

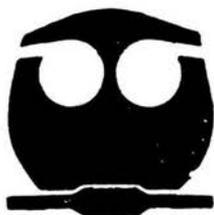


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Optimización y validación de un método
analítico por CLAR (Cromatografía Líquida de
Alta Resolución) para cuantificar fluoxetina
en plasma”

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ZULLY PAOLA SÁNCHEZ NAVA
RICARDO ENRIQUE ZAMBRANO TORRES



MÉXICO, D.F.

ESTUDIANTES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

| | |
|------------------|--|
| Presidente | PROF. SOFÍA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO |
| Vocal | PROF. LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ |
| Secretario | PROF. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE |
| Primer suplente | PROF. JOSE MANUEL MORALES HERNÁNDEZ |
| Segundo suplente | PROF. LIZ JANNET MEDINA REYES |

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA, EDIFICIO DE
INVESTIGACIÓN 6° PISO, FACULTAD DE MEDICINA,
UNAM**

ASESOR:

M. en F. Luis Jesús García Aguirre

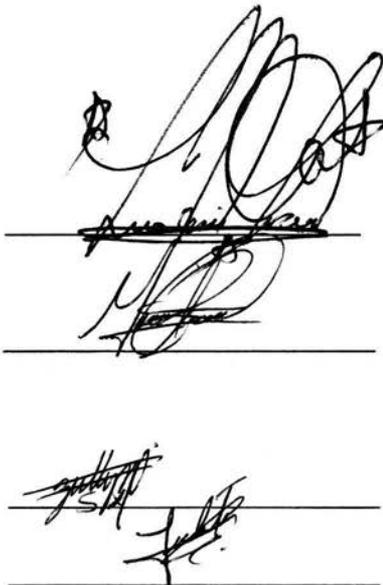
SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Maribel Ramírez Reséndiz

SUSTENTANTES:

Zully Paola Sánchez Nava

Ricardo Enrique Zambrano Torres



Handwritten signatures of the jury members, including Luis Jesús García Aguirre, Maribel Ramírez Reséndiz, Zully Paola Sánchez Nava, and Ricardo Enrique Zambrano Torres, positioned to the right of their respective names and under horizontal lines.

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente gracias a Dios porque sin Él nada en esta vida sería posible, por la salud y por el amor de nuestras familias.

A los profesores Luis Jesús García Aguirre y Liz Jannet Medina Reyes, gracias por sus enseñanzas, por su paciencia y por el apoyo que nos brindaron.

A la Q.F.B. Maribel Ramírez Reséndiz, por todo el tiempo invertido, por su colaboración y sobre todo por su amistad.

Zully Paola Sánchez Nava
Ricardo Enrique Zambrano Torres

A Rafael Morales Barrón, mi nene monito porque desde que apareciste en mi vida has sido un motivo para seguir adelante, por todo tu apoyo, tu ternura, tu comprensión y sobre todo por tu amor.

A Ricky, por ser mi compañero a lo largo de la carrera por los momentos que pasamos en la universidad, por tu valiosa colaboración en la realización de este trabajo, por todos los ánimos que siempre me das, y por que eres el mejor amigo que tengo.

A las chicas del club porque gracias a ustedes comprendí el verdadero significado de la palabra amistad y porque sé que siempre podré contar con ustedes.

A mi tía Luisa, a mi mamá Licha y a Nar, porque sé que desde donde estén me dan ánimos y le piden a Dios que me cuide.

Con todo mi cariño para todos ustedes:

Zully Paola

Porque este trabajo es de ustedes:

A mis padres Profr. Jesús Alejandro Sánchez Román y Profra. Lucía Reina Nava Astudillo por darme la vida, por estar conmigo siempre que he necesitado, por todo el amor incondicional que me han brindado, por su apoyo, por ser la prueba mas grande de que Dios me ama, por esta meta que es inspirada en y para ustedes y por ser mi ejemplo a seguir.

A mi hermana Larissa Haydeé Sánchez Nava y a mi sobrino Narciso Delgado Sánchez por todo el cariño que me han demostrado, porque siempre he contado con ustedes, por su compañía y por todo el apoyo que he recibido de su parte.

A mis padrinos Dr. Narciso Delgado Chávez y Sra. Tulia C. de Delgado por el apoyo que me brindaron durante mi carrera.

A mi mamá Pilar Torres:

Eres madre el ser mas preciado que me dió el Creador. Te doy gracias porque en tu vientre me tuviste, con mucho amor me acogiste, educaste y alimentaste. Eres el modelo que debo seguir. Cuando pienso en algo bello, solo pienso en ti. Espero algún día recompensarte todo lo que has hecho por mí.

A mi papá Enrique Zambrano:

Hoy te quiero decir lo mucho que te amo. Agradezco todo el cariño, comprensión, desvelos y trabajo que has puesto en mí. Sé como te afanas para traer el dinero a la casa, Para que todos tengamos que comer, que vestir, una educación óptima y todo lo necesario.

¡Gracias papá por ser tan maravilloso!
¡Gracias por ser mi guía, mi amigo,
mi ejemplo a seguir!

A mi hermano Sinuhé que siempre me ha apoyado en todo y ha estado pendiente de mí.

A mi abuelita Lupita y a mi tía Lucy por su gran apoyo y cariño que me han brindado todos los días de mi vida.

A mi gran amiga Zully que siempre me ayudó y apoyó en la escuela y por su gran colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Ricardo Enrique

INDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABLAS | vi |
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 2 |
| III. GENERALIDADES | 4 |
| 3.1. Depresión | 4 |
| 3.1.1. Tipos de depresión | 4 |
| 3.1.2. Síntomas de la depresión | 6 |
| 3.1.3. Causas de la depresión | 7 |
| 3.1.4. Depresión según edad y sexo | 8 |
| 3.1.5. Diagnóstico | 10 |
| 3.1.5.1. Criterios diagnósticos. | 10 |
| 3.2. Características químicas de fluoxetina | 13 |
| 3.3. Propiedades farmacológicas de fluoxetina | 14 |
| 3.3.1. Mecanismo de acción | 14 |
| 3.3.2. Propiedades farmacocinéticas | 14 |
| 3.3.3. Interacciones medicamentosas | 16 |
| 3.3.4. Toxicidad | 18 |
| 3.4. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución | 19 |
| 3.4.1. Instrumental | 19 |
| 3.4.2. Bombas | 20 |
| 3.4.3. Inyectores | 20 |
| 3.4.4. Detectores | 20 |
| 3.4.5. Fase móvil | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.6. Columnas y fases estacionarias | 22 |
| 3.5. Validación de métodos bioanalíticos | 23 |
| 3.5.1. Linealidad | 24 |
| 3.5.2. Precisión | 24 |
| 3.5.3. Exactitud | 25 |
| 3.5.4. Límite de cuantificación | 25 |
| 3.5.5. Límite de detección | 26 |
| 3.5.6. Selectividad | 26 |
| 3.5.7. Recobro | 26 |
| 3.5.8. Estabilidad de la muestra analítica | 26 |
| 3.6. Métodos para la cuantificación de fluoxetina en plasma | 27 |
| IV. PARTE EXPERIMENTAL. | 29 |
| 4.1. Material, instrumentos y equipo. | 29 |
| 4.1.1. Material | 29 |
| 4.1.2. Instrumentos | 29 |
| 4.1.3. Equipo | 29 |
| 4.1.4. Reactivos y sustancias de referencia | 30 |
| 4.2. Preparación de soluciones. | 31 |
| 4.3. Método de extracción a optimizar | 33 |
| 4.5. Validación del sistema | 35 |
| 4.5.1. Adecuabilidad del sistema | 35 |
| 4.6 Validación del método analítico | 36 |
| 4.6.1 Linealidad | 36 |
| 4.6.2. Precisión del método | 36 |
| 4.6.2.1. Repetibilidad del método | 36 |
| 4.6.2.2. Reproducibilidad del método | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.3. Exactitud del método | 37 |
| 4.6.4. Recobro. | 38 |
| 4.6.5. Estabilidad | 38 |
| 4.6.6. Límite de cuantificación y límite de detección | 40 |
| 4.6.7. Selectividad | 40 |
| 4.6.8. Tolerancia | 40 |
| V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS. | 41 |
| 5.1. Condiciones cromatográficas | 41 |
| 5.2 Método de extracción optimizado | 41 |
| 5.3 Validación del método | 42 |
| 5.3.1 Linealidad del método | 42 |
| 5.4. Precisión del método | 44 |
| 5.4.1. Repetibilidad del método | 44 |
| 5.4.2. Reproducibilidad del método y exactitud intradía | 45 |
| 5.5 Exactitud del método | 47 |
| 5.6. Límite de cuantificación | 48 |
| 5.7. Límite de detección | 48 |
| 5.8. Selectividad | 49 |
| 5.9. Recobro | 50 |
| 5.10. Estabilidad de la muestra analítica | 51 |
| 5.10.1. Estabilidad de las muestras en refrigeración | 51 |
| 5.10.2. Estabilidad de las muestras en los ciclos congelación-descongelación | 52 |
| 5.10.3. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente | 53 |
| 5.10.4. Estabilidad de la muestra procesada | 54 |
| 5.10.5. Estabilidad a largo plazo | 55 |
| 5.11. Tolerancia del método | 56 |

| | |
|--------------------------|----|
| VI. CONCLUSIONES | 58 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 59 |

LISTA DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química de fluoxetina | 13 |
| Figura 2. Linealidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma | 43 |
| Figura 3. Selectividad del método | 50 |

LISTA DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Valores de DL ₅₀ de fluoxetina | 18 |
| Tabla 2. Preparación de la curva de calibración y los controles de fluoxetina en plasma | 33 |
| Tabla 3. Condiciones de almacenamiento de las soluciones estándar independientes y de las soluciones de la muestra procesada | 39 |
| Tabla 4. Linealidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma | 43 |
| Tabla 5. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma | 44 |
| Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma (Analista 1) | 45 |
| Tabla 7. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma (Analista 2) | 46 |
| Tabla 8. Reproducibilidad entre analistas | 46 |
| Tabla 9. Exactitud intradía | 47 |
| Tabla 10. Exactitud del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma | 48 |
| Tabla 11. Límite de cuantificación | 49 |
| Tabla 12. Recobro de fluoxetina | 51 |
| Tabla 13. Estabilidad de las muestras en refrigeración | 52 |
| Tabla 14. Estabilidad de las muestras en los ciclos congelación-descongelación | 53 |
| Tabla 15. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente | 54 |
| Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada | 55 |

| | |
|---|----|
| Tabla 17. Estabilidad a largo plazo | 56 |
| Tabla 18. Tolerancia del método a cambios en la proporción de fase móvil y temperatura | 57 |

I. RESUMEN.

La determinación de niveles plasmáticos de fármacos de uso común es un aspecto importante en la interpretación del comportamiento farmacocinético y terapéutico del principio activo en estudio; para tal fin, es necesario contar con un método analítico validado que proporcione resultados confiables.

En el presente trabajo se optimizó un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y detección UV para cuantificar fluoxetina en plasma. La fluoxetina es un fármaco ampliamente usado en nuestro país para el tratamiento de la depresión.

Los aspectos principales optimizados, fueron obtener las condiciones cromatográficas adecuadas como son la columna, componentes y proporción de la fase móvil, efectos del pH y temperatura, rango de concentración, técnica de extracción, entre otras, para posteriormente validar el método bajo los parámetros de linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio), exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, recobro absoluto y estabilidad de la muestra bajo condiciones de almacenamiento, establecidas en la NOM-177-SSA1-1998.

II.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La depresión es uno de los más serios y comunes padecimientos de la salud mental que enfrenta las sociedades modernas. En la actualidad, millones de personas en el mundo sobreviven en medio de esta enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó que la depresión se convertirá en el año 2020 en la segunda causa de incapacidad en el mundo, detrás de las enfermedades isquémicas (infartos, insuficiencia coronaria, accidente cerebrovascular) mientras que en el año 2000 ocupaba el cuarto lugar (1).

De ahí que desde los distintos organismos sanitarios se esté potenciando la investigación para intentar controlar este trastorno mental, cuyo índice de prevalencia, lejos de disminuir, amenaza con incrementarse a medida que transcurra el siglo XXI.

La fluoxetina es un agente antidepresivo que tiene una vida media de aproximadamente 2 a 3 días y actualmente es muy empleado en la práctica clínica para el tratamiento de dicha enfermedad.

La optimización de esquemas farmacoterapéuticos que lleven a un mejor control de la depresión mental, requiere entre otros aspectos, el de caracterizar los niveles plasmáticos del fármaco administrado, y para tal fin es necesario contar con metodología analítica validada, por lo que se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

1. Optimizar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar fluoxetina en plasma, para posteriormente utilizarlo en

estudios de bioequivalencia, biodisponibilidad o farmacocinética y de esta forma tener un método más aparte de los ya reportados para los fines mencionados.

2. Validar el método de acuerdo con los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-1998, estos criterios son: linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, recobro, estabilidad de la muestra analítica y tolerancia.

III.- GENERALIDADES.

3.1 DEPRESIÓN (1,2).

El término depresión viene del latín *depressio*: hundimiento. La depresión es un estado mental caracterizado por sentimientos de culpa, desesperanza, melancolía, desánimo y la impresión general de que no merece la pena vivir. Puede haber también un deterioro de las funciones mentales y físicas, como apetito, sueño y trabajo.

Muchos creen erróneamente que la depresión es normal en personas mayores, adolescentes, mujeres menopáusicas, madres primerizas o en personas que padecen enfermedades crónicas. Pero éste es un concepto equivocado, no importa la edad, el sexo o la situación de la vida, la depresión nunca es algo normal.

3.1.1. TIPOS DE DEPRESIÓN (1,2).

De acuerdo a la sintomatología que se padezca, la depresión se clasifican en diferentes tipos.

Los tres tipos de depresión más comunes son:

- * Trastorno depresivo mayor
- * Trastorno distímico y
- * Trastorno bipolar.

Trastorno depresivo mayor.

Se manifiesta por una combinación de síntomas que interfieren con la capacidad para trabajar, estudiar, dormir, comer y disfrutar de actividades que antes eran placenteras.

Trastorno distímico.

La distimia es más frecuente en las mujeres que en los hombres y también puede afectar a los niños. Es un tipo de depresión menos grave, incluye síntomas crónicos (a largo plazo) que no incapacitan tanto, pero sin embargo interfieren con el funcionamiento y el bienestar de la persona. La característica esencial de este trastorno es un estado de ánimo crónicamente depresivo que está presente la mayor parte del día de la mayoría de los días durante al menos 2 años.

Trastorno bipolar.

Éste no es tan frecuente como los otros trastornos depresivos. El trastorno bipolar se caracteriza por cambios cíclicos en el estado de ánimo: fases de ánimo elevado o eufórico (manía) y fases de ánimo bajo (depresión).

Cuando una persona está en la fase depresiva del ciclo, puede padecer de uno, de varios o de todos los síntomas del trastorno depresivo. Cuando está en la fase maníaca, la persona puede estar hiperactiva, hablar excesivamente y tener una gran cantidad de energía.

Hay diferentes tipos del trastorno afectivo bipolar:

1) Trastorno bipolar I:

Es la forma clásica de esta condición, con períodos de manía discretos que alternan con períodos de depresión.

2) Trastorno bipolar II:

La fase depresiva predomina y no existe una manía verdadera.

3.1.2. SÍNTOMAS DE LA DEPRESIÓN (1,3).

No todos experimentan la depresión de la misma manera, los síntomas varían según las personas. La depresión puede ser calificada como leve, moderada o grave dependiendo de la cantidad y gravedad de sus síntomas.

Síntomas del trastorno bipolar.

El trastorno bipolar produce cambios del ánimo patológicos de manía a depresión, con una tendencia a recurrir y a desaparecer espontáneamente. Tanto los episodios maníacos como los depresivos pueden predominar y producir algunos cambios en el estado de ánimo, o los patrones de cambios del estado de ánimo pueden ser cíclicos, comenzando a menudo con una manía que termina en una depresión profunda.

Durante la fase depresiva el paciente presenta:

- * Pérdida de la autoestima
- * Sentimientos de desesperanza o minusvalía
- * Sentimientos de culpabilidad excesivos o inapropiados
- * Fatiga (cansancio o aburrimiento) que dura semanas o meses.
- * Insomnio
- * Problemas de concentración, fácil distracción por sucesos sin trascendencia.
- * Dificultad para tomar decisiones
- * Pérdida del apetito
- * Pensamientos sobre el suicidio
- * Disminución del interés en las actividades diarias.

En la fase maníaca se presentan:

- * Exaltación del estado de ánimo
- * Ideas fugaces o pensamiento acelerado
- * Autoestima alta
- * Menor necesidad de dormir
- * Logorrea (hablar más de lo usual o tener la necesidad de continuar hablando)
- * Incremento en la actividad involuntaria (caminar de un lado a otro).

Síntomas del trastorno distímico (1,3).

Los síntomas más frecuentemente encontrados en el trastorno distímico son:

- * Pérdida generalizada de interés o placer
- * Aislamiento social
- * Sentimientos de culpa o tristeza referente al pasado
- * Sentimientos subjetivos de irritabilidad o ira excesiva
- *.Descenso de la actividad, la eficiencia y la productividad.

3.1.3 CAUSAS DE LA DEPRESION (3).

La depresión puede estar causada por uno o varios factores. Hay diferentes razones que intentan explicar esta predisposición.

Herencia:

Existe un mayor riesgo de padecer de depresión clínica cuando hay una historia familiar de la enfermedad, lo que indica que se puede haber heredado una predisposición biológica.

Factores Bioquímicos:

Se ha demostrado que la bioquímica del cerebro juega un papel significativo en los trastornos depresivos. Se sabe, que las personas con depresión grave típicamente tienen desequilibrios de ciertas sustancias químicas en el cerebro, conocidas como neurotransmisores.

Situaciones estresantes:

Muerte de un familiar próximo o de un amigo, una enfermedad crónica, problemas interpersonales, dificultades financieras, divorcio pueden ocasionar síntomas de depresión que sostenidos a lo largo del tiempo pueden desencadenar en una depresión clínica.

Personalidad:

Las personas con esquemas mentales negativos, baja autoestima, sensación de falta de control sobre las circunstancias de la vida y tendencia a la preocupación excesiva son más propensas a padecer de depresión.

3.1.4 DEPRESION SEGÚN EDAD Y SEXO (3).

La depresión en la mujer:

Las estadísticas muestran que las mujeres padecen más depresión que los hombres, esto se debe a que existen diferencias biológicas entre ambos. Los cambios hormonales, tales como estrógeno y progesterona parecen tener un efecto importante en el estado de ánimo de las mujeres. Los cambios en los niveles

hormonales se producen durante una serie de acontecimientos que están asociados a la depresión, en particular los cambios del ciclo menstrual, el embarazo, el aborto, el periodo de niños, el mantenimiento del hogar y un empleo.

La depresión en el hombre:

El hombre es diagnosticado menos que la mujer. La depresión también puede afectar la salud física del hombre, aunque en una forma diferente a la de la mujer. El alcohol y las drogas enmascaran la depresión en el hombre más comúnmente que en la mujer. Igualmente, el hábito de trabajar en exceso, puede enmascarar una depresión.

La depresión en la vejez:

Cuando una persona mayor se deprime, a veces su depresión se considera erróneamente un aspecto normal de la vejez. Los síntomas depresivos pueden deberse a efectos secundarios de medicamentos que la persona está tomando, o debidos a una enfermedad física concomitante.

La depresión en la niñez:

El niño deprimido puede simular estar enfermo, rehusar a ir a la escuela, no querer separarse de los padres o tener miedo a que uno de los padres se muera. El niño más grande puede ponerse de mal humor, meterse en problemas en el colegio, comportarse como un niño travieso o indisciplinado, estar malhumorado o sentirse incomprendido.

3.1.5 DIAGNÓSTICO (1,3).

Para poder diagnosticar una depresión, el profesional deberá indagar en la historia del paciente, sus manifestaciones clínicas, la presencia de síntomas específicos y el tiempo que lleva dicha sintomatología. Una buena evaluación diagnóstica debe incluir una historia médica completa. ¿Cuándo comenzaron los síntomas, cuánto han durado, qué tan serios son? El médico también debe preguntar acerca del uso de alcohol y drogas, y si el paciente tiene pensamientos de muerte o suicidio.

3.1.5.1 CRITERIOS DIAGNOSTICOS (1,3).

Trastorno depresivo mayor.

Para diagnosticar un trastorno depresivo mayor deben estar presentes:

A. Cinco (o más) de los siguientes síntomas durante un período de 2 semanas, uno de los síntomas debe ser:

- i. estado de ánimo depresivo ó
- ii. pérdida de interés o de la capacidad para el placer.

1. Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi cada día según lo indica el propio sujeto.
2. Disminución acusada del interés o de la capacidad para el placer en todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi cada día.
3. Pérdida importante de peso sin hacer régimen o aumento de peso, o pérdida o aumento del apetito casi cada día.
4. Insomnio o hipersomnias casi cada día.
5. Fatiga o pérdida de energía casi cada día.

6. Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados casi cada día.
7. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o indecisión, casi cada día.
8. Pensamientos recurrentes de muerte, ideación suicida recurrente sin un plan específico o una tentativa de suicidio o un plan específico para suicidarse.

B. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.

C. Los síntomas no son debidos a los efectos fisiológicos directos de una sustancia o una enfermedad médica.

Trastorno distímico.

A. Estado de ánimo crónicamente depresivo la mayor parte del día de la mayoría de los días, manifestado por el sujeto y observado por los demás.

B. Presencia, mientras está deprimido de dos (o más) de los siguientes síntomas:

- * Pérdida o aumento de apetito
- * Falta de energía o fatiga
- * Baja autoestima
- * Dificultades para concentrarse o para tomar decisiones

C. No ha habido ningún episodio depresivo mayor durante los 2 primeros años de la alteración.

D. Nunca ha habido un episodio maníaco

E. La alteración no aparece exclusivamente en el transcurso de un trastorno psicótico crónico, como son la esquizofrenia o el trastorno delirante.

- F. Los síntomas no son debidos a los efectos fisiológicos directos de una sustancia o a una enfermedad médica.
- G. Los síntomas causan un malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.

Trastorno Bipolar I

Las siguientes son algunas de las combinaciones que se presentan en el trastorno bipolar.

- A. Actualmente (o el más reciente) en un episodio hipomaniaco
- B. Previamente se ha presentado al menos un episodio maniaco o un episodio mixto
- C. Los síntomas afectivos provocan un malestar clínicamente significativo o un deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.

Trastorno Bipolar II

La característica esencial del trastorno bipolar II es un curso clínico caracterizado de uno o más episodios depresivos mayores acompañados por al menos un episodio hipomaniaco.

- A. Presencia durante al menos 2 años de numerosos períodos de síntomas hipomaniacos y numerosos períodos de síntomas depresivos.
- B. Durante el período de más de 2 años la persona no ha dejado de presentar los síntomas del Criterio A durante un tiempo superior a los 2 meses.
- C. Durante los primeros 2 años de la alteración no se ha presentado ningún episodio depresivo mayor, episodio maniaco o episodio mixto.

- D. Los síntomas no son debidos a los efectos fisiológicos directos de una sustancia ni a una enfermedad médica.
- E. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.

3.2. FLUOXETINA (4,5).

La fluoxetina, debido a su estructura se encuentra dentro del grupo de los “antidepresivos tricíclicos”

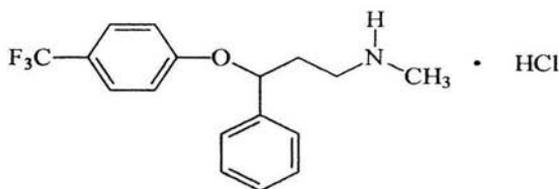


Figura 1. Estructura química de fluoxetina.

Fórmula condensada: $C_{17}H_{18}F_3NO.HCl$

Nombre comercial: Prozac

Nombre químico: d, 1-N-metil-3-fenil-3- $[\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-p-tolil)oxi] propilamina hidrocloreuro

Masa molecular: 345.79 g/mol

Apariencia física: El clorhidrato de fluoxetina es un polvo blanco a transparente, sin olor.

Solubilidad: El clorhidrato de fluoxetina es fácilmente soluble en metanol y etanol, soluble en acetonitrilo, cloroformo y acetona, ligeramente soluble en acetato de etilo, diclorometano y agua.

La solubilidad máxima del clorhidrato de fluoxetina en agua es de 14 mg/mL.

La fluoxetina es insoluble en tolueno, ciclohexano y hexano.

Punto de fusión: El punto de fusión del clorhidrato de fluoxetina es de 158.4 a 158.9 °C.

3.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE FLUOXETINA.

3.3.1. MECANISMO DE ACCION (6).

Las acciones antidepressivas, antiobsesión-compulsión, y antibulímicas de fluoxetina están relacionadas con su inhibición de la recaptación de serotonina por parte de las neuronas del SNC.¹ Los estudios que emplearon dosis clínicamente relevantes en el hombre han demostrado que la fluoxetina bloquea la recaptación de serotonina en las plaquetas humanas. Los estudios en animales también sugieren que la fluoxetina es un inhibidor de la recaptación de serotonina mucho más potente que de norepinefrina.

3.3.2. PROPIEDADES FARMACOCINETICAS (6,7).

Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.

Biodisponibilidad Absoluta. En el hombre, luego de una dosis oral única de 40 mg se observan concentraciones plasmáticas máximas de fluoxetina de 15 a 55 ng/mL.

después de 6 a 8 horas. Los alimentos aparentemente no afectan la biodisponibilidad sistémica de la fluoxetina, aunque estos pueden demorar su absorción por lo tanto, la fluoxetina puede ser administrada con o sin alimentos.

Unión a proteínas. En el rango de concentraciones de 200 a 1,000 ng/mL, aproximadamente el 94% de la fluoxetina se fija *in vitro* a las proteínas séricas humanas, incluyendo la albúmina y la α -1-glicoproteína.

Enantiómeros.- La fluoxetina es una mezcla racémica (50/50) de los enantiómeros R-fluoxetina y S-fluoxetina. En modelos animales, ambos enantiómeros son inhibidores específicos y potentes de la recaptación de serotonina con actividad farmacológica esencialmente equivalente. El enantiómero S-fluoxetina es eliminado más lentamente y es el enantiómero predominante presente en el plasma en estado constante.

Metabolismo.- La fluoxetina se metaboliza extensamente en el hígado en norfluoxetina y en varios otros metabolitos no identificados. El único metabolito activo identificado, norfluoxetina, se forma por la desmetilación de la fluoxetina.

En modelos animales, el S-norfluoxetina es un inhibidor potente y selectivo de la recaptación de serotonina y tiene actividad esencialmente equivalente a R- o S-fluoxetina. El R-norfluoxetina es significativamente menos potente que el fármaco de origen en la inhibición de la recaptación de serotonina. La vía de eliminación principal parece ser el metabolismo hepático en metabolitos inactivos excretados por el riñón.

Como el metabolismo de la fluoxetina, al igual que el de varios otros fármacos incluyendo a los antidepresivos tricíclicos y a los selectivos de serotonina, involucra al sistema CYP2D6, el tratamiento concomitante con fármacos también metabolizados por este sistema enzimático (tales como los antidepresivos tricíclicos) puede causar interacciones farmacológicas.

Eliminación. La eliminación relativamente lenta de la fluoxetina (vida media de eliminación de 1 a 3 días luego de la administración aguda y de 4 a 6 días luego de la administración crónica) y su metabolito activo, norfluoxetina (vida media de eliminación de 4 a 16 días luego de la administración aguda y crónica), lleva a una importante acumulación de estas especies activas cuando se utiliza una dosis fija. Luego de administrar 40 mg/día durante 30 días, se observaron concentraciones plasmáticas de fluoxetina que oscilaron de 91 a 302 ng/mL y de norfluoxetina de 72 a 258 ng/mL. La norfluoxetina parece, tener una farmacocinética lineal. Su vida media terminal promedio luego de una sola dosis fue de 8.6 días y luego de varias dosis de 9.3 días. Los niveles en estado constante luego de la administración prolongada son similares a los niveles observados a las 4 - 5 semanas. La vida media de eliminación prolongada de fluoxetina y de norfluoxetina aseguran que, aún cuando se interrumpe la administración, la sustancia activa persistirá en el organismo durante semanas (dependiendo principalmente de las características individuales de los pacientes, del régimen posológico anterior y de la duración del tratamiento previo al momento de la discontinuación).

3.3.3. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS (8,9).

Medicamentos metabolizados por CYP2D6. Debido a que la fluoxetina inhibe a la isoenzima del citocromo CYP2D6, la terapia con medicamentos que son metabolizados primordialmente por el sistema CYP2D6 y que tienen un índice terapéutico relativamente estrecho, debe iniciarse en el límite inferior del rango de dosificación si el paciente está recibiendo fluoxetina en forma concomitante o si la ha tomado durante las 5 semanas anteriores. De manera alternativa, la adición de fluoxetina al régimen de tratamiento de un paciente que ya está recibiendo un medicamento metabolizado por el CYP2D6 incrementa la posibilidad que haya necesidad de reducir la dosis del medicamento original. Los medicamentos con un índice terapéutico estrecho son los de mayor preocupación (por ejemplo, flecainida, encainida, vinblastina, carbamazepina y los antidepresivos tricíclicos).

Medicamentos activos a nivel del SNC. No se ha evaluado sistemáticamente el riesgo de utilizar fluoxetina en combinación con otros medicamentos activos a nivel del SNC. Debido a ello, se aconseja tomar especial precaución si se requiere administrar fluoxetina con este tipo de medicamentos, utilizando dosis iniciales menores del medicamento administrado concomitantemente con fluoxetina utilizando esquemas de titulación conservadores y monitoreando el estado clínico.

Antipsicóticos: Algunos datos clínicos sugieren la posible interacción farmacológica y/o farmacocinética de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y los antipsicóticos. Se observó un aumento de los niveles sanguíneos de clozapina o haloperidol en pacientes que recibían fluoxetina concomitantemente.

Benzodiazepinas: La vida media del diazepam administrado conjuntamente con fluoxetina puede verse prolongada en algunos pacientes. La coadministración de alprazolam y fluoxetina ha resultado en un aumento de la concentración plasmática de alprazolam y consecuente disminución de la actividad psicomotora.

Efectos potenciales de la coadministración de fármacos fuertemente unidas a las proteínas plasmáticas.- Debido a que la fluoxetina está altamente ligada a las proteínas plasmáticas, la administración de fluoxetina a un paciente que esté tomando otro medicamento con las mismas características de unión a proteínas puede causar un cambio en las concentraciones plasmáticas de cualquiera de los medicamentos administrados simultáneamente.

Warfarina: Raramente se ha reportado alteración en el efecto anticoagulante (valores de laboratorio y/o signos y síntomas clínicos) sin un patrón consistente, que incluye aumento de la hemorragia, cuando se coadministró fluoxetina con warfarina. Los pacientes que reciben warfarina deben recibir un monitoreo cuidadoso de la coagulación cuando se inicia o se interrumpe la terapia con fluoxetina.

3.3.4. TOXICIDAD (6).

La toxicidad aguda de la fluoxetina se ha determinado en ratones y ratas. Los valores de DL_{50} se muestran a continuación:

Tabla 1. Valores de DL_{50} de fluoxetina.

| Especie | Vía de administración | LD_{50} (mg/kg) |
|---------|-----------------------|-------------------|
| Ratón | Oral | 248 |
| Ratón | I.V. | 45 |
| Rata | Oral | 466 |
| Rata | I.V. | 35 |

Los fosfolípidos se incrementan en algunos tejidos de ratas, sin embargo, esto es reversible cuando cesa la administración de fluoxetina. En roedores, dosis elevadas de fluoxetina presentan los siguientes signos: salivación incrementada, temblores, ataxia, debilidad en las extremidades y convulsiones crónicas. Los estudios de toxicidad en animales a los que se les administraron dosis crónicas de fluoxetina, indican que el fármaco no provoca mutaciones, cáncer o teratogénesis y no daña la capacidad reproductiva.

Algunos efectos secundarios observados en voluntarios sanos incluyen: náusea, nerviosismo, insomnio, dolor de cabeza, temblor, ansiedad y adormecimiento de extremidades. Otros efectos poco comunes son psicosis, alucinaciones, ataxia, mareos y asma.

3.4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) (10).

La IUPAC define: “La Cromatografía es un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

3.4.1. Instrumental.

La cromatografía líquida es un método separativo; así, el lugar en donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo de mayor complejidad.

El cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de disolvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y a la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.

- Un eluido, el fluido proveniente de la columna que, debe recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un recolector de fracciones), contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados.

3.4.2. Bombas.

Las bombas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) impulsan a la fase móvil proveniente del reservorio de disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringas).

Las bombas están construidas de materiales resistentes al ataque químico del disolvente, como acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón.

3.4.3. Inyectores.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de disolvente a través del sistema. El inyector debe reunir las siguientes características:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

3.4.4. Detectores.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores deben reunir las siguientes características:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta. El rango dinámico se define como: el rango de concentración de una sustancia en análisis en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal.
- Poseer una respuesta lineal. El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración.
- Responder a todos los solutos.
- Tener una sensibilidad apropiada. Detectores que responden a todos los analitos en general, poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad, no responden a todos los solutos.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido. EL ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largo y cortos en un periodo de tiempo dado. El límite de detección de un analito determinado está en estrecha relación con el valor de ruido del instrumento; cuanto mayor sea el ruido, peor será el valor de límite de detección.
- No destruir la muestra.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura; ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda determinada.

3.4.5. Fase móvil (10,11).

La fase móvil en CLAR puede por sí misma, modificar completamente la selectividad de las separaciones, ya que es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan solo variando la composición de la fase móvil.

Un disolvente apropiado para CLAR debe cumplir con algunas propiedades como:

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad.
- Compatibilidad con el detector utilizado.
- Adecuado punto de ebullición.
- Baja viscosidad.
- Alto grado de pureza.

Los disolventes más comúnmente empleados son: agua, acetonitrilo, metanol, hexano, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, tetrahidrofurano, cloroformo, entre otros.

3.4.6. Columnas y fases estacionarias (10,11).

La fase estacionaria normalmente está empacada en un tubo de algún material inerte (generalmente el acero inoxidable) a través del cual pasa la fase móvil. Las columnas deben estar empacadas con partículas definidas por una serie de características:

- Morfología.
- Tamaño.
- Porosidad.

- Estructura química.

El material empleado puede ser irregular o esférico y un tamaño entre 2 y 60 μm de diámetro. El tamaño de partícula controla el proceso de difusión de las moléculas desde la fase móvil hacia la fase estacionaria, por lo que a medida que el tamaño de partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento y la columna pierde capacidad resolutive y eficiencia. En relación a la porosidad, en general, a menor diámetro de poro, corresponde mayor área superficial de contacto y consecuentemente mayor retención.

Con respecto a la estructura química, el material de empaque debe poseer una estructura resistente a los disolventes de la fase móvil, además debe ser estable a valores dados de pH; el material más comúnmente empleado es la sílica.

La capacidad o poder de resolución de la columna depende de su longitud, diámetro interno y su material de empaque. Las columnas analíticas tienen diámetros internos de alrededor de 5 mm, siendo el más común de 4.6 mm; se recomienda el empleo de diámetros internos pequeños debido a que se reduce considerablemente el consumo de la fase móvil e incrementa la sensibilidad.

3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS (12).

La validación es la evidencia experimental documentada que demuestra que a través de los procedimientos necesarios, un método cumple con el propósito con el que fue diseñado para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica.

Los parámetros de validación establecidos por la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 son los siguientes: linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio), exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, recobro absoluto, estabilidad de la muestra procesada y bajo condiciones de almacenamiento.

3.5.1. Linealidad.

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.

De acuerdo a las especificaciones se considerará que el método cumple con este parámetro si al realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración se obtiene un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99. Para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99.

3.5.2. Precisión.

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

a) Repetibilidad.

Se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. El coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.

b) Reproducibilidad intralaboratorio.

Se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como: días, equipos, columnas o analistas.

El coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.

3.5.3. Exactitud

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Para determinar si el método es exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración, determinándose por medio de la siguiente ecuación:

$$Desv.abs\% = 100 \times \frac{|Cantidad\ adicionada - Cantidad\ recuperada|}{Cantidad\ adicionada}$$

3.5.4. Límite de cuantificación.

Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. El punto tienen validez como límite de cuantificación si el valor promedio de las cinco repeticiones cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor del 20%.

3.5.5. Límite de detección.

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas. Será aquella concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica sea tres veces mayor que el nivel de ruido.

3.5.6. Selectividad.

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

3.5.7. Recobro.

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica. Se evalúa determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración, el cual debe ser consistente en cada nivel de concentración dentro del rango, es decir se preparan tres controles en sistema y tres controles a los que se les efectúa todo el proceso de extracción, una vez obtenidos los resultados, éstos se procesan para determinar cuanta cantidad de fluoxetina se pierde en el proceso de extracción.

3.5.8. Estabilidad de la muestra analítica (12, 14).

Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis (condiciones de

manejo y almacenamiento). Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta, el cual deberá ser menor al 15%.

Se lleva a cabo la prueba evaluando tres niveles de concentración en plasma por duplicado (60, 160, 260 ng/mL), bajo las siguientes condiciones:

- a) Ciclos congelación-descongelación (-70°C),
- b) Congelación (-70°C),
- c) Refrigeración (7°C) y
- d) Temperatura ambiente.

La muestra procesada se queda almacenada en el automuestreador el cual tiene una temperatura de 10°C y se inyecta a las 0, 12, 24 y 48 horas después de procesadas.

3.6. METODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLUOXETINA EN PLASMA.

Existen pocos métodos reportados para la cuantificación de fluoxetina en plasma. A continuación se describen los métodos que han sido reportados en la literatura para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

a) Determinación del antidepresivo fluoxetina en plasma humano por cromatografía líquida con detector U.V (15).

En la técnica descrita en este método se utiliza una columna LiChrosper 60 RP-Select, (3.0 x 125 mm), con detección ultravioleta a 226 nm. La fase móvil, consiste en Solución Amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 6.0:Acetonitrilo (70:30 v/v). Se usa clorhidrato de fluoxetina como estándar interno.

La muestra plasmática se trata con Hidróxido de sodio 0.2 N, posteriormente se le adicionan 4 mL de la solución de hexano:alcohol isoamílico (97:3), se centrifuga, la fase orgánica se trata con solución de HCl 0.1 N y se inyectan 60 μ L en el cromatógrafo, con un tiempo de corrida de 15 minutos.

b) Determinación de los enantiómeros fluoxetina y norfluoxetina en plasma humano por cromatografía líquida (16).

En este método, se emplea una columna Chiralcel ODR, (4.6 x 250mm), con un flujo de 0.5 mL/min, la fase móvil utilizada, consiste en Solución Amortiguadora de hexafluorofosfato de potasio 100 mM, pH 3.0:Acetonitrilo 65:35 v/v. La longitud de onda a la que se lleva a cabo la detección es de 227 nm. La muestra plasmática es tratada con acetonitrilo y posteriormente con solución de hidróxido de sodio 0.5 M. Después de someter a agitación se adiciona n-hexano:alcohol isopropílico (97:3), para posteriormente centrifugar, tratar la fase orgánica con solución de ácido fosfórico 20mM, centrifugar nuevamente y descartar la fase orgánica

c) Determinación de fluoxetina y norfluoxetina en plasma humano por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detector de fluorescencia (17).

El método describe que se utiliza una columna Res Elut, C8, (4.6 x 150mm), a un flujo de 1.0 mL/min, empleando como fase móvil Solución de acetonitrilo: solución de perclorato de tetrametilamonio 0.017 M, pH 2.5 (30:60 v/v). La detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 230 nm. En esta técnica, primero se adiciona a la muestra plasmática, agua destilada, para posteriormente agregar metanol seguido de agua destilada y de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5. Después de agitar se somete a evaporación y posteriormente se reconstituye con metanol.

De estos métodos anteriormente expuestos, el método descrito en el punto 3.6 inciso a, fue el que se decidió realizar, debido a que tanto los reactivos que se utilizan como las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo existían dentro del laboratorio.

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. Material, instrumentos y equipo.

4.1.1. Material.

Matraces volumétricos de 1 L.

Matraces volumétricos de 100 mL.

Matraces volumétricos de 50 mL.

Pipetas volumétricas de 1 mL.

Pipeta automática eppendorf de 100-1000 μ L.

Puntas para pipeta automática eppendorf de 1 mL.

Repipeteadora eppendorf de volumen variable y puntas intercambiables.

Puntas para repipeteadora

Vasos de precipitados de 250 mL.

Vasos de precipitados de 1 L.

Tubos cónicos de vidrio.

Gradillas para tubos de 16 x 150 mm.

Frascos con tapón de rosca de 1000 mL.

Membranas para filtración Millipore de 0.45 μ m.

Microviales de 200 μ L para automuestreador Waters 717 plus

Tapones para microviales

Viales de 1 mL para automuestreador Waters 717 plus

4.1.2 Instrumentos.

1. Agitador vórtex thermolyne Maxi Mix II.
2. Balanza analítica Ohaus Standard Analytical.
3. Sonificador Cole-Palmer 8890.
4. Sistema de filtración Millipore.
6. Potenciómetro OAKTON pH 1000 series.
7. Centrifuga Sorvall.
8. Ultracongelador HARRIS II.

4.1.3. Equipo.

1. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución equipado con:

| | |
|-----------------|--|
| Bomba | Bomba cuaternaria Waters 600 con controlador de gradiente. |
| Integrador | Paquete computacional Millennium 32, Waters. |
| Detector | Detector UV-VIS 2487 de Waters |
| Automuestreador | inyector automático, modelo 717 plus de Waters. |

4.1.4. Reactivos y sustancias de referencia.

- * Hexano, Prolabo, Lote M35G.
- * Ácido o-fosfórico, J.T. Baker, Lote M46C52.
- * Fosfato de potasio dibásico J.T. Baker, Lote K33C05.

- * Acetonitrilo HPLC, Prolabo, Lote 42093.
- * Metanol HPLC, Fisher Chemicals, Lote 020198.
- * Alcohol isoamílico, J.T. Baker, Lote 41666.
- * FLUOXETINA, USP, Lote F-1.
- * Hidróxido de sodio, Sigma, Lote 121K0126.
- * Ácido clorhídrico, J.T. Baker, Lote L50001.
- * Agua HPLC obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters System.

4.2. Preparación de las soluciones.

1) Preparación de la solución de FLUOXETINA 10,000 ng/mL.

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0010g de FLUOXETINA USP y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Metanol HPLC.

2) Preparación de la solución de FLUOXETINA 2,000 ng/mL.

Transferir cuantitativamente 10 mL de la solución de 10,000 ng/mL de fluoxetina a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con Metanol HPLC.

3) Preparación de la solución de FLUOXETINA para evaluar el sistema (300 ng/mL)

Transferir cuantitativamente 15 mL de la solución de 2,000 ng/mL de fluoxetina a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.01M, pH 6.0:ACN 50:50 v/v.

Dividir la solución en 20 alícuotas de 3 mL y almacenarlas en tubos de neopreno para centrifuga a -70°C . Descongelar una de las alícuotas cada día de trabajo a temperatura ambiente.

4) Solución patrón de FLUOXETINA (100,000 ng/mL).

Pesar con exactitud el equivalente a 0.010 g de FLUOXETINA USP, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Metanol HPLC.

5) Solución patrón de FLUOXETINA (2,000 ng/mL).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución de 100,000 ng/mL de FLUOXETINA a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con Metanol HPLC.

6) Preparación de la curva de calibración y los controles de FLUOXETINA en plasma.

Preparar cada uno de los puntos de la curva patrón y los controles tal y como se muestra en la siguiente tabla, utilizando pipeta repepitadora electrónica eppendorf.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración y los controles de fluoxetina en plasma.

| μL de FLUOXETINA (2,000 ng/mL) | μL de MeOH | Concentración final (ng/mL) |
|---------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 3 | 197 | 6 |
| 5 | 195 | 10 |
| 10 | 190 | 20 |
| 15 | 185 | 30 |
| 25 | 175 | 50 |
| 30 | 170 | 60* |
| 50 | 150 | 100 |
| 75 | 125 | 150 |
| 80 | 120 | 160* |
| 100 | 100 | 200 |
| 130 | 70 | 260* |
| 150 | 50 | 300 |

*Puntos control bajo, medio y alto, para la determinación de los parámetros de estabilidad, exactitud, precisión y recobro del método.

Depositar alícuotas de 1.0 mL de plasma en tubos cónicos de vidrio previamente etiquetados y seguir el procedimiento de extracción indicado a continuación:

4.3 Método de extracción a optimizar.

El método que se probó inicialmente para determinar fluoxetina en plasma (3.6 inciso a), fue una extracción líquido-líquido el cual consistía en adicionar 250 μL de Hidróxido de Sodio 0.2 N a 1 mL de la muestra plasmática, agitar en vórtex durante 10 segundos, para posteriormente adicionar 4 mL de una solución de hexano:alcohol isoamílico (97:3), volver a agitar durante 30 segundos, centrifugar a 300 rpm durante

30 minutos, en este paso fue donde se realizó la primera optimización ya que se consideró que 30 minutos es mucho tiempo así que lo que se hizo fue centrifugar durante 5 minutos pero a 3500 rpm. A continuación se decanta la fase orgánica en otros tubos, la siguiente optimización que se realizó fue que antes de decantar la fase orgánica, los tubos se sometieron a congelación, ya que de esta manera, la fase acuosa se congela y así es más fácil decantar y lo más importante existe menos pérdida de fármaco, posteriormente se le adiciona a la fase orgánica 500 μL de solución de HCl 0.1 N, se agita nuevamente en vórtex, ahora se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 10°C, en este caso se decidió probar una centrifugación de 5 minutos a 3500 rpm sin medir la temperatura, después de la centrifugación se someten los tubos a congelación durante 5 minutos y se descarta la fase orgánica por aspiración, debido a que en el laboratorio no contamos con el equipo necesario para realizar dicha operación, la fase orgánica simplemente se decantó y debido a esto fue necesario antes de inyectar al cromatógrafo, se dejó descongelar la fase acuosa a temperatura ambiente y se sometió nuevamente a centrifugación durante 3 minutos a 14000 rpm, para posteriormente inyectar 30 μL en el cromatógrafo. También se realizó una prueba con una extracción sólido-líquido, pero existía una gran pérdida del fármaco en estudio a lo largo del proceso, además de que resultó ser un método muy tardado, así que finalmente el método empleado para determinar la fluoxetina en plasma fue el de extracción líquido-líquido.

En cuanto a las condiciones cromatográficas también se realizaron optimizaciones ya que el método descrito (3.6 inciso a) utilizaba una columna LiChrosper 60 RP-Select, (3.0 x 125 mm) y en el laboratorio no contamos con ese tipo de columnas así que decidimos probar una columna Waters X Terra RP18 5 μ , (4.6 x 250 mm), la fase móvil utilizada en el método descrito es Solución Amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 6.0:Acetonitrilo (70:30 v/v), en la fase móvil también se realizaron cambios ya que cuando se trabajó con la fase móvil descrita anteriormente se tuvieron problemas ya que la Solución amortiguadora de

fosfatos estaba muy concentrada y tapaba nuestra columna, así que lo que se hizo fue trabajar con una solución amortiguadora a una concentración de 0.01M y la proporción también fue modificada, quedando la fase móvil de Solución Amortiguadora de Fosfatos de potasio 0.01M, pH 6.0:Acetonitrilo 56:44 v/v, las temperaturas bajo las cuales se trabajó fueron 35°C para la columna y 10°C para el automuestreador. Posteriormente el tiempo de corrida se cambió de 15 a 8 minutos ya que la señal de la fluoxetina salía antes de los 6 minutos.

4.5. Validación del sistema.

4.5.1. Adecuabilidad del sistema

Se evaluó preparando una solución con el compuesto de interés disuelto en fase móvil a una concentración de 300 ng/mL de Fluoxetina.

El sistema se considerará adecuado, si cumplió con cada uno de los aspectos señalados en la tabla siguiente:

| Parámetro. | Criterio. |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Repetibilidad (altura de pico) | ≤ 2.0 para N = 6 |
| Repetibilidad (tiempo de retención) | ≤ 2.0 para N = 6 |
| Factor de capacidad (k') | > 2.0 |
| Simetría de pico (USP) | ≤ 2.0 |
| Platos teóricos (Tangente USP) | > 2000 |

4.6. Validación del método analítico.

4.6.1. Linealidad.

El analista preparó tres curvas de calibración contemplando las concentraciones de 20 a 300 ng/mL, las muestras se procesaron y se inyectaron de acuerdo al procedimiento optimizado. Se graficó la relación de área del pico de fluoxetina contra concentración y para cada curva se determinó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación.

4.6.2. Precisión del método.

4.6.2.1. Repetibilidad del método.

Este parámetro se evaluó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. A partir de 5 soluciones patrón preparadas de manera independiente se procesará y cuantificará muestras plasmáticas de 60, 160, 260 ng/mL de fluoxetina tal y como se describe en el método del inciso (4.3). Se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones.

4.6.2.2. Reproducibilidad del método.

Se evaluó la reproducibilidad intralaboratorio (un analista días diferentes) y reproducibilidad entre analistas (dos analistas), para lo cual:

Analista 1: Preparó por duplicado en plasma muestras de concentraciones 60, 160, 260 ng/mL de fluoxetina y se cuantificó mediante el método ya descrito; se realizó este procedimiento durante tres días empleando para cada vez dos muestras

preparadas de forma independiente para cada nivel de concentración y una curva de calibración para cada día de análisis.

Analista 2: Preparó por duplicado en plasma muestras de concentraciones 60, 160, 260 ng/mL de fluoxetina y se cuantificó mediante el método ya descrito; realizó este procedimiento durante tres días empleando para cada vez dos muestras preparadas de forma independiente para cada nivel de concentración y una curva de calibración para cada día de análisis.

Se evaluó la reproducibilidad interdía para el primer analista determinando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para todas las determinaciones realizadas por concentración.

La reproducibilidad entre analistas y días se evaluó determinando el coeficiente de variación de la concentración recuperada para todas las determinaciones realizadas por concentración.

4.6.3. Exactitud del método.

Se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad. Se determinó 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 (sección 2.5.3), tomando como referencia la curva de calibración en plasma proveniente de una pesada independiente. Para determinar si el método es exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

4.6.4. Recobro.

Se evaluó preparando y procesando tres series independientes de muestras control de calidad de Fluoxetina en plasma (60, 160, 260 ng/mL) y se comparó la respuesta cromatográfica (altura de pico) obtenida contra la respuesta mostrada en muestras del fármaco en solución a las mismas concentraciones, pero que no son sometidas al procedimiento de extracción. Como criterio para el recobro, la desviación absoluta de los recobros individuales con respecto al promedio global, debe ser $\leq 15\%$.

4.6.5. Estabilidad.

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que la fluoxetina permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica. Se llevó a cabo la prueba evaluando tres niveles de concentración en plasma por duplicado (60, 160, 260 ng/mL), bajo las siguientes condiciones:

- a) Ciclos congelación-descongelación (-70°C),
- b) Congelación (-70°C),
- c) Refrigeración (7°C) y
- d) Temperatura ambiente.

almacenando las soluciones estándar independientes y las soluciones de la muestra procesada, de la siguiente manera:

Tabla 3. Condiciones de almacenamiento de las soluciones estándar independientes y de las soluciones de la muestra procesada.

| Concentración (ng/mL) | Muestra | Condiciones de almacenamiento | Día de análisis. |
|-----------------------|---------|---|------------------|
| 60 | 1 | Tiempo cero o inicial | 1er. o 2° día |
| | 2 | | |
| 160 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 260 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 60 | 1 | Temperatura ambiente | 24 y 48 horas |
| | 2 | | |
| 160 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 260 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 60 | 1 | Refrigeración a 7°C | 24 y 48 horas |
| | 2 | | |
| 160 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 260 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 60 | 1 | Dos ciclos congelación-descongelación a -70°C | 24 y 48 horas |
| | 2 | | |
| 160 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 260 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 60 | 1 | Congelación a -70°C | 13, 20 y 28 días |
| | 2 | | |
| 160 | 1 | | |
| | 2 | | |
| 260 | 1 | | |
| | 2 | | |

e) Estabilidad de la muestra procesada.

Se evaluó preparando por duplicado y con estándar independientes, muestras de fluoxetina en plasma a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo), las

cuales se sometieron al procedimiento de extracción establecido (inciso 4.3). La muestra se quedó almacenada en el automuestreador y se inyectó a las 0, 12, 24 y 48 horas después de procesadas.

4.6.6. Límite de cuantificación y Límite de detección.

Estos parámetros se evaluaron preparando por quintuplicado y a partir de soluciones patrón independientes, muestras de concentración 10 y 16 ng/mL, determinando la relación de área del pico de fluoxetina para éstas concentraciones, así como la señal de ruido de fondo.

4.6.7. Selectividad

Se determinó analizando muestras de fármacos de uso común a las concentraciones plasmáticas reportadas (ácido acetilsalicílico, amoxicilina, paracetamol y heparina).

4.6.8. Tolerancia

Se evaluó preparando por duplicado y a partir de soluciones stock independientes, muestras de concentraciones 60, 160, 260 ng/mL, las cuales se inyectaron a las condiciones normales del método y posteriormente se cambió la proporción de fase a *solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0:ACN 53:47 v/v*. Una vez que se estabilice el sistema se inyectó de nuevo las muestras anteriores a cada una de las nuevas condiciones. Se probó también un cambio en la temperatura del horno para columnas, la cual se aumentó a 40°C y se inyectaron nuevamente las soluciones anteriores.

V. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

Las condiciones cromatográficas y el método optimizado se describen a continuación, después de probar distintos métodos y distintas concentraciones de fase móvil, las condiciones cromatográficas y el método de extracción con que se trabajó para determinar fluoxetina en plasma son las siguientes:

5.1. Condiciones Cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas optimizadas son las siguientes:

| | |
|---------------------------------|--|
| Columna | Waters X Terra RP18 5 μ m,(4.6 x 250mm) |
| Flujo | 1.0 mL/min |
| Fase Móvil | Solución Amortiguadora de fosfatos de potasio 0.01 M, pH 6.0:Acetonitrilo 56:44 v/v. |
| Longitud de onda | 227 nm |
| Temperatura de la columna | 35°C |
| Temperatura del automuestreador | 10 °C |
| Tiempo de corrida | 8 min. |

5.2. Método de extracción optimizado

- 1.- A 1 mL de la muestra plasmática, adicionar 250 μ L de la solución de Hidróxido de sodio 0.2 N
- 2.- Agitar en vórtex durante 15 segundos.
- 3.- Adicionar 4 mL de la solución de hexano:alcohol isoamílico (97:3).
- 4.- Agitar vigorosamente en vórtex, durante 30 segundos.

- 5.- Centrifugar a 3500 rpm durante 5 min.
- 6.- Someter los tubos a congelación, durante 5 minutos.
- 7.- Trasferir la fase orgánica en otros tubos.
- 8.- Adicionar a la fase orgánica 500 μ L de solución de HCl 0.1 N
- 9.- Agitar vigorosamente en vórtex durante 1 minuto.
- 10.- Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos
- 11.- Someter nuevamente los tubos a congelación durante 5 minutos.
- 12.- Decantar la fase orgánica.
- 13.- Dejar descongelar la fase acuosa a temperatura ambiente.
- 14.- Centrifugar a 14,000 rpm, durante 3 min.
- 15.- Inyectar 30 μ L del sobrenadante en el cromatógrafo, utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el punto 5.1

5.3. Validación del método.

5.3.1. Linealidad del método.

La figura 2 muestra la linealidad promedio del método analítico en un intervalo de concentraciones entre 20 y 300 ng/mL, obteniendo un coeficiente de correlación promedio de 0.9998, lo cual indica que la relación matemática entre concentración y respuesta es continua dentro del intervalo de trabajo. La ecuación de la recta es $y = 9.8928 X - 30.119$, donde: X = la concentración en ng/mL y Y = la respuesta obtenida

En la tabla 4 se presentan los valores de la concentración promedio de las tres curvas preparadas en plasma para evaluar la linealidad del método, en donde se observa un C.V. que varía entre 0.88% y 13.12% demostrando que dicha relación matemática es reproducible.

Por lo anterior y de acuerdo a los criterios establecidos el método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma es lineal dentro del intervalo de 20 a 300 ng/mL.

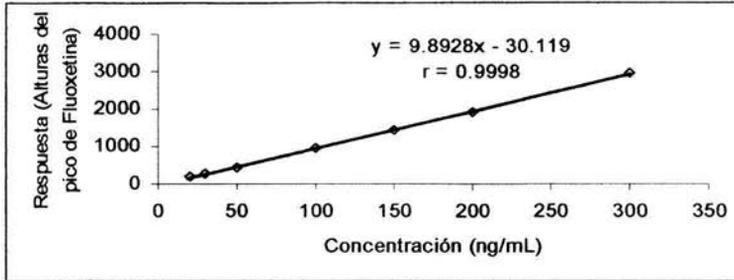


Figura 2. Linealidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

Tabla 4. Linealidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

| Concentración nominal (ng/mL) | Altura del pico de Fluoxetina | Desviación Estándar | C.V (%) |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------|
| 20 | 182.59 | 1.61 | 0.88 |
| 30 | 267.49 | 20.15 | 7.53 |
| 50 | 458.67 | 32.70 | 7.13 |
| 100 | 972.87 | 10.69 | 1.09 |
| 150 | 1422.42 | 186.67 | 13.12 |
| 200 | 1938.83 | 98.64 | 5.08 |
| 300 | 2955.14 | 109.06 | 3.69 |

5.4. Precisión del método.

5.4.1. Repetibilidad.

En la tabla 5 se presentan los resultados de la repetibilidad del método analítico que se obtuvieron al evaluar por quintuplicado cinco muestras de 60, 160 y 260 ng/mL de fluoxetina en plasma, que fueron analizadas por el mismo analista, bajo las mismas condiciones de trabajo y en el mismo día.

Los datos indican que los coeficientes de variación no presentan una variación mayor al 9.35%, por lo que según las especificaciones, el método analítico para cuantificar fluoxetina en plasma, es repetible, ya que los coeficientes de variación no son mayores al límite, cuyo valor es del 15%.

Tabla 5. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

| Concentración recuperada (ng/mL) | 60 | 160 | 260 |
|---|-----------|------------|------------|
| Muestra 1 | 65.90 | 171.13 | 282.35 |
| Muestra 2 | 52.98 | 136.29 | 263.00 |
| Muestra 3 | 62.16 | 148.13 | 222.43 |
| Muestra 4 | 53.77 | 139.99 | 260.25 |
| Muestra 5 | 59.22 | 148.58 | 251.78 |
| Promedio | 58.81 | 148.82 | 255.96 |
| Desviación Estándar | 58.81 | 13.78 | 21.83 |
| C.V. (%) | 9.35 | 9.25 | 8.53 |
| Desv. Absoluta (%) | 1.98 | 6.91 | 1.55 |

5.4.2. Reproducibilidad del método y exactitud intradía.

En las tablas 6 y 7 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar fluoxetina en plasma para el analista 1 y el analista 2, respectivamente, y la tabla 8 muestra los resultados de la exactitud intradía del método. Se presentan los resultados promedio para cada día y para cada analista evaluado así como la variación total, expresada como C.V. Los resultados demuestran que los coeficientes de variación no son mayores de 8.88%, por lo que de acuerdo a las especificaciones con relación a este parámetro de evaluación cumple con los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación, no deben ser mayor al 15%. Por lo tanto, el método analítico fue reproducible en las condiciones intradía de análisis.

Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Fluoxetina en plasma (Analista 1).

| Concentración recuperada (ng/mL) | 60 | 160 | 260 |
|---|-----------|------------|------------|
| Día 1, muestra 1 | 53.77 | 139.99 | 260.25 |
| Día 1, muestra 2 | 59.22 | 148.58 | 251.78 |
| Día 2, muestra 1 | 59.10 | 172.10 | 245.13 |
| Día 2, muestra 2 | 64.24 | 174.39 | 258.17 |
| Día 3, muestra 1 | 59.98 | 171.05 | 276.71 |
| Día 3, muestra 2 | 62.7 | 168.13 | 259.68 |
| Promedio | 59.84 | 162.37 | 258.62 |
| Desv. Est. | 3.61 | 14.41 | 10.58 |
| C.V (%) | 6.04 | 8.88 | 4.09 |

Tabla 7. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Fluoxetina en plasma (Analista 2).

| Concentración recuperada (ng/mL) | 60 | 160 | 260 |
|---|-----------|------------|------------|
| Día 1, muestra 1 | 60.44 | 164.67 | 264.36 |
| Día 1, muestra 2 | 58.3 | 163.28 | 274.31 |
| Día 2, muestra 1 | 63.54 | 155.97 | 257.19 |
| Día 2, muestra 2 | 54.94 | 176.22 | 283.74 |
| Día 3, muestra 1 | 65.87 | 158.72 | 281.9 |
| Día 3, muestra 2 | 60.08 | 175.15 | 242.56 |
| Promedio | 60.53 | 165.67 | 267.34 |
| Desv. Est. | 3.85 | 8.37 | 15.85 |
| C.V (%) | 6.36 | 5.05 | 5.93 |

Tabla 8. Reproducibilidad entre analistas.

| Concentración recuperada (ng/mL) | 60 | 160 | 260 |
|---|-----------|------------|------------|
| Analista 1 | 59.84 | 162.37 | 258.62 |
| Analista 2 | 60.53 | 165.67 | 267.34 |
| Promedio | 60.19 | 164.02 | 262.98 |
| Desv. Est. | 0.49 | 2.33 | 6.17 |
| C.V (%) | 0.81 | 1.42 | 2.34 |

En la tabla 9 se muestran los resultados de la desviación absoluta en porcentaje, los cuales fueron calculados a partir de los resultados de las tablas 6 y 7 para cada uno de los analistas, cada día de análisis y por duplicado. Se puede observar que tanto el porcentaje de desviación absoluta para cada una de las muestras en los diferentes días de análisis y con cada analista como el promedio de las mismas,

por lo que la exactitud intradía del método cumple con la especificación establecida que indica que la desviación absoluta debe estar dentro del +/- 15% del valor nominal de la concentración.

Tabla 9. Exactitud intradía.

| | 60 | 160 | 260 |
|------------------|-----------|------------|------------|
| A1, D1,M1 | 10.38 | 12.51 | 0.09 |
| A1,D1,M2 | 1.30 | 7.14 | 3.16 |
| A1,D2,M1 | 1.50 | 7.56 | 5.72 |
| A1,D2,M2 | 7.06 | 8.99 | 0.70 |
| A1,D3,M1 | 0.03 | 6.91 | 6.43 |
| A1,D3,M2 | 4.50 | 5.08 | 0.12 |
| A2,D1,M1 | 0.73 | 2.92 | 1.68 |
| A2,D1,M2 | 2.83 | 2.05 | 5.50 |
| A2,D2,M1 | 5.90 | 2.52 | 1.08 |
| A2,D2,M2 | 8.43 | 10.14 | 9.13 |
| A2,D3,M1 | 9.78 | 0.80 | 8.42 |
| A2,D3,M2 | 0.13 | 9.47 | 6.71 |
| Promedio | 4.38 | 6.34 | 4.06 |

A1= Analista 1, A2= Analista 2, D1= Día 1, D2= Día 2, D3= Día 3, M1= Muestra 1, M2= Muestra 2

5.5. Exactitud del método.

En las tablas 10 se muestran los resultados promedio de las concentraciones interpoladas así como la variación con respecto a la concentración nominal, representada como porcentaje de desviación absoluta para el analista 1 y el analista 2 respectivamente. Se puede observar que el promedio de la desviación con respecto a la concentración nominal para cada uno de los niveles de concentración, es menor al 15%, por lo que, el método es exacto al cumplir con la especificación establecida que indica que la desviación debe estar dentro del +/- 15% del valor nominal de concentración.

Tabla 10. Exactitud del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

| | Analista 1 | Desv. Absoluta (%) |
|-----------|-------------------|---------------------------|
| 60 ng/mL | 59.84 | 0.27 |
| 160 ng/mL | 162.37 | 1.48 |
| 260 ng/mL | 258.62 | 0.53 |

Tabla 10. Exactitud del método analítico para la cuantificación de fluoxetina en plasma.

| | Analista 2 | Desv. Absoluta (%) |
|-----------|-------------------|---------------------------|
| 60 ng/mL | 60.53 | 0.88 |
| 160 ng/mL | 164.02 | 2.50 |
| 260 ng/mL | 267.34 | 2.82 |

5.6. Límite de cuantificación.

En la tabla 11 se muestran los resultados de las alturas de fluoxetina para la concentración de 10, 16 y 20 ng/mL, en donde se observa que al cuantificar por quintuplicado dichas concentraciones, se obtiene un C.V. menor al 20%. para cada una de ellas; sin embargo se eligió 20 ng/mL como límite de cuantificación, debido a que el coeficiente de variación para esa concentración es menor que para las otras, y los resultados que se obtienen son mas consistentes.

Tabla 11. Límite de cuantificación.

| LIMITE DE CUANTIFICACION | | | | | |
|---------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|---|
| Concentración Nominal | Concentración Experimental (ng/mL) | Concentración Nominal | Concentración Experimental (ng/mL) | Concentración Nominal | Concentración Experimental (ng/mL) |
| 10 ng/mL-1 | 12.24 | 16 ng/mL-1 | 16.43 | 20 ng/mL-1 | 20 |
| 10 ng/mL-2 | 11.72 | 16 ng/mL-2 | 14.97 | 20 ng/mL-2 | 20 |
| 10 ng/mL-3 | 11.71 | 16 ng/mL-3 | 18.33 | 20 ng/mL-3 | 20 |
| 10 ng/mL-4 | 10.12 | 16 ng/mL-4 | 14.97 | 20 ng/mL-4 | 19.04 |
| 10 ng/mL-5 | 11.65 | 16 ng/mL-5 | 15.64 | 20 ng/mL-5 | 21.7 |
| PROMEDIO | 11.48 | PROMEDIO | 16.06 | PROMEDIO | 20.14 |
| DES EST | 0.80 | DES EST | 1.40 | DES EST | 0.96 |
| %C V | 6.97 | %C V | 8.71 | %C V | 4.77 |
| Desv. Absoluta (%) | 14.8 | Desv. Absoluta (%) | 0.37 | Desv. Absoluta (%) | 0.7 |

5.7. Límite de detección.

El límite de detección fue de 10 ng/mL.

5.8. Selectividad.

Después de añadir, ácido acetilsalicílico, heparina, amoxicilina y paracetamol a diferentes muestras plasmáticas y de procesarlas de acuerdo al método descrito en el punto 5.2 anteriormente, no se observó ninguna señal que interfiriera con el pico de interés, por lo cual el método se consideró selectivo para la cuantificación de fluoxetina en plasma. En la figura 3 se muestran los cromatogramas representativos del análisis.

a) Blanco de plasma



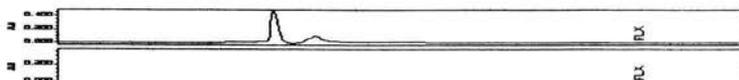
b) Fluoxetina



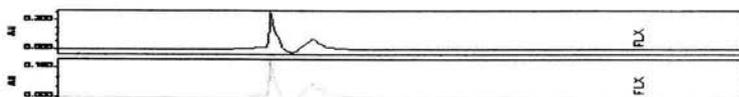
c) Ácido acetilsalicílico.



d) Paracetamol.



e) Amoxicilina.



f) Heparina.

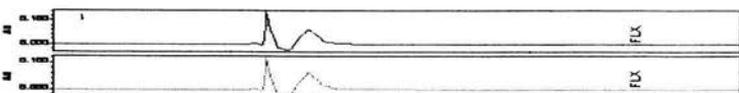


Figura 3. Selectividad del método.

5.9. Recobro.

En la tabla 12, se muestra el por ciento de recobro obtenido para fluoxetina en plasma. En la tabla se puede observar que la recuperación promedio estuvo entre 75% y 81%. Las especificaciones indican que el porcentaje de recuperación no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser consistente en cada nivel de concentración, al cumplirse satisfactoriamente el apartado, el método analítico cumple con este parámetro de evaluación.

Tabla 12. Recobro de fluoxetina.

| Concentración | Área del pico de fluoxetina en muestras plasmáticas | Área del pico de fluoxetina en muestras en sistema | Recobro (%) |
|------------------------------|---|--|--------------|
| Control Bajo (60 ng/mL) | 621.86 | 701.12 | 88.69 |
| | 493.99 | 663.03 | 74.51 |
| | 584.859 | 691.32 | 84.59 |
| | 501.84 | 716.61 | 70.03 |
| | 555.71 | 720.70 | 77.11 |
| Promedio | 551.65 | 698.55 | 78.99 |
| Control Medio (160 ng/mL) | 1668.759 | 1902.46 | 87.72 |
| | 1318.20 | 1821.14 | 72.38 |
| | 1435.32 | 1910.94 | 75.11 |
| | 1354.79 | 1920.53 | 70.54 |
| | 1439.72 | 1940.77 | 74.18 |
| Promedio | 1443.36 | 1899.17 | 75.99 |
| Control Alto (260 ng/mL) | 2763.07 | 3076.84 | 89.80 |
| | 2571.66 | 2958.25 | 86.93 |
| | 2170.29 | 3050.16 | 71.15 |
| | 2544.52 | 3210.58 | 79.25 |
| | 2460.68 | 3177.98 | 77.43 |
| Promedio | 2502.04 | 3094.76 | 80.91 |
| Promedio de recobro | | | 78.63 |

5.10. Estabilidad de la muestra analítica.

5.10.1. Estabilidad de las muestras en refrigeración (7°C).

En la tabla 13 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas de fluoxetina, las cuales estuvieron almacenadas bajo condiciones de refrigeración a 7°C.

Las muestras fueron analizadas al tiempo 0, 24 y 48 horas después de su preparación.

Se puede observar que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto, se encuentran por encima del 15%, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas con fluoxetina no son estables hasta 24 horas en condiciones de almacenamiento en refrigeración a 7°C.

Tabla 13. Estabilidad de las muestras en refrigeración.

| Tiempo | | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|---------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Tiempo cero | Conc. Exp | 77.89 | 182.03 | 288.16 |
| | Conc. Exp | 76.9 | 185.96 | 266.27 |
| | Promedio | 77.39 | 183.99 | 277.21 |
| 24 horas | Conc. Exp | 60.59 | 185.55 | 279.6 |
| | Conc. Exp | 74.69 | 185.83 | 293.29 |
| | Promedio | 67.64 | 185.69 | 286.44 |
| | Desv. Abs (%) | 12.59 | 0.92 | 3.32 |
| 48 horas | Conc. Exp | 56.45 | 131.16 | 195.52 |
| | Conc. Exp | 54.81 | 131.35 | 239.23 |
| | Promedio | 55.63 | 131.25 | 217.37 |
| | Desv. Abs (%) | 28.12 | 28.66 | 21.58 |

5.8.2. Estabilidad de las muestras en los ciclos congelación- descongelación.

En la tabla 14 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas con fluoxetina que estuvieron en congelación y que fueron analizadas al

tiempo 0, 24 y 48 horas, después de su preparación. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15% indicando que las muestras son estables después de 1 ciclo de congelación-descongelación a -70°C hasta 24 horas después de su preparación.

Tabla 14. Estabilidad de las muestras en los ciclos congelación-descongelación.

| Tiempo | | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|---------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Tiempo cero | Conc. Exp | 77.89 | 182.03 | 288.16 |
| | Conc. Exp | 76.9 | 185.96 | 266.27 |
| | Promedio | 77.39 | 183.99 | 277.21 |
| 24 horas | Conc. Exp | 76.34 | 193.52 | 301.48 |
| | Conc. Exp | 65.63 | 182.14 | 320.41 |
| | Promedio | 70.98 | 187.83 | 310.94 |
| | Desv. Abs (%) | 8.28 | 2.08 | 12.16 |
| 48 horas | Conc. Exp | 52.9 | 135.130 | 242.15 |
| | Conc. Exp | 55.570 | 129.78 | 235.88 |
| | Promedio | 54.23 | 132.45 | 239.01 |
| | Desv. Abs (%) | 29.92 | 28.01 | 13.78 |

5.10.3. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente (28°C).

En la tabla 15 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas con fluoxetina que estuvieron a temperatura ambiente (28°C) y que fueron analizadas al tiempo cero, 24 y 48 horas, después de su preparación. Se

observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15% indicando que las muestras son estables después a temperatura ambiente hasta 24 horas después de su preparación.

Tabla 15. Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente.

| Tiempo | | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|---------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Tiempo cero | Conc. Exp | 77.89 | 182.03 | 288.16 |
| | Conc. Exp | 76.9 | 185.96 | 266.27 |
| | Promedio | 77.39 | 183.99 | 277.21 |
| 24 horas | Conc. Exp | 69.34 | 177.96 | 274.5 |
| | Conc. Exp | 66.47 | 190.93 | 270.02 |
| | Promedio | 67.90 | 184.44 | 272.26 |
| | Desv. Abs (%) | 12.26 | 0.24 | 1.78 |
| 48 horas | Conc. Exp | 48.22 | 118.8 | 227.05 |
| | Conc. Exp | 49.95 | 126.67 | 184.93 |
| | Promedio | 49.08 | 122.73 | 205.99 |
| | Desv. Abs (%) | 36.58 | 33.29 | 25.69 |

5.10.4. Estabilidad de la muestra procesada.

En la tabla 16 se muestran los resultados de estabilidad para muestras procesadas y que fueron analizadas al tiempo cero, 24 y 48 horas, después de su preparación. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15% indicando que las muestras procesadas son estables hasta 24 horas después de su preparación.

Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada.

| Tiempo | | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|-------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Tiempo cero | Conc. Exp | 59.65 | 165.11 | 264.17 |
| | Conc. Exp | 54.6 | 170.86 | 274.2 |
| | Promedio | 57.12 | 167.98 | 269.18 |
| 24 horas | Conc. Exp | 62.8 | 174.22 | 288.14 |
| | Conc. Exp | 57.24 | 181.49 | 305.07 |
| | Promedio | 60.02 | 177.85 | 296.60 |
| | Desv. Abs (%) | 5.08 | 5.87 | 10.18 |
| 48 horas | Conc. Exp | 64.21 | 183.79 | 298.5 |
| | Conc. Exp | 65.54 | 184.07 | 309.7 |
| | Promedio | 69.87 | 183.93 | 304.1 |
| | Desv. Abs (%) | 22.32 | 9.49 | 12.97 |

5.10.5. Estabilidad a largo plazo.

En la tabla 17 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas con fluoxetina y que fueron analizadas al tiempo cero, 13, 20 y 28 días, después de su preparación. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15% indicando que las muestras son estables después a temperatura ambiente hasta 28 días después de su preparación.

Tabla 17. Estabilidad a largo plazo.

| Tiempo | | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|-------------|---------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Tiempo cero | Conc. Exp | 64.55 | 167.09 | 288.16 |
| | Conc. Exp | 72.06 | 185.51 | 266.27 |
| | Promedio | 68.30 | 176.3 | 277.22 |
| 13 días | Conc. Exp | 56.37 | 179.1 | 238.27 |
| | Conc. Exp | 66.09 | 172.11 | 267.22 |
| | Promedio | 61.22 | 175.60 | 252.75 |
| | Desv Abs (%) | 2.03 | 0.39 | 2.79 |
| 20 días | Conc. Exp | 67.47 | 166.06 | 269.02 |
| | Conc. Exp | 67.38 | 171.31 | 257.86 |
| | Promedio | 67.43 | 168.69 | 263.44 |
| | Desv Abs (%) | 12.38 | 5.42 | 1.32 |
| 28 días | Conc. Exp | 58.6 | 162.95 | 254.05 |
| | Conc. Exp | 63.52 | 169.65 | 270.81 |
| | Promedio | 61.06 | 166.3 | 262.43 |
| | Desv Abs (%) | 10.60 | 5.67 | 0.93 |

5.11. Tolerancia.

En la tabla 18 se muestran los resultados al variar la proporción de fase móvil y la temperatura. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15% indicando que el método es tolerante al cambio de temperatura y de proporción de fase móvil.

Tabla 18. Tolerancia del método a cambios en la proporción de fase móvil y temperatura

**FASE MOVIL SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS/ACN
(54:46), TEMPERATURA 30°C
(Condición original)**

| | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Conc. Exp | 54.77 | 165.49 | 251.57 |
| Conc. Exp | 65.69 | 154.9 | 250.55 |
| Promedio | 60.23 | 160.195 | 251.06 |

FASE MOVIL SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS/ACN (52:48)

| | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|---------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Conc. Exp | 56.03 | 157.48 | 253.43 |
| Conc. Exp | 60.64 | 154.04 | 250.95 |
| Promedio | 58.34 | 155.76 | 252.19 |
| Desv. Abs (%) | 2.77 | 2.65 | 3.00 |

TEMPERATURA 40°C

| | Control bajo (60 ng/mL) | Control medio (160 ng/mL) | Control alto (260 ng/mL) |
|---------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Conc. Exp | 64.38 | 147.12 | 278.51 |
| Conc. Exp | 61.29 | 169.45 | 274.55 |
| Promedio | 62.83 | 158.28 | 276.53 |
| Desv. Abs (%) | 4.72 | 1.08 | 6.36 |

VI. CONCLUSIONES.

El método analítico optimizado y validado, resultó ser:

- Lineal en plasma en el intervalo de concentraciones entre 20 y 300 ng/mL
- Preciso (reproducibile y repetible) tanto en un día como en varios días, cuando el análisis es realizado por el mismo analista, en el mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de trabajo y el mismo equipo.
- Exacto en el intervalo de concentraciones entre 20 y 300 ng/mL.
- Sensible, ya que la concentración mínima detectable es de 10 ng/mL y la concentración mínima que es cuantificada con precisión y exactitud es de 20 ng/mL.
- Selectivo, ya que no se presentaron interferencias del plasma ni de algunas sustancias exógenas (heparina, ácido acetilsalicílico y paracetamol).
- La muestra analítica es estable, al almacenarla en congelación y refrigeración hasta 24 horas y en a temperatura ambiente hasta 48 horas.
- El método es tolerante a pequeños cambios en la fase móvil y en la temperatura.

El método analítico resultó adecuado para el análisis con muestras plasmáticas por lo tanto, es aplicable en muestras plasmáticas de pacientes a los que se les esté administrando fluoxetina para el tratamiento de la depresión.

Para aquellos estudios en los que se maneje un gran número de muestras, este método es adecuado ya que disminuye considerablemente los costos y el tiempo necesarios para realizar el análisis, además de que la técnica de extracción es sencilla y económica.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. <http://www.nimh.nih.gov> Manual Diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM iV 1195 Masson SA (1999)
2. Helu, Juan Carlos. 2001 preguntas y respuestas médicas. Selecciones del Reader's Digest. Págs. 552-553, 557-558. (1990).
3. <http://www.nimh.nih.gov/publicat/depression.cfm#ptdep2> Wiener, Myron F y otros: "Prevalence and incidence of Major Depression in Alzheimer Disease. American Journal Psychiatry 151 (1994)
4. Florey, K. Analytical Profiles of Drug Substances. Ed. Academic Press, Inc. Vol. 19 Pags. 194-217 (1990)
5. The Index Merck. 15a ed. Pág. 4224 (1997).
6. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médica Panamericana. Págs. 403-408 (1991)
7. Cedric M. Smith., Alan M. Reynard. Farmacología. Ed. Médica Panamericana. Págs 315-317.(1993)
8. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas-PLM. 42a ed. Versión Multimedia (1998).
9. Vademécum Farmacéutico. 6a edición. Rezza Editores. Págs. 8884-885, 1667-1672 (1997).

10. Quatrocchi, O.A. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro. Pags. 3-35, 89-123 (1992)
11. Lough, W. High Performance Liquid Chromatography. Fundamental Principles and Practice. Ed. Blackie Academic and Professional. Pags. 78-110 (1996)
12. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7a ed. (1999).
14. Hobart H. Willard, Lynne L. Merritt, John A. Den, Frank A. Settle. Métodos Instrumentales de análisis. Editorial Iberoamérica. Págs. 505- 528, 615-618. (1991).
15. Manuele T. Maya, Constantino R. Domingos, Teresa Guerreiro, José A. Morais. Determination of the antidepressant fluoxetine in human plasma by LC with UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. V.23. Págs. 989-996. (2000).
16. Giuliana Gatti, Ilaria Bonomi, Roberto Marchiselli, Cinzia Fattore, Edoardo Spina, Emilio Perucca. Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. Journal of Chromatography. V.784. Págs. 375-383. (2003).
17. M.A. Raggi, R. Mandrioli, G. Casamenti, F. Bugamelli, V. Volterra. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. V.18. Págs. 193-199. (1998).

18. Douglas A. Skoog, Donald M. West. Fundamentos de química analítica. 2a edición. Editorial Reverte. Págs. 737, 793-795. (1992).
19. Waschgler R., Hubmann M.R., Conca A., König P. Simultaneous quantification of citalopram, clozapine, fluoxetine, norfluoxetine, maprotiline, desmethylmaprotiline and trazodone in human serum by HPLC analysis. *Journal of Clinical Pharmacology*. V.40. Págs. 554-559. (2002).
20. Binsumait I.A., Hadidi K.A., Raghieb S.A. Stability of fluoxetine in stored plasma, aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection. *Pharmazie*. V.56. Págs. 311-313. (2001).
21. Lucca A., Gentilini G., Soldarini A. Simultaneous determination of human plasma levels of four selective serotonin reuptake inhibitors by HPLC. The drug monitoring. V.22. Págs. 271-276. (2000).
22. Alvarez J.C., Bothua D., Collignon I., Spreux-Varoquaux O. Determination of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum and brain areas using HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*. V.707. Págs. 175-180. (1998).
23. Misztal G., Hopkala H. Determination of fluoxetine in human plasma using reversed phase HPLC. *Pharmazie*. V.52. Págs. 854-856. (1997).
24. Nichols J.H., Charlson J.R., Lawson G.M. Automated HPLC assay of fluoxetine and norfluoxetine in serum. *Clinical Chemistry*. V.40. Págs. 1312-1316. (1994).

25. Maanni A., Bonini M., Creppy E.E. Fluoxetine, an antidepressant, and norfluoxetine, its metabolite, determined by HPLC with a C8 column and ultraviolet detection. *Clinical Chemical*. V.39. Págs.1749-1750. (1993).

26. S. Braggio, R.J. Barnaby, P. Grossi, M. Cugola. A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V.14. Págs. 375-388. (1996).

27. <http://www.FDA.J:/!guidance/2578dft.wpd> Bioanalytical methods validation for human studies. *Guidance for undustry*. (1998).