	0.0464	0.5041	8.0139
3 días	1	0.0437	0.5044	8.1273
	2	0.0454	0.5042	8.0797
	Promedio	0.0446	0.5043	8.1035
	% Desv. absoluta	3.99	0.05	1.12
5 días	1	0.0456	0.5074	7.9198
	2	0.0465	0.5045	8.1936
	Promedio	0.0461	0.5060	8.0567
	% Desv. absoluta	0.75	0.38	0.53

d) Estabilidad de la muestra en congelación.

En las tablas 21 y 22 se observan los resultados obtenidos en la cuantificación de muestras mantenidas en congelación a -70°C durante 5 y 30 días.

Tabla 21. Estabilidad de dextrometorfán (DMT) en congelación.

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0534	0.4794	7.5534
	2	0.0559	0.5184	7.8443
	Promedio	0.0547	0.4989	7.6989
5 días	1	0.0556	0.5100	7.7180
	2	0.0562	0.5154	7.8406
	Promedio	0.0559	0.5127	7.7793
	% Desv. absoluta	2.29	2.77	1.05
30 días	1	0.0575	0.5205	7.7936
	2	0.0570	0.5123	7.7587
	Promedio	0.0573	0.5164	7.7762
	% Desv. absoluta	4.76	3.51	1.00

Tabla 22. Estabilidad del dextroorfán (DT) en congelación.

TIEMPO	RÉPLICA	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		
		0.05	0.5	8.0
0 horas	1	0.0447	0.4813	7.8199
	2	0.0481	0.5268	8.2079
	Promedio	0.0464	0.5041	8.0139
5 días	1	0.0477	0.5070	8.0322
	2	0.0484	0.5197	8.1050
	Promedio	0.0481	0.5134	8.0686
	% Desv. absoluta	3.56	1.85	0.68
30 días	1	0.0486	0.5296	8.1286
	2	0.0468	0.5229	8.0857
	Promedio	0.0477	0.5263	8.1072
	% Desv. absoluta	2.80	4.40	1.16

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó, que las muestras conteniendo tanto dextrometorfán como dextroorfán en orina, son estables a temperatura ambiente, durante 48 horas; en refrigeración a 5°C durante 5 días y en congelación a -70°C , por lo menos durante 30 días. Las muestras procesadas y reconstituidas en HCl 0.01M fueron estables por lo menos durante 24 horas ya que la desviación absoluta con respecto al valor inicial fue menor al 15%.

Para llevar a cabo la cuantificación de dextrometorfán y su metabolito, dextroorfán en orina, y que estos datos sirvan para poder establecer con confianza el fenotipo metabolizador de CYP2D6, se requería de un método sensible y selectivo; sin embargo, el método por cromatografía de líquidos

de alta resolución (CLAR) empleado hasta la fecha, ⁽²²⁾ no presentaba la sensibilidad requerida para éste tipo de análisis, razón por la cual en el presente estudio se buscó optimizar y validar un método por CLAR que resolviera éste problema.

En la tabla 23 se presenta la comparación de ambos métodos analíticos para cuantificar DMT y DT por CLAR. El primer método consiste en una extracción líquido-líquido y detección UV, mientras que en el presentado en éste trabajo, se emplea una extracción sólido-líquido y detección por fluorescencia.

Tabla 23. Tabla comparativa de condiciones cromatográficas de los métodos analíticos para la cuantificación de dextrometorfán y dextrorfán en muestras de orina.

REFERENCIA	Método de referencia 22	Método optimizado
COLUMNA	Spherisorb fenilo	Spherisorb fenilo
TIEMPO DE CORRIDA	23 minutos	13 minutos
LONGITUD DE ONDA	280 nm	280 nm (excitación) y 310 nm (emisión)
FLUJO	1.3 mL/min.	1.2 mL/min.
DETECTOR	U.V.	Fluorescencia
EXTRACCIÓN	Líquido-líquido	Sólido-líquido
FASE MÓVIL	ACN: Buffer de fosfato monobásico de potasio 0.01M a pH=4.0 (35:65)	ACN: Buffer de fosfato monobásico de potasio 0.01M a pH=3.5 (40:60)
CANTIDAD DE MUESTRA	2 mL	1 mL
UTILIZACIÓN DE E.I.	Clomipramina	-

La utilización de orina como matriz biológica representa el primer problema a enfrentarse en éste tipo de determinaciones debido a la cantidad de sustancias endógenas que contienen éste tipo de muestras, lo anterior aunado a que éste fármaco presenta otros dos metabolitos secundarios (fig. 2), hace necesario el uso de un método que nos permita eliminar en su mayor parte, las interferencias que pudieran presentar éstos compuestos sobre nuestros compuestos de interés, lo cual se puede lograr en su mayor parte, utilizando métodos de extracción líquido-líquido o sólido-líquido.

La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, peligro de evaporaciones finales, etc). Adicionalmente, en el análisis de cantidades muy pequeñas, debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito. Una extracción sólido-líquido, se lleva a cabo en pequeñas columnas o cartuchos de plástico, las cuales se encuentran rellenas con cantidades variables de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de columnas HPLC. Este tipo de extracción podría, en determinado momento, ser más caro que el otro tipo de extracción; sin embargo, se eliminan la mayoría de los problemas presentados por un método líquido-líquido y, dependiendo del relleno del cartucho y del método de lavado de éste, es posible obtener muestras mucho más "limpias" de sustancias endógenas que por el otro método, lo cual, en nuestro caso, resultaba de gran importancia. El utilizar éste tipo de extracción para nuestras muestras

resultó de gran beneficio ya que no tan solo el residuo final (muestra reconstituida) resultaba mucho más limpia (representando mayor tiempo de vida para la columna), si no que los cromatogramas obtenidos presentaron muy pocas y pequeñas señales debidas a compuestos endógenos.

Otro aspecto a considerar para lograr una mejor y mayor cuantificación del fármaco y su metabolito es el tipo de detección que se puede emplear, como es el caso de los detectores U.V. y de fluorescencia.

El detector U.V. es el de primera elección y el más empleado, por la simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su empleo porque el analito carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible emplear otros detectores, como es el caso del detector de fluorescencia. El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierten en un detector adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a dos factores:

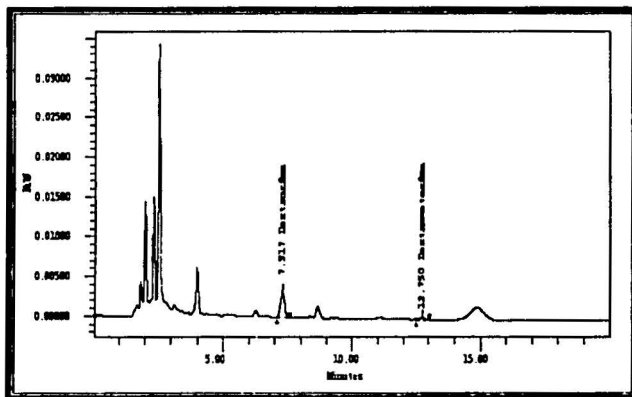
1) Existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula de analito.

2) Se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una longitud de onda dada, varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirían a la longitud de onda elegida.⁽²³⁾

En nuestro caso, ambos compuestos (dextrorfán y dextrometorfán) fluorescen naturalmente, lo cual fue una gran ventaja ya que evitó el uso de una reacción de derivatización y permitió tener una detección con mayor sensibilidad y selectividad que al utilizar detección U.V.

En la figura 9 se muestran las diferencias que existen entre una extracción líquido-líquido con detección U.V. y una extracción sólido-líquido con detección por fluorescencia.

a)



b)

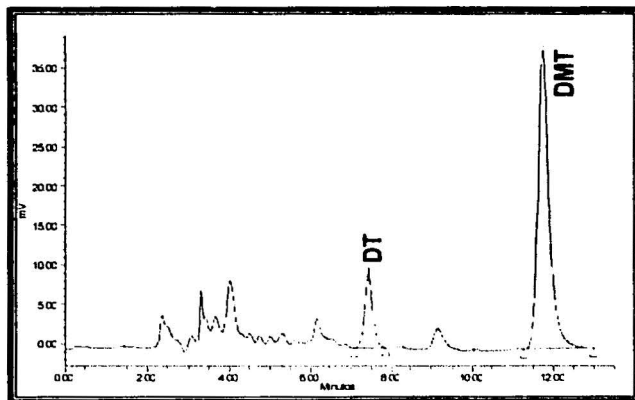


Figura 9. a) extracción líquido-líquido (U.V.) y b) extracción sólido-líquido (fluorescencia).

El método validado en el presente trabajo, empleando un método de extracción sólido-líquido y una detección por fluorescencia, resultó ser más sensible y selectivo que el empleado anteriormente, lográndose incluso disminuir el tiempo de corrida a la mitad, debido a que se logró una adecuada determinación sin utilizar estándar interno. Por otra parte, el tener un método más sensible permitió bajar la dosis de dextrometorfán de 60 mg (20 mL) a 30 mg (10 mL), lo cual disminuye de ésta manera los efectos secundarios reportados.

4.3. EMPLEO DEL MÉTODO PARA DETERMINAR EL FENOTIPO METABOLIZADOR EN VOLUNTARIOS SANOS.

Para comprobar que el método validado podía utilizarse para los fines para los que fue diseñado se analizaron muestras de 12 voluntarios sanos de ambos sexos, reclutados de acuerdo a lo señalado en la sección 3.3.2. Lo anterior se llevo a cabo en el Laboratorio de Farmacocinética de la Facultad de Medicina, UNAM. Las muestras de orina permanecieron congeladas a -70°C hasta el día de su análisis, empleando el método analítico por CLAR previamente validado. El día del análisis se preparó una curva de calibración en orina, y la concentración de dextrometorfán y dextrorfán en las muestras de orina, se determinó sustituyendo los valores de áreas de cada muestra en la ecuación de la recta de la curva de calibración, generada por un ajuste de mínimos cuadrados.

Así mismo, para demostrar la validez de la corrida, se prepararon puntos control en orina a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo) dentro del intervalo de trabajo, los cuales debían de cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

El fenotipo metabolizador se determinó a partir de la proporción metabólica entre el dextrometorfán y el dextrorfán total. Debido a que el metabolito se elimina por orina como dextrorfán libre y conjugado, antes de extraer las muestras, fue necesario realizar una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa para liberar el dextrorfán conjugado y poder cuantificar el dextrorfán total. La determinación de dextrorfán libre se realizó a partir de los resultados obtenidos de las muestras de orina a las cuales no se les realizó hidrólisis enzimática y el valor de dextrorfán conjugado se obtuvo con la diferencia entre el dextrorfán total y el dextrorfán libre.

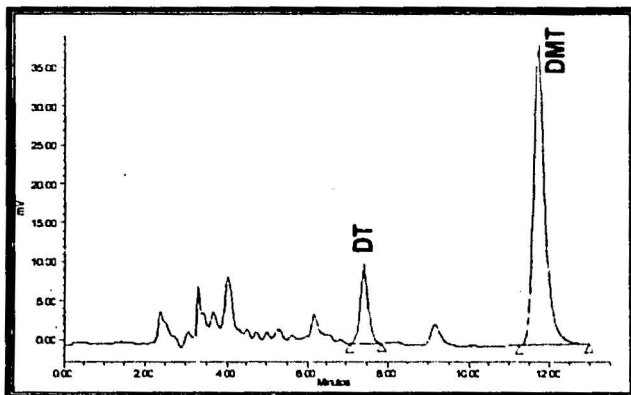
En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos de los 12 voluntarios reclutados, donde se señala: el género, el volumen de orina, la concentración de dextrometorfán, la concentración de dextrorfán libre, la concentración de dextrorfán total, la concentración de dextrorfán conjugado, la relación de la concentración de dextrometorfán con respecto a la concentración de dextrorfán total (proporción metabólica) y el fenotipo metabolizador de cada voluntario; para ello, una proporción metabólica mayor a 0.3 representa a un metabolizador pobre o lento (MP) y una proporción metabólica menor a 0.3 representa a un metabolizador rápido o extenso (ME).

Tabla 24. Tabla de resultados de los voluntarios que participaron en el estudio.

No. voluntario	Sexo	Vol. Orina (mL)	DMT	DT libre	DT total	DT conjugado	DMT/DT total	Fenotipo
1	F	765	0.08	2.74	15.28	12.54	0.005	ME
2	M	720	21.47	17.14	17.46	0.32	1.226	MP
3	M	320	0.14	23.68	46.48	22.80	0.003	ME
4	M	208	0.02	1.39	17.29	15.90	0.001	ME
5	F	700	2.16	0.07	0.47	0.40	4.596	MP
6	M	600	20.42	9.29	9.34	0.05	2.186	MP
7	F	880	0.10	0.97	8.29	7.32	0.012	ME
8	M	275	0.12	1.04	29.46	28.42	0.004	ME
9	F	434	0.09	7.23	25.53	18.30	0.004	ME
10	M	370	12.99	12.84	12.87	0.03	1.009	MP
11	M	405	0.02	5.89	13.45	7.56	0.002	ME
12	M	370	0.03	10.91	26.48	15.57	0.002	ME

En la figura 10 se puede observar un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para dos tipos de metabolizadores. a) Se presenta el cromatograma del voluntario 5 el cual se clasificó como un metabolizador pobre en el cual se puede observar que la concentración de dextrometorfán (2.16 µg/mL) es más grande que la concentración de dextrorfán total (0.47 µg/mL), mientras que en el cromatograma b) que corresponde al voluntario 12 quien se clasificó como un metabolizador extenso, muestra una concentración de dextrometorfán (0.03 µg/mL) la cual es mas pequeña que la concentración de dextrorfán total (26.48 µg/mL), de acuerdo a lo anterior, se concluye que el método validado puede ser utilizado con confianza para los fines para los cuales fue establecido.

a)



b)

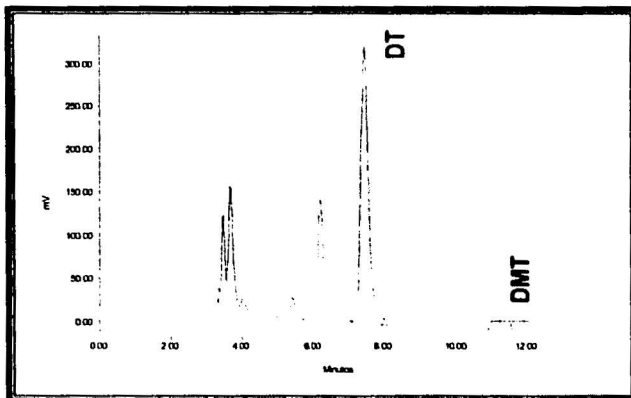


Figura 10. a) cromatograma correspondiente a un metabolizador pobre o lento y **b)** cromatograma correspondiente a un metabolizador extenso o rápido.

5. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el método analítico optimizado y validado para la cuantificación de dextroanfán y dextrometorfán en orina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) fue:

- LINEAL en el intervalo de concentraciones entre 0.012 y 25 µg/mL, para ambos compuestos.
- PRECISO (Repetible y Reproducible) tanto en un día como en varios días, cuando el análisis fue realizado por el mismo analista, en el mismo laboratorio y bajo las mismas condiciones de trabajo y equipo.
- EXACTO en el intervalo de concentraciones entre 0.012 y 25 µg/mL.
- SENSIBLE, ya que la concentración mínima detectable fue de 0.006 µg/mL y la concentración mínima cuantificable con precisión y exactitud fue de 0.012 µg/mL.
- ESTABLE a temperatura ambiente por 48 horas, en refrigeración durante 5 días y en congelación 30 días. La muestra procesada fue estable durante 24 horas.
- SELECTIVO, ya que no se presentaron interferencias de las muestras de orina con y sin hidrólisis enzimática, ni del tolueno, ni de algunos fármacos que pudieran ser ingeridos por los voluntarios (ácido acetil salicílico y paracetamol).

El método analítico validado para cuantificar dextrometorfán y dextroanfán en orina, tuvo mayor sensibilidad y selectividad con respecto al empleado con anterioridad. El método analítico se puede utilizar y aplicar con confianza para determinar el fenotipo metabolizador de CYP2D6 disminuyéndose considerablemente la cantidad de dextrometorfán ingerido por cada voluntario.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Vol. I. 9a. ed; Mc. Graw-Hill Interamericana. (1996) pp.489-490.
2. F. Mc. Van Barbara. Índice de Medicamentos. Manual Moderno. 1ª. ed. (1995) pp. 592-593.
3. Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, Widdop B. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. Segunda edición. The Pharmaceutical Press London (1986) pp. 520-524.
4. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 38a. e d. México D. F. (1992) pp. 302,332.
5. Chen ZR, Somogyi AA, Bochner F. Simultaneous determination of dextromethorphan and three metabolites in plasma and urine using high-performance liquid chromatography with application to their disposition in man. Ther. Drug. Monit. 12 (1990) pp. 97-104.
6. Barnhat JW, The urinary excretion of dextromethorphan and three metabolites in dogs and humans. Tox. Appl Phar. 55 (1980) pp. 43-48.
7. Larrey D, Amouyal G, Tinel M. Polymorphism of dextromethorphan oxidation in a French population. Br J. Clin. Pharmacol. 24 (1987) pp. 676-679.

BIBLIOGRAFÍA

8. Rodríguez CR. Vademécum Académico de Medicamentos. Mc Graw-Hill Interamericana. 3ª. ed. México D.F. (1999) Facultad de Medicina UNAM. pp. 1025.
9. Jacqz-Aigran E, Funck-Bretano C, Cresteil T. CYP2D6 and CYP3A-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. Pharmacogenetics. 3 (1993) pp. 197-204.
10. Roy SD, Hawes EM, Hubbard JW. Methoxyphenamine and dextromethorphan as safe probes for debrisoquine hydroxylation polymorphism. Lancet. I. (1984) pp. 1393.
11. Küpfer A, Schmid B, Pfaff G. Dextromethorphan as a safe probe for debrisoquine hydroxylation polymorphism. Lancet. I. (1984) pp. 517-518.
12. Dayer P, Leemann T, Striberni R. Dextromethorphan O-demethylation in human microsomes: a selective probe for the debrisoquine-type of oxidation polymorphism. Experientia. 43 (1987) pp. 701.
13. Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Inborn "errors" of drug metabolism pharmacokinetics and clinical implications. Clin. Pharmacokinet. 19 (1990) pp. 257-263.
14. Schmid B, Bicher J, Presig R. Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquine hydroxylation. Clin Pharmacol Ther. 38 (1985) pp. 618.

BIBLIOGRAFÍA

15. Dayer P, Leemann T, Striberni R. Dextromethorphan O-demetylation in liver microsomes as a phenotype reaction to monitor cytochrome p-450 db1 activity. Clin Pharmacol Ther. 45 (1989) pp. 34.
16. Llerena A, Cobaleda J, Martínez C and Benítez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. Eur. J. Drug Metab. Pharmacok. 21 (1996) pp. 129-138.
17. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Diario Oficial de la Federación. Primera Sección. México D. F. Viernes 7 de mayo de 1999.
18. Park YH, Kullberg MP, Hinsvark ON. Quantitative determination of dextromethorfan and three metabolites in urine by reserve-phase high-performance liquid chromatography. J.Pharm Sci. 73 (1984) pp. 24-29.
19. Shad VP, Midha KK, Dighe S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. J. Pharm Sci. 81 No.3 (1992) pp. 309-312.
20. Manuac JS, Foxworth JW, Willsie SK. Dextrometorphan polymorphic hepatic oxidation (CYP2D6) in healthy black American adult subjects. Ther. Drug.Monit. 17 (1995) pp. 120-124.
21. Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorpan as an in vivo probe the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. J.Chromat. B. 678 (1996) pp. 113-128.

BIBLIOGRAFÍA

22. Rubio Carrasco K. Estudio del fenotipo metabolizador de CYP2D6 en una población utilizando Dextrometorfán. UNAM. México, D. F. (2000) pp. 64.
23. Quattrochi OA, Andrizzi SIA, Laba RF. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro. (1992). pp. 29-33, 206-212.

APÉNDICES

7. APÉNDICE I.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR UTILIZANDO
DEXTROMETORFÁN.

HOJA DE CONSENTIMIENTO.

NOMBRE: _____
FECHA DE NACIMIENTO: _____
EDAD: _____ NACIONALIDAD: _____
SEXO: _____
DIRECCIÓN: _____
TELEFONO: _____

Por medio de la presente, doy mi consentimiento pleno y sin coacción de ninguna especie para participar en el estudio de **dextrometorfán** (jarabe). He recibido una copia del protocolo, la cual he leído, enterándome del procedimiento y posibles efectos secundarios del medicamento bajo estudio.

Estoy de acuerdo en participar y cooperar, tomando el medicamento y tratamiento como se me indique.

Nombre y firma del voluntario:

Nombre y firma del testigo:

Nombre y firma del investigador:

Nombre y firma del médico responsable:

Lugar y fecha:

8. APÉNDICE II.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR UTILIZÁNDO
DEXTROMETORFÁN.

CUESTIONARIO DEL VOLUNTARIO.

VOLUNTARIO No. _____.

NOMBRE DEL VOLUNTARIO: _____
NOMBRE COMPLETO INICIALES

EDAD: _____ SEXO: _____ PESO: _____.

NACIONALIDAD: _____.

FECHA Y HORA REAL DE LA ADMINISTRACION: _____.

VOLUMEN DE ORINA RECOLECTADA: _____.

FECHA DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: _____.

Conteste el siguiente cuestionario.

La semana previa al estudio, estuvo bajo tratamiento con algún medicamento?, si su respuesta es si indique por favor el nombre de dicho medicamento. _____.

¿Ha ingerido tabletas anticonceptivas o algún tratamiento hormonal en los últimos días? _____.

¿Es fumador?, si su respuesta es si indique por favor el número de cigarros que se fuma diario. _____.

¿Ingiere bebidas alcohólicas, café o té?, si su respuesta es si indique con que frecuencia las consume. _____.

Mencionar la nacionalidad de sus siguientes familiares.

Madre: _____.

Padre: _____.

Abuelo paterno: _____.

Abuela paterna: _____.

Abuelo materno: _____.

Abuela materna: _____.

9. APÉNDICE III.

CARACTERÍSTICAS DE LOS VOLUNTARIOS QUE PARTICIPARON EN EL ESTUDIO.

NÚMERO DE VOLUNTARIO	VOLUMEN DE ORINA (ML)	EDAD (AÑOS)	SEXO	PESO (KG)	FUMA
01	765	30	F	64	No
02	720	21	M	72	No
03	320	25	M	54	No
04	208	24	M	73	No
05	700	52	F	61	No
06	600	31	M	72	Sí
07	880	22	F	51	Sí
08	275	25	M	83	Sí
09	434	25	F	60	Sí
10	370	24	M	66	No
11	405	24	M	70	No
12	370	24	M	74	Sí