



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES.  
ZARAGOZA

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE  
ACETAMINOFÉN POR CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS DE  
ALTA RESOLUCIÓN EN PLASMA DE PRIMATE NO HUMANO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

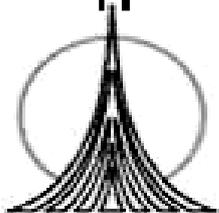
**EDUARDO BACA AGUILAR**

DIRECTOR DE TESIS

M. en F. LETICIA CRUZ ANTONIO

ASESOR

QFB MARIA CIRENIA LÓPEZ SANDOVAL



NOVIEMBRE DE 2005



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.

El desarrollo experimental de esta tesis se llevo a cabo en el laboratorio de farmacocinética del centro de investigación Proyecto CAMINA.

A MIS PADRES:  
DOY GRACIAS A DIOS QUE ME DIO  
PADRES TAN COMPENSIVOS,  
TOLERANTES Y SOBRE TODO POR  
LA CONFIANZA Y EL CARIÑO OTORGADO.

A MIS MAESTROS:

POR EL CONOCIMIENTO TRANSMITIDO  
Y EL APOYO QUE ME FORTALECIO PARA  
LOGRAR MIS METAS.

A MI DIRECTORA DE TESIS:

POR EL APOYO RECIBIDO, LA PACIENCIA  
OTORGADA, PERO SOBRE TODO POR LA  
CONFIANZA BRINDADA PARA CUMPLIR  
CON LAS TAREAS ENCOMENDADAS.

DIECTOR DE TESIS:  
M en F LETICIA CRUZ ANTONIO

ASESOR DE TESIS:  
QFB Ma CIRENIA LÓPEZ SANDOVAL

## INDICE

	Pag.
I. Introducción.....	4
II. Antecedentes Teóricos.....	6
1.0 Validación.....	6
1.1 Métodos Bioanalíticos.....	6
1.1.1 Validación Completa.....	7
1.1.2 Validación Parcial.....	7
1.1.3 Validación Cruzada.....	8
1.2 Parámetros de Validación.....	9
1.2.1 Selectividad.....	9
1.2.2 Exactitud.....	9
1.2.3 Precisión.....	10
1.2.3.1 Repetibilidad.....	10
1.2.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio.....	11
1.2.4 Linealidad.....	11
1.2.5 Rango.....	12
1.2.6 Limite de Cuantificación.....	12
1.2.7 Limite de Detección.....	12
1.2.8 Estabilidad.....	13
1.2.8.1 Condiciones de Almacenamiento.....	13
1.2.8.2 Ciclos de Congelamiento-Descogelamiento.....	13
2.0 Propiedades Fisicoquímicas del Acetaminofén.....	14
2.1 Usos y Terapéutica del Acetaminofén.....	15
2.2 Farmacocinética y Farmacodinamia del Acetaminofén.....	16
3.0 Cromatografía.....	17
3.1 Historia de la CLAR.....	17
3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	19
3.2.1 Mecanismos de Separación.....	20
3.2.2 Cromatografía de Fase Inversa.....	21

	Pag
3.2.3 Conceptos Básicos de CLAR.....	21
3.2.4 Equipo Básico de CLAR.....	26
3.3 Preparación e Introducción de la Muestra Biológica.....	31
3.3.1 Extracción Líquido-Líquido.....	32
III. Planteamiento del Problema.....	35
IV. Objetivos.....	37
V. Hipótesis.....	38
VI. Desarrollo Experimental.....	39
6.1 Material.....	39
6.2 Equipo e Instrumentos.....	39
6.3 Reactivos.....	40
6.4 Parte Experimental.....	41
6.4.1 Método Analítico.....	41
6.4.1.1 Diagrama de Flujo.....	41
6.4.1.2 Sistema Cromatográfico.....	42
6.4.1.3 Fase Móvil.....	42
6.4.1.4 Preparación de las Soluciones de Referencia.....	42
6.4.1.5 Curva de Calibración.....	43
6.5 Validación del Método Analítico.....	43
6.5.1 Linealidad del Sistema.....	43
6.5.2 Selectividad.....	43
6.5.3 Linealidad del Método.....	43
6.5.4 Límite de Cuantificación.....	44
6.5.5 Límite de Detección.....	44
6.5.6 Precisión del Método.....	45
6.5.6.1 Repetibilidad.....	45
6.5.6.2 Reproducibilidad Intralaboratorio.....	45
6.5.6.3 Exactitud.....	45
6.5.6 Estabilidad de la Muestra.....	45
6.5.6.1 Ciclos de Congelación-Descongelación.....	45
6.5.6.2 Estabilidad a Largo Plazo.....	46



	Pag
VII. Resultados.....	47
7.1 Parámetros del Sistema.....	47
7.1.1 Linealidad del Sistema.....	47
7.1.2 Precisión del Sistema.....	49
7.2 Parámetros del Método.....	49
7.2.1 Selectividad.....	49
7.2.2 Linealidad del Método.....	51
7.2.3 Precisión del Método.....	53
7.2.3.1 Repetibilidad.....	53
7.2.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio.....	53
7.2.3.3 Exactitud.....	54
7.2.4 Estabilidad de la Muestra.....	55
7.2.5 Limite de Detección.....	56
7.2.6 Limite de Cuantificación.....	57
VIII. Análisis de Resultados.....	58
8.1 Parámetros del Sistema.....	58
8.2 Parámetros del Método.....	58
8.2.1 Selectividad.....	58
8.2.2 Linealidad del Método.....	58
8.2.3 Precisión del Método.....	59
8.2.3.1 Repetibilidad.....	59
8.2.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio.....	59
8.2.3.3 Exactitud.....	60
8.2.4 Estabilidad de la Muestra.....	60
8.2.4.1 Ciclos de Congelación-Descongelación.....	61
8.2.6 Limite de Detección.....	61
8.2.7 Limite de Cuantificación.....	61
IX. Aplicación del Método.....	62
X. Conclusiones.....	63
XI. Bibliografía.....	64

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los métodos analíticos usados para un proceso en específico deben estar validados para asegurar que sirvan para el propósito para el que fueron creados, ya sea cuantificar, identificar, establecer pruebas límite, etc. Los métodos bioanalíticos son aquellos que pueden usarse para determinar un fármaco contenido en una matriz biológica. El método bioanalítico que se planea validar es el que cuantifica el acetaminofén en plasma de primate no humano.

La validación de este método analítico a estudios a desarrollar por Proyecto Camina, un centro de investigación en el cual dentro de sus líneas de investigación es la evaluación de las alteraciones farmacocinéticas atribuidas a una lesión traumática de medula espinal, con la finalidad de establecer el impacto que puede tener este padecimiento sobre el efecto farmacológico, efecto que se desea evaluar en un modelo animal más complejo (primate no humano) que el estudiado hasta el momento (rata). La línea de investigación principal del Proyecto Camina es la cura de la parálisis y las derivaciones que esta implica, una de ellas es la lesión traumática de medula espinal (LTME) que podría disminuir la posibilidad de absorción del acetaminofén, y así pues la disminución en su efecto farmacológico, es entonces que la finalidad de este estudio se realiza para sustentar de manera adecuada si hay relación entre la disminución del efecto farmacológico del acetaminofén con la LTME que presentan los individuos a los que está enfocado este estudio, que es la población objetivo, a la que beneficiara la investigación correspondiente que desarrolla este centro de investigación.



La técnica usada para la cuantificación de este analito es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), una técnica que combina las técnicas de separación como es la cromatografía, con aditamentos y equipo que permiten la cuantificación del acetaminofén por medio de la espectroscopia ultravioleta (UV). La validación de un método inicia con el diseño del mismo, y se deben tomar en cuenta factores que afectan al analito que se desea cuantificar, como lo es, el estado en que se encuentra dentro de matriz biológica en la que se va a determinar; de lo anterior se parte el seleccionar el tipo de fluido biológico que se utilizara en el método de cuantificación. En el caso específico del acetaminofén que se une en mas de un 90% a proteínas, es preferible la obtención de acetaminofén de muestras de plasma.

Por lo tanto una técnica validada para el método de cuantificación garantiza su aplicación en estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y/o bioequivalencia que al terminar este proyecto, se podrá determinar acetaminofén, en este caso en plasma de primate no humano, de manera eficaz y así poder trasladar las conveniencias de los resultados arrojados de este estudio a las aplicaciones para el estudio en desarrollo.

## II. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### 1.0 Validación<sup>1,2,3,4</sup>

Se denomina validación a un proceso específico que pretende demostrar, mediante evidencia documentada, que cumple con el propósito para lo que fue hecho.

El proceso de validación para los métodos biológicos son conocidos como métodos bioanalíticos, este tipo de método es en el que se centra todo el proceso de la validación; por lo tanto se debe definir que son los métodos bioanalíticos y su validación.

### 1.1 Métodos Bioanalíticos<sup>5,6</sup>

Los métodos bioanalíticos son definidos como los procedimientos que son usados para cuantificar fármacos y sus metabolitos en una matriz biológica como sangre, plasma, suero u orina.

Este tipo de métodos que son utilizados generalmente para respaldar estudios farmacocinéticos son probablemente los procedimientos mas difíciles de desarrollar y validar, pues hay factores que dificultan el desarrollo del método como son la complejidad de las muestras matriciales, los niveles de trazas de fármacos y sus metabolitos encontrados, y así por igual combinado con la complejidad de la instrumentación usada por el analista, pueden incidir gravemente en la confiabilidad del método desarrollado.

La validación de un método analítico aplica en diferentes niveles, que a continuación se enumeran:

### **1.1.1 Validación Completa<sup>5,6</sup>**

Este tipo de validación es de tipo más extenso y se realiza cuando se desarrolla e implementa un método bioanalítico, para el desarrollo de nuevos fármacos, en el caso de la modificación de un ensayo, como es el caso de adición de metabolitos añadidos y la cuantificación de este en la matriz.

### **1.1.2 Validación Parcial<sup>5,6</sup>**

Este tipo de validación se realiza cuando se hacen cambios en métodos analíticos ya validados; los cambios que pueden ameritar una validación parcial incluyen:

- a) Transferencia de métodos bioanalíticos entre laboratorios o analistas
- b) Cambios en la metodología analítica; como son los cambios en el sistema de detección..
- c) Cambios en el anticoagulante del fluido biológico colectado.
- d) Cambios de matriz en una misma especie, como podría ser de plasma humano a orina humana.
- e) Cambios en el procesamiento de las muestras.
- f) Cambios de especie de la misma matriz, como podría ser de plasma de rata a plasma de primate no humano.
- g) Cambios relevantes en el rango de concentraciones.
- h) Cambios en los instrumentos y/o el software usado.

- i) Volumen de muestra limitado, como es el caso de los estudios pediátricos.
- j) Para la demostración de selectividad de un analito en la presencia de medicamentos concomitantes.
- k) Para demostrar selectividad de una analito en presencia de metabolitos específicos.

### **1.1.3 Proceso de Validación** <sup>5,6</sup>

El tipo validación aplica según el momento en el que se este usando el método analítico, pues puede estar en fase de desarrollo, u otro tipo de modificaciones que puedan afectar la confiabilidad del método analítico en uso.

El proceso de desarrollo de validación de un método analítico se divide en tres partes: a) preparación del estándar de referencia, b) establecimiento y desarrollo de la validación del procedimiento de análisis, y c) la aplicación del método validado para la rutina de análisis de fármacos.

En el primer caso se trata de asegurar que el estándar usado para cargar la matriz u otro uso que se le de en el método analítico, sea de la calidad adecuada, tal que se asegure que la procedencia de esta sustancia no afecte la confiabilidad del método desarrollado, para la segunda parte del proceso de validación del método bioanalítico se define la parte química del método , ya que en esta parte se establecen los parámetros básicos para el método analítico, aunque cabe indicar que los parámetros mínimos para cualquier método bioanalítico son exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad, y en la ultima parte del desarrollo del método bioanalítico el método que se valido se aplica para la cuantificación de determinado analito en un análisis de rutina.

Ya habiendo vislumbrado el concepto de validación se tiene que mencionar los parámetros que debe incluir la validación de un método bioanalítico, y estos son los siguientes.

## **1.2 Parámetros de Validación <sup>1</sup>**

### **1.2.1 Selectividad**

Este parámetro también llamado especificidad se define como la capacidad que tiene un método analítico para cuantificar con exactitud y especificidad el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Para este parámetro se deben analizar matrices biológicas que se utilicen para el método analítico como podría ser plasma, orina, u otra matriz; se analizan muestras blanco de cuando menos seis fuentes (plasma de primate no humano), para cada blanco se evalúan diferentes interferencias que pudieran afectar el método analítico como son componentes exógenos de la matriz, metabolitos, productos de descomposición, y fármacos concomitantes. No se presentaron interferencias en la cuantificación del analito en cuestión.<sup>(1,5)</sup>

### **1.2.2 Exactitud<sup>1</sup>**

La exactitud es un parámetro del método analítico que se define como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, es decir, se compara el valor promedio de los resultados obtenidos experimentalmente contra el valor real de la concentración del analito. Este parámetro se realiza analizando por lo menos de tres concentraciones dentro del rango de concentración esperada, estas tres concentraciones se realizaran por quintuplicado, y como la exactitud se

expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les adiciono una cantidad conocida del analito, el valor de desviación promedio a partir del valor real sirve para medir la exactitud.

Así el valor promedio para métodos analíticos cromatograficos deberá estar dentro del 15%, excepto para el limite de cuantificación que no debe tener una desviación de mas del 20%.<sup>(1)</sup>

### **1.2.3 Precisión** <sup>(1, 2, 3, 4,5)</sup>

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales obtenidos por el método analítico. Con este parámetro se evalúa al método analítico y al sistema que se este usando para realizar las determinaciones del analito.

Para la precisión del sistema se realiza el análisis de la concentración media de la curva de concentración y se repite por sextuplicado, el coeficiente de variación no será mayor del 2%.

Para la evaluación de la precisión del método, el procedimiento es más elaborado, ya que la precisión se determina a través de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio. <sup>(1, 2, 3,5)</sup>

#### **1.2.3.1 Repetibilidad<sup>1</sup>**

Este parámetro nos expresa la precisión del método analítico como la concordancia obtenida de las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones, se puede probar al analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc. Para llevarla a cabo se analizan en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones, que son denominadas como, baja, media y alta del o los compuestos a analizar

en la matriz biológica. Las concentraciones usadas deben ser distintas a las que se incluyen en la curva estándar. El coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15% para métodos analíticos de tipo cromatográfico. <sup>(1)</sup>

### **1.2.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio<sup>1</sup>**

En este caso el concepto es similar a la repetibilidad, la diferencia radica que en este caso las determinaciones realizadas se tratan en condiciones diferentes, como puede ser analistas distintos, diferentes días, laboratorios y/o equipos diferentes, etc.

Así entonces se deben analizar por duplicado por un periodo de tiempo de tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas como: baja, media y alta del o de los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones serán distintas a las que se toman en cuenta en la curva de calibración, pero deben estar incluidas en el rango de concentración de la curva.

El coeficiente de variación no deberá ser mayor que el 15% para los métodos de tipo cromatográfico. <sup>(1)</sup>

### **1.2.4 Linealidad <sup>(1,2,3,4,5)</sup>**

La linealidad también llamada curva de calibración es un parámetro que nos indica la capacidad de un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del compuesto, que se encuentra dentro de una muestra.

La linealidad se aplica al sistema y al método analítico en estudio; en el sistema se trata de probar que el equipo usado para la determinación del analito esta en las condiciones adecuadas para la determinación del compuesto, para la linealidad del método analítico se trata de probar que el método desarrollado para la determinación del analito en la

matriz biológica (plasma de primate no humano) usada es adecuado para el propósito para el que se trata de usar.

El método para linealidad debe demostrarse con al menos cinco puntos (que incluya los puntos extremos a excepción del cero) por triplicado.

#### **1.2.5 Rango** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

El intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto se denomina rango; y se debe caracterizar por uno o mas intervalos constituidos por al menos cinco concentraciones diferentes cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

#### **1.2.6 Limite de Cuantificación** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

Es denominado así a la concentración mas baja del analito que puede cuantificarse por el método analítico con exactitud y precisión. Se debe analizar por quintuplicado la concentración mas baja del rango de trabajo, y el valor promedio debe estar dentro del +/- 20% del valor nominal con un coeficiente de variación de no mayor que 20%.

#### **1.2.7 Limite de Detección** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

Se llama así a la concentración mínima de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo condiciones específicas de operación. Se debe determinar la concentración en la cual la señal del analito en la matriz biológica (plasma de primate no humano) puede distinguirse de de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

### **1.2.8 Estabilidad** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

La estabilidad de los fármacos en la muestra biológica usada debe realizarse de acuerdo a las condiciones de almacenamiento usadas, las propiedades químicas del fármaco, la matriz y el sistema que lo contiene.

La prueba de estabilidad debe ser tal que se puedan evaluar las condiciones experimentales a las que se somete la muestra durante el estudio; como son la colección de la muestra, periodos de almacenamiento, y de ciclos de congelación y descongelación de las muestras y debe tomarse en cuenta la preparación y análisis de muestras.

#### **1.2.8.1 Condiciones de Almacenamiento** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

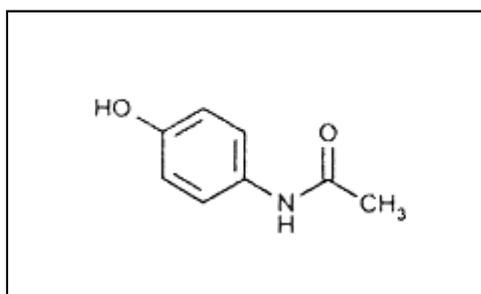
Se evaluará la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se conservaran las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

#### **1.2.8.2 Ciclos de Congelación-Descongelación** <sup>(1,2,3,4,5)</sup>

Evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica, y lo anterior constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se preparan al menos por triplicado muestras a un nivel bajo y alto de la curva de calibración, almacenadas a la temperatura en que estarán las muestras reales por un tiempo de 24 hrs., descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por 24 hrs bajo las mismas condiciones, analizar las muestras al menos en el tercer ciclo.

## 2.0 Propiedades Físicoquímicas del Acetaminofén<sup>7,8,9,10,11,12,13</sup>

El acetaminofén es el fármaco que se determinara y se validara su cuantificación, misma que se realizara por medio de CLAR; por lo tanto es importante que se conozcan las propiedades físicas y químicas de esta sustancia para el adecuado manejo de la misma. En la figura 2.1 se puede observar el compuesto de nuestro interés.



**Fig. 2.1.** Estructura Química del Acetaminofén

Formula Molecular:  $C_8H_9NO_2$

Nombre químico: N-(4-Hidroxifenil) acetamida

Sinónimos:

Paracetamol, *p*-Hidroxiacetanilida, *p*- Acetamidofenol, 4-Hidroxiacetanilida, *p*- Acetaminofenol, N-acetil-*p*-aminofenol.

Descripción: Polvo blanco cristalino, fácilmente soluble en alcohol y metanol, soluble en acetona, acetato de etilo, agua caliente y solución 1 N de hidróxido de sodio; poco soluble en cloroformo. Peso molecular 151.16 g/mol, pKa 9.5, temperatura de fusión entre los 168° C y 172 ° C. <sup>(7,8,9)</sup>

## **2.1 Usos y Terapéutica del Acetaminofén** <sup>(10,11,12,13)</sup>

El acetaminofén es una sustancia considerada principalmente como analgésico no esteroideo (AINE), aunque posee también acción antipirética, antinociceptiva y escasa actividad antiinflamatoria.

Paracetamol es útil para reducir la fiebre y en la analgesia temporal de algias menores, dolores y malestares asociados con fiebre y dolor, cefalalgia, neuralgias y dolores articulares, otalgias, síntomas del resfriado común o afecciones similares, fiebre post-vacunal, postamigdalectomía, odontalgias y post-cirugía como la postextracción y otros procesos invasivos del área estomatológica. <sup>(10,11,12,13)</sup>

## **2.2 Farmacocinética y Farmacodinamia del Acetaminofén** <sup>(10,11)</sup>

El mecanismo por el cual se le atribuye al paracetamol acción antiinflamatoria es la inhibición de la actividad de las ciclooxigenasas, enzima que convierte al ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos, y así como estos eicosanoides participan en los mecanismos patogénicos de la inflamación, el dolor, etc., la inhibición de su síntesis por los AINE es responsable de su actividad terapéutica. Su acción analgésica se atribuye a su efecto antiprostaglandínico periférico, es decir, es la consecuencia de su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas en el sitio donde se produce una agresión o lesión tisular, y por tanto impediría que los eicosanoides contribuyeran, mediante su acción sensibilizadora sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas, a incrementar la acción dolorosa de otros mediadores allí liberados como son histamina y bradisinina. En su acción antitérmica o antipirética se explica porque los AINE´s recuperan la actividad de la célula de la

región preóptica/hipotálamo (PO/HA), cuya región ha sido previamente deprimida por el pirógeno afectante, de manera que su funcionamiento es a nivel central suprimiendo la hipertermia producida por el ácido araquidónico.

El paracetamol se absorbe muy bien en el intestino delgado, con una biodisponibilidad dosis-dependiente entre el 70 y 90%. La velocidad de absorción depende predominantemente de la velocidad de vaciamiento gástrico: se retrasa con los alimentos y fármacos que demoran el vaciamiento (anticolinérgicos, opiáceos), y se acelera con los que lo activan (metoclopramida). La  $C_{max}$  se alcanza a los 30-90 minutos. Se absorbe bien en el resto, aunque algo más lentamente que en el tubo digestivo alto.

Se distribuye en los tejidos y líquidos, con un  $V_d$  de 0,91 L/kg. Es metabolizado en un 95% en el hígado. Los principales metabolitos son conjugados con sulfato o ácido glucurónico. Una pequeña fracción (4-5%) se convierte en la fracción microsomal, utilizando el sistema de oxidasas mixtas y citocromo P-450, en un metabolito altamente reactivo arilante, la N-acetilbenzoquinoneimida, que normalmente es atrapado e inactivado por el glutatión y eliminado como conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico. Pero con dosis muy elevadas de paracetamol, la velocidad de formación de este metabolito excede a la de síntesis de glutatión hepático, y se fija por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas a las que inactiva, provocando necrosis hepática.

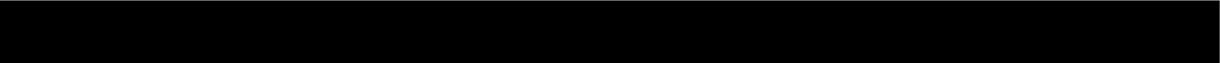
La vida media de eliminación es de 2-2.5 hora, y la depuración total de 4.5-5.5 mg/kg/min. La vida media aumenta en los casos de intensa insuficiencia hepática. <sup>(10,11,12,13)</sup>

## 3.0 Cromatografía

### 3.1 Historia de la CLAR<sup>14,15</sup>

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica que se desarrolló en finales de los 60's. En esta década la cromatografía de líquidos aparece por primera vez en su modalidad de columna abierta, papel o cromatografía en capa fina; la cuantificación con estas técnicas resulta inadecuada y la resolución de compuestos similares es difícil, y aun cuando existía la cromatografía de gases (que se desarrolló de 1960 a 1970) que es útil para la cuantificación de varios compuestos tiene algunos problemas que surgen debido a que la mayoría de los compuestos biológicamente activos son no volátiles, termolábiles, iónicos, o de alto peso molecular; así es entonces se requiere la derivatización, lo que lleva a errores debido a la introducción de la muestra y la dudosa cuantitatividad de los resultados. Es entonces en el año 1969 surge por primera vez la CLAR y su desarrollo primario es en la década de los 70's, esta técnica surge por la necesidad de la separación y cuantificación de nucleosidos y nucleótidos procedentes de hidrosilatos del DNA y RNA.

Existen algunas limitantes en el momento del desarrollo de esta técnica como es que las columnas usadas resultaban en los inicios del desarrollo de esta técnica poco fiables, los tiempos de retención no eran reproducibles, se presentaba inconsistencia en la velocidad de flujo de las bombas, por lo mismo existían reticencias acerca del uso de la CLAR. Para remediar la poca fiabilidad de esta técnica se desarrolló materiales de empaque como son micropartículas químicamente unidas y la implementación de materiales de empaque para la fase reversa, así en los 70's la CLAR se vuelve una técnica aceptable para laboratorios que requieren una buena separación de muestras.



La década de los 80's se caracteriza por un avance rápido en la instrumentación y equipamiento de la CLAR, que se vuelve automatizado y computarizado; el material de empaque fue evolucionando al disminuir el tamaño de partícula y aumentando el tamaño de poro; nuevas columnas salieron al mercado, fueron disminuyendo su tamaño tanto en longitud como en diámetro, hasta llegar a microcolumnas, los tamaños de inyección muestra disminuyeron mucho, hubo una reducción de la velocidad de flujo.

La aplicación de la CLAR se expandió en cuanto a su utilidad gracias al desarrollo de materiales de empaque diversos y la apropiada fase móvil; ejemplos de material de empaque son silica, y otros en los que se incluyen óxidos, carbono, resinas poliméricas, etc., que hicieron posible los diversos tipos de cromatografía como son las de intercambio iónico, de afinidad, inmunoafinidad y adición quirál, entre otras.

Gracias a la aplicación de la CLAR fue posible la separación de biopolímeros, enantiómeros y otros isómeros como son los ópticos, además el progreso en los detectores como son los de láser de dispersión de luz, índice de refracción, de láser de fluorescencia inducida, y la CLAR con detector ultravioleta acoplada a espectroscopia de masas que además de identificar un compuesto, hace posible su cuantificación.

En la actualidad esta es una técnica que es indispensable para áreas como la investigación, la farmacéutica, análisis de aguas, suelos, alimentos, etc., por lo mismo al volverse en algunos casos rutinaria en lo que análisis se refiere, se ha sofisticado, en instrumentación y equipo, por lo que su análisis se ha vuelto rápido y confiable. Así pues esta técnica resulta de primordial importancia en lo que al análisis instrumental se refiere.

### 3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución<sup>15,16,17,18,19,20</sup>

Para entender la Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR), primero debemos comprender el fundamento de esta técnica que es una aplicación de una técnica de separación más sencilla que la CLAR, esta técnica es la cromatografía. La *Cromatografía* es una técnica de separación usada desde hace mucho tiempo. La primera vez que se utilizó este término fue en el año 1906 que Twuist la describe como un "método en el cual los componentes de una muestra son separados en una columna absorbente en un sistema fluido".

Al pasar los años se fueron dando diferentes interpretaciones de esta técnica, así es que la *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) tratando de unificar criterios se realizó la siguiente definición "*La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes se separan y distribuyen en dos fases, una de la cual, es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida*".

En general se puede decir que la cromatografía se puede clasificar de acuerdo a varios criterios con las que se puede indicar el tipo de cromatografía que se usa, en la tabla 2.1 se observa los distintos nombres que toma la cromatografía en cada caso.

Tabla 2.1. Clasificación General de la Cromatografía<sup>(17)</sup>

Clasificación de acuerdo a

<i>Naturaleza de Fase móvil</i>	Gas	GC	} TLC Columna abierta HPLC
	Líquido	LC	
<i>Naturaleza de Fase estacionaria</i>			
Fase estacionaria	Fase móvil		
Sólido	Líquido	LSC	ó de Adsorción
Líquido	Líquido	LLC	ó de Partición
Gas	Líquido	GLC	
Gas	Sólido	GC	
<i>Fenómeno que ocurre dentro de la columna</i>			
Afinidad	C. de Fase normal		
	En fase ligada	BPC	
	De Intercambio iónico	IEC	
Tamaño molecular (SEC)	GPC		
	GFC		
<i>Cantidad de muestra aplicada</i>	C. Analítica	→	pg
TLC	C. Semipreparativa	→	mcg
HPLC	C. Preparativa	mcg	g
Columna abierta		> g	

La CLAR es una modalidad de la cromatografía de líquidos en la que se al implementarse la instrumentación adecuada se consiguen una separación selectiva de compuestos de interés mediante la elusión con un disolvente a presión elevada, para que al salir el analito de la columna se someta al análisis correspondiente.

### 3.2.1 Mecanismos de Separación<sup>21,22</sup>

Los mecanismos o procesos de separación por los cuales funciona dan lugar a diferentes métodos de cromatografía de líquidos, como son: liquido-liquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles; en la que las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases. La cromatografía liquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto son

retenidas. La cromatografía de intercambio iónico en la que la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como son  $-\text{SO}_3$ , junto con iones de carga opuesta; así las moléculas de una muestra son retenidas en la columna por el intercambio iónico. Y por último se encuentra la cromatografía de exclusión molecular, en la que el material de empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido; de esta manera las moléculas que son demasiado grandes para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las que son más pequeñas penetran en los poros prolongando así el tiempo de elusión de estos últimos.

Existen modificaciones a estos tipos de cromatografía como sería la cromatografía de fases enlazadas, permeación en gel-exclusión en gel, quiral, etc.

### **3.2.2 Cromatografía de Fase Inversa**

La cromatografía en una de sus clasificaciones incluyen la fase normal y la fase inversa, siendo que en la primera la fase estacionaria es de tipo polar y la fase móvil es no polar, y en la de fase inversa es lo contrario; es decir involucra una fase estacionaria está relativamente poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a los grupos silanol del soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.

### **3.2.3 Conceptos Básicos de CLAR <sup>7,23,24,25</sup>**

La cromatografía se describe básicamente en cuatro conceptos: capacidad, eficiencia, selectividad y resolución. La capacidad y la selectividad de la columna son variables que están estrechamente relacionadas con el proceso de manufactura de la columna, siendo que la eficiencia y la resolución pueden ser controladas.

### a) Numero de Platos Teóricos

Un plato teórico, es un corte imaginario dentro de la columna, mismo donde se alcanza el equilibrio temporal de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. El concepto de plato teórico en cromatografía fue desarrollado por Martín y Singe, expresión que es generalmente aplicable para todos los tipos de columnas cromatograficas, en la que se describe al numero de platos teóricos, primero como una medida de resolución y eficiencia de la columna, expresada en términos de numero de platos teóricos ( $N$ ) y la altura equivalente del plato teórico denotado por  $H$ , y secundariamente para medir la resolución alcanzada en un cromatograma. La siguiente ecuación define al número de platos teóricos en términos del tiempo de retención y el ancho de base del pico.

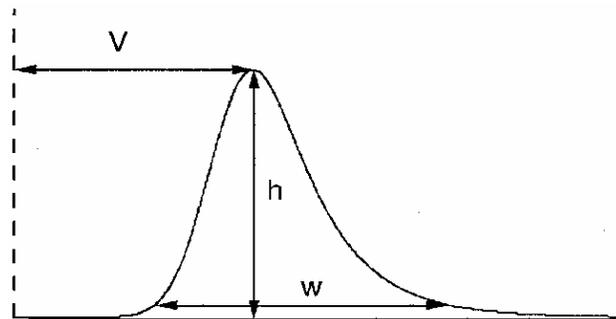


Figura 2.2. Platos teóricos en un cromatograma

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2 \quad \text{ó} \quad N = 16 \left( \frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

donde:

$N$ = Número de platos teóricos.

$t$ = Tiempo de retención de la sustancia

$W$ = Ancho del pico en su base, obtenido al extrapolar los lados Relativamente rectos del pico con la línea base.

$W_{h/2}$  = Ancho máximo a media altura.

La expresión anterior describe la eficiencia de la columna, es decir, la capacidad para proporcionar picos estrechos y bien separados. A mayor valor de  $N$  mayor será la eficiencia de la columna.

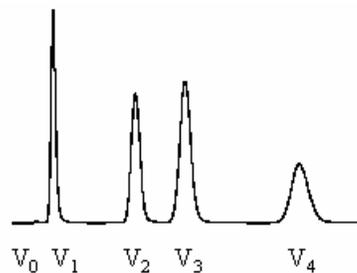
La eficiencia de la separación también se puede medir en términos de la altura equivalente del plato teórico con la siguiente expresión:

$$H = L/N$$

Donde  $L$  es el largo de la columna y  $H$  es la altura equivalente del plato teórico y  $N$  es la eficiencia. La eficiencia se varía con cambios de la longitud de la columna o en la velocidad de flujo del disolvente.

#### b) Factor de Capacidad

Para una separación efectiva en cromatografía de líquidos, la columna debe tener la capacidad de retener la muestra y la habilidad para separar componentes de la muestra eficientemente. El factor de capacidad  $K_n$ , de la columna es una medida directa de la intensidad de la interacción de la muestra con el material de empaque, es definido como se indica en la expresión de la figura 2.3.



$$k'_n = (t_n - t_0) / t_0 \quad k_n = (V_n - V_0) / V_0$$

**Figura 2.3 .** Factor de Capacidad

Donde  $t_n$  es el tiempo que tarda un soluto específico para llegar al detector (tiempo de retención) y  $t_0$  es el tiempo que tardan las especies no retenidas para llegar al detector. Algunos valores de  $K$  son obtenidos si se usa el volumen en vez del tiempo:  $V_R$  es el volumen de solución que pasa al detector, antes de que se observe un pico específico de elusión y  $V_0$  es el volumen del solvente bombeado al detector entre el tiempo de inyección y el de aparición de especies no retenidas. (volumen nulo). El volumen nulo es igual al volumen de la columna no ocupado por el material de empaque.

El factor de capacidad de una columna en su mayor parte esta en función del material de empaque pero puede ser manipulado para disminuir por una variación en la fuerza del solvente. Usar una columna con un elevado factor de capacidad es el mejor camino para proporcionar resolución en la separación, pero un elevado factor de capacidad puede resultar en tiempos de análisis largos, comprometiendo la relación entre resolución y tiempo de análisis que debe ser alcanzado. Típicamente un valor de  $K_n$  entre 2 y 5 representa un buen balance entre tiempo de análisis y resolución; sin embargo son aceptables valores entre 1 y 10.

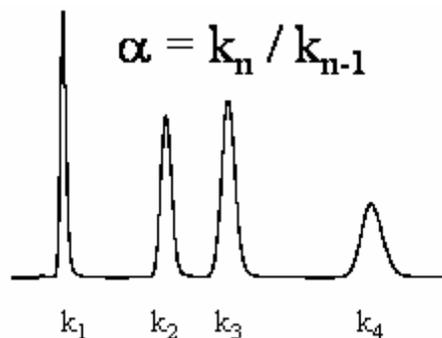
### c) Selectividad

La selectividad de un sistema cromatográfico es una medida de la diferencia de los tiempos de retención (o volúmenes) entre dos picos, los que describe la efectividad con la que son separados dos compuestos en un sistema cromatográfico. La selectividad es usualmente definida en términos de  $a$ , donde:

$$a = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} = \frac{K_{n2}}{K_{n1}}$$

La selectividad de una columna es función primaria del material de empaque, no obstante el cromatograma puede ser controlado con la fase móvil o con temperatura. El valor de  $a$  es la unidad (1), cuando los tiempos de retención de dos componentes son idénticos ( $t_2=t_1$ ).

Para incrementar el valor de  $a$  la opción es cambiar la composición de la fase móvil; así la selectividad en función de los factores de capacidad se calcula como se observa en la figura 2.4.



**Figura 2.4.** Selectividad

#### d) Resolución

La resolución es un termino usado para describir la disminución en la separación de bandas de picos de solutos vecinos. Esto se ve afectado por la selectividad ( $\alpha$ ) la eficiencia ( $N$ ) y la capacidad ( $K_n$ ). La siguiente ecuación de la resolución describe la relación entre los factores antes mencionados y los indicados, como pueden estos pueden ser manipulados para proporcionar una adecuada resolución entre dos picos.

$$R = \left(\frac{1}{4}\right) (a-1/a) (N)^{0.5} (K_{n/1} + K_n)$$

Usualmente un valor de R tan grande como 0.8 es necesario para la cuantificación precisa de dos picos. El mejor camino para cambiar el valor de R es el cambio en la selectividad o el factor de capacidad de la columna. El efecto de la disminución de la eficiencia de la columna ya sea por disminución del largo de la columna o descenso de la velocidad de flujo es poco significativo, ya que la resolución incrementa proporcionalmente a la raíz cuadrada de el numero de platos teóricos es entonces que a mayor resolución mejor será la separación lograda. Otra forma de calcular la resolución se observa en la figura 2.5.

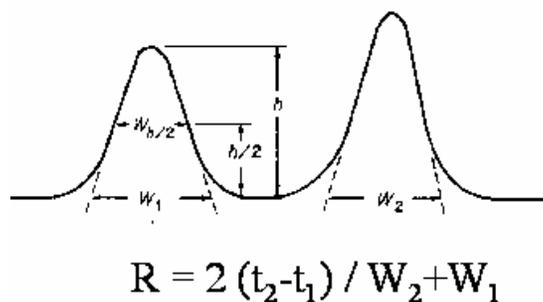
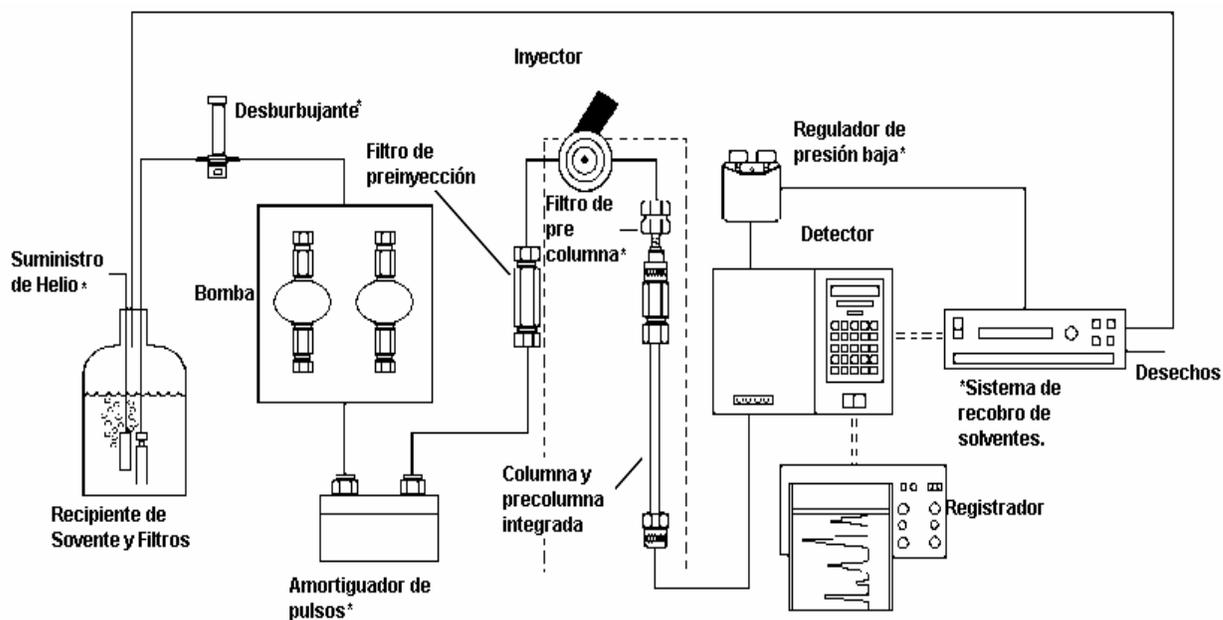


Figura 2.5. Resolución

### 3.2.4 Equipo Básico de CLAR<sup>7</sup>

Las partes de las que se conforma un equipo de CLAR se enumera a continuación, hay que decir sin embargo que solo se hace mención de las esenciales ya que sobre el equipo utilizado hay muchas variaciones. El que se observa en la figura 2.6 muestra los componentes de un sistema básico de CLAR, y las partes marcadas con asterisco pueden o no incluirse en el mismo, se presentan para ilustrar un equipo completo de CLAR.



**Figura 2.6.** Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

#### a) Sistema de Bombeo.

El sistema que tiene como objetivo impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como son reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.

De los sistemas de bombeo que existen se clasifican en dos tipos, que son:

Bombas de flujo constante que mantienen una velocidad de flujo a través de la fase móvil. Entre estas están las bombas reciprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan el disolvente que entra a cámaras con una capacidad de volumen pequeña.

Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo embolo actúa mediante un espiral que empuja el disolvente y la

segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo minimiza las pulsaciones

Bombas de presión constante que tienen la desventaja de que se debe mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna. La forma más sencilla de estas bombas emplea una presión de un gas inerte para presurizar el disolvente; o en lugar del gas puede usar un amplificador neumático que utiliza un pistón.

Los anteriores son normalmente para sistemas isocráticos, donde la proporción de la fase móvil se mantiene constante, cuando los solutos a separar poseen un valor muy variable de  $K_n$  se debe utilizar un sistema de gradiente, en el que se varía la composición de la fase móvil a través del tiempo de elusión; estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar lineal o exponencialmente las proporciones iniciales de los disolventes, mismos que se encuentran separados en sus respectivas bombas. Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna.

#### b) Sistema de inyección

Mediante este se introducen las muestras al sistema cromatográfico, y se hace mediante varios mecanismos de inyección y se utilizan según sea el caso.

La forma más sencilla de estos consiste en introducir la muestra mediante una jeringa, también se encuentra la forma automatizada con la que se mantiene la reproducibilidad entre inyecciones y se disminuye el error debido a la medición del volumen a inyectar.

### c) Detector

Existe una amplia variedad de estos, en la se pueden distinguir dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil, y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente. La adecuada selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar; entre los detectores más utilizados se encuentran:

- i. Detector UV
- ii. Detector de Índice de Refracción
- iii. Detector Electroquímico
- iv. Detector Infrarrojo
- v. Detector de Fluorescencia
- vi. Detector de Radioactividad

### d) Columna

Este es el corazón del proceso cromatográfico, donde se realiza la separación de las muestras; y el material de empaque utilizado estará en virtud de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de la columna esta en función del fin al que se desee llegar en la separación; existen la columnas de grades dimensiones para la cromatografía preparativa, y de menor tamaño en cuanto a longitud y diámetro, para fines analíticos.

Las más comunes son de acero inoxidable, aunque también las hay de vidrio, su longitud puede ir de 10cm o menos hasta 1 metro. Sobre el material de empaque de la columna es diverso, y a continuación se enumeran los usados en CLAR:

- i. Octadecil-silano (ODS) enlazado químicamente a silica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 mcm a 10 mcm de diámetro.
- ii. ODS enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30 mcm a 50 mcm
- iii. Partículas de silica porosa de 5 mcm a 10 mcm de diámetro
- iv. Gel de sílice con una superficie de porosidad definida.

#### e) Registrador de Señales

Los compuestos separados en la columna, deberán ser registrada por un graficador o un registrador.

En el caso del graficador es necesario calcular manualmente el área obtenida para cada pico.

El método mas sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base al máximo del pico aunque se debe contar con una línea base estable para obtener una buena precisión. Esta área se puede medir por varias maneras, si el pico es simétrico se hace mediante triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Hay otras formas como son utilizando un planímetro o recortando y pegando el área obtenida. Aunque una manera muy frecuente es medir la altura de los picos y multiplicarla por el ancho del pico medido en la altura media.

### **3.3 Preparación e Introducción de la Muestra Biológica<sup>25,26,27,28</sup>**

Las muestras para fines de cuantificación analítica usando CLAR requieren en la mayor de las veces una preparación previa de las muestras que se analizarán, dependiendo de las características físico-químicas de la muestra y del principio activo a cuantificar, será el tratamiento al que se someterán las muestras.

La muestra como tal en el caso del plasma es una matriz compleja de la cual solo nos interesa obtener un determinado compuesto el cual se analizará al introducirse el equipo de CLAR, por lo mismo es conveniente una preparación previa de la misma para eliminar en la mayor cantidad elementos que provengan del plasma, y que pudieran intervenir en la determinación y cuantificación del compuesto de interés.

Las muestras como tal raramente se pueden inyectar directamente al cromatógrafo, así que se algunas técnicas de preparación son usualmente requeridas. La preparación de las muestras incluye la manipulación de las mismas antes de su análisis, incluyéndose técnicas como pesar, diluir, concentrar, filtración, centrifugación y extracción líquido-líquido(L-L) o sólido-líquido(S-L).

La preparación de la muestra puede realizarse en dos fases de la cuantificación por CLAR; en un pretratamiento previo de las muestras o en el caso de los equipos automatizados se procesa automáticamente para después inyectarse al equipo de CLAR. Las operaciones más comunes que se practican como pretratamiento para después inyectarla al cromatógrafo incluyen filtración, concentración o dilución, pesadas, pH, modificaciones, adición de estándar interno, evaporación, centrifugación, cromatografía L-L , S-L y derivatización. Si bien a veces basta con una de estas técnicas para el tratamiento de la muestra, la mayoría de las veces se requieren dos o más técnicas. Ejemplos de

muestras que requieren pretratamiento incluyen las provenientes de la industria farmacéutica, muestras biológicas donde el analito se puede encontrar en trazas, o es enmascarado por proteínas que deben ser removidas para poder analizar y cuantificar el analito de interés.

Para un tomar una adecuada decisión sobre el tratamiento que recibirá la muestra para ser analizada y cuantificada posteriormente, se deben tomar en cuenta factores como; el estado físico de la muestra, propiedades fisicoquímicas del analito de interés o en el caso que se tome en cuenta la composición de la matriz que lo contiene, se deben conocer también las propiedades de la misma.

En este caso en específico solo se abordará el tema del pretratamiento para muestras líquidas; ya que la matriz ocupada es líquida, y por lo mismo a continuación se define brevemente la técnica utilizada para la extracción del principio activo. <sup>(25,26,27,28)</sup>

### **3.3.1 Extracción Líquido-Líquido (ELL)<sup>30,31</sup>**

La idea básica detrás de la ELL es la separación de componentes (solutos) a partir de mezclas mediante el proceso de partición que ocurre en dos solventes inmiscibles entre sí. La partición de los solutos está directamente relacionada con la solubilidad de los mismos y el equilibrio que se establece. Este concepto se establece a partir del principio sobre el que una molécula hidrofóbica prefiere un medio orgánico y un compuesto iónico prefiere permanecer en una solución acuosa. Es así que se utilizan las propiedades de solubilidad del compuesto problema para su extracción de la matriz que lo contiene.

El proceso de extracción es ilustrado por la ley de Nernst de la distribución de los estados en donde una especie neutra puede ser distribuida entre dos solventes inmiscibles a fin de que la concentración

restante permanezca constante. La ecuación (1) ilustra la ley ya mencionada.

$$K_D = C_o / C_{ac} \quad (1)$$

Donde  $K_D$  es la constante de distribución,  $C_o$  es la concentración del analito en la fase orgánica y  $C_{ac}$  es la concentración del analito en la fase acuosa. Una expresión más útil de la fracción del analito extraído ( $E$ ) expresión que se observa en la siguiente ecuación.

$$E = C_o V_o / (C_o V_o + C_{ac} V_{ac}) = K_D V / (1 + K_D V) \quad (2)$$

Donde  $V_o$  es el volumen de la fase orgánica,  $V_{ac}$  es el volumen de la fase acuosa y  $V$  es la proporción de las fase  $V_o/V_{ac}$ .

Para incrementar el  $K_D$  pueden realizarse distintos cambios como son:

- a. Cambiar el solvente orgánico para incrementar la solubilidad del analito
- b. Si el analito es iónico o ionizable, su  $K_D$  puede ser incrementada suprimiendo su ionización para hacer más soluble a este en la fase orgánica. Este tipo de analito también puede ser extraído por la formación del par iónico.
- c. Iones metálicos pueden ser complejados con agentes complejantes hidrofóbicos.
  - a. Se puede agregar sales, lo que disminuye la concentración del analito en la fase acuosa. (esto último se debe a la adición de sales neutras o inertes a la fase acuosa)



Para extracciones simples, el  $K_D$  debe ser grande, porque esta debe ser cuantitativa y para que esta lo sea debe separarse el 99% del soluto, lo que ocasiona que la mayoría de las veces se requieran más de una extracción; con extracciones múltiples se puede lograr esta premisa.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación de los métodos analíticos asegura que el método utilizado para la determinación de uno o mas compuestos sirve para el fin que fue diseñado. Existen diversos tipos de métodos analíticos, mismos que estarán en función de la actividad que se desea realizar. Se pueden generalizar cuatro tipos de métodos analíticos a validar; podemos encontrar los que sirven como pruebas de identificación , los de pruebas para cuantificar impurezas, pruebas limite de control de impurezas y finalmente las pruebas de cuantificación de fármacos o medicamentos.

Dentro de los procesos de cuantificación se pueden distinguir aquellos métodos analíticos que son utilizados para la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en una matriz biológica pudiendo ser plasma, suero, orina, etc., siendo estos denominados métodos bioanalíticos. Estos métodos son utilizados en estudios de farmacología clínica, biodisponibilidad y bioequivalencia que requieren evaluación farmacocinética.

En proyecto CAMINA, un centro de investigación en el cual sus líneas de investigación están enfocadas a contribuir en el conocimiento para la curar de la parálisis, y las afecciones que pueden derivar de ésta, se desarrollan estudios de la influencia de la lesión medular sobre las alteraciones farmacocinéticas de los fármacos como una de sus líneas de investigación con la finalidad de ser un indicativo para la optimización en farmacoterapia de pacientes con lesión medular.



En la actualidad se plantea el estudio de la posible alteración farmacocinética de un analgésico no esteroideo (acetaminofén) en diferentes estadios de la lesión traumática de la médula espinal (agudo, subagudo, crónico), en primates no humanos (Mono Rhesus *macaca mulatta*), por lo que se requiere que el método analítico por CLAR para la cuantificación del fármaco de interés (acetaminofén) sea validado para asegurar que los resultados de concentraciones plasmáticas determinados sean seguros y confiables para la interpretación correcta en los estudios farmacocinéticos a realizar.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

Validar el método analítico para la cuantificación de acetaminofén en plasma de primate no humano.

### Objetivos Particulares

I. Establecer la adecuabilidad del sistema para la cuantificación de acetaminofén en plasma de primate no humano.

II. Demostrar que el método empleado para la determinación del acetaminofén es selectivo .

III. Establecer el rango lineal, la exactitud, repetibilidad y reproducibilidad del método para el analito de interés, en la matriz biológica empleada (plasma de primate).

IV. Evidenciar la utilidad del método analítico para determinar cuantitativamente Acetaminofén en plasma de primate no humano.

## V. HIPÓTESIS

Al realizar los parámetros de validación que marca la NOM-177-SSA1-1998 , que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Se cumplirá con la normatividad vigente, que se establece que todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas de un estudio de bioequivalencia deben ser validados en el sitio de análisis, además de que los resultados obtenidos en la cuantificación de acetaminofén en plasma de primate no humano, contara con el respaldo científico que avalará la autenticidad y seguridad en la obtención de los resultados reportados en la investigación realizada en el Centro de Investigación CAMINA.

## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1 Material

- Vasos de precipitado de 250 ml.
- Matraces volumétricos de 10 y 250 y 1000 ml.
- Espátula
- Probetas graduadas de 500 y 1000 ml.
- Cronómetro
- Tubos eppendorf
- Papel glassine
- Frascos de plástico de 20 ml.
- Jeringas de 10 ml
- Tubos de Cónicos de 13 X 18 cm.
- Gradilla
- Micropipetas de 500 y 1000  $\mu$ L.
- Puntas para pipeta micropipeta.

### 6.2 Equipos e Instrumentos

- Balanza analítica Ohaus.
- Equipo desionizador de agua System MILLI-Q water MILLIPORE
- Equipo de filtración MILLIPORE
- Cromatógrafo de líquidos Waters
  - Detector waters 486
  - Bomba waters 510
  - Inyector manual
- Membranas de filtración Millipore de 0.45  $\mu$  de tamaño de poro
- Bomba para vacío.
- Parrilla de agitación (vortex).
- Centrifuga Fisher Scientific Marathon 26 KM.
- Columna Symetry C<sub>18</sub> 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 5  $\mu$ m.

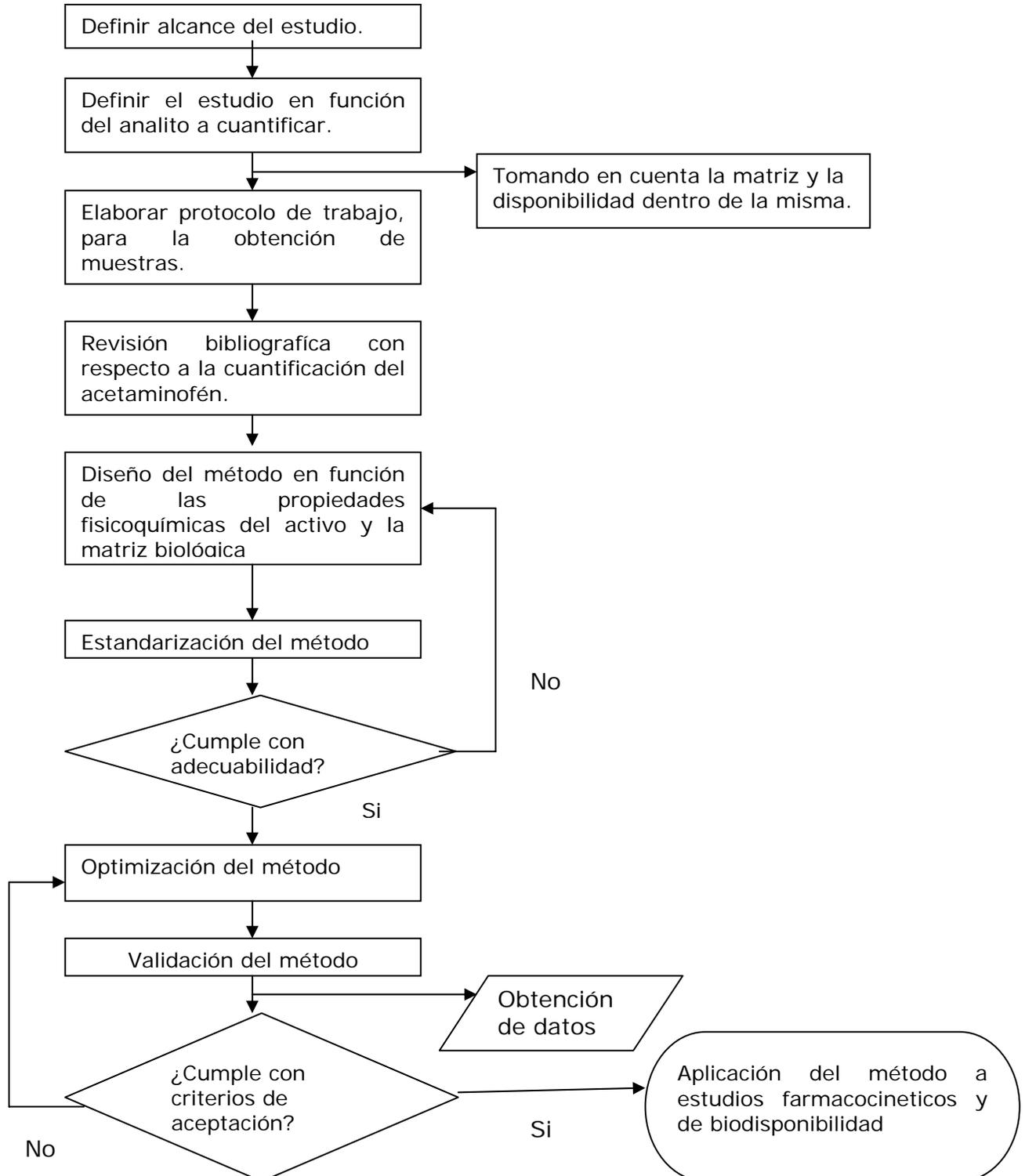
### 6.3 Reactivos

- Acetonitrilo J.T. Baker lote Y46C72
- Acetaminofén . Polvo USP lote 6088903 A782. Helm de México
- Fenacetina, lote 04-02-6017.SIGMA
- Hidróxido de Sodio. Lentejas. Lote 90525Merck
- Agua destilada y desionizada.
- Metanol JT Baker grado HPLC, Lote A27C21
- Acetato de Etilo JT Baker Lote Y46C72
- Soluciones Amortiguadoras de fosfatos pH 4.0 y 7.0
- Plasma de primate no humano.

## 6.4 Parte Experimental

### 6.4.1 Método Analítico

#### 6.4.1 DIAGRAMA DE FLUJO



#### **6.4.1.2 Sistema Cromatográfico.**

Columna Symetry C<sub>18</sub> 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 5 µm.

Longitud de onda 254 nm.

Velocidad de flujo 1.5 mL/min

Volumen de inyección 20 µL.

#### **6.4.1.3 Fase Móvil.**

Se preparo una mezcla de Fosfato de Amonio 0.005 M-Acetonitrilo en una proporción de 70:30 (v/v), pH de 7.5.

Preparándose primero la solución de fosfato de amonio a la que se le adiciono el acetonitrilo para obtener la fase móvil en su proporción adecuada, el pH se ajusto con una solución 4M de Hidróxido de Sodio.

#### **6.4.1.4 Preparación de las Soluciones de Referencia.**

- a) Solución madre. Acetaminofén 1000 µg/mL :Se pesaron 25 mg de Acetaminofén y se llevo a un matraz volumétrico de 25 mL se disolvió y aforo con agua destilada y desionizada. Para obtener una concentración de 1000 µg/mL.
- b) Solución Estándar Interno. Fenacetina 1000 µg/mL :Se pesaron 25 mg de Fenacetina y se llevo a un matraz de 25 mL, se disolvió y aforo con metanol. Esta solución tiene una concentración de 1000 µg/mL.

#### **6.4.1.5 Curva de Calibración.**

A partir de las soluciones de referencia se obtuvieron soluciones que contenían 3,5,10,20,40 y 85  $\mu\text{g/mL}$  de Acetaminofén y 100  $\mu\text{g/mL}$  de Fenacetina como estándar interno.

#### **6.5 Validación del Método Analítico.**

##### **6.5.1 Linealidad del sistema.**

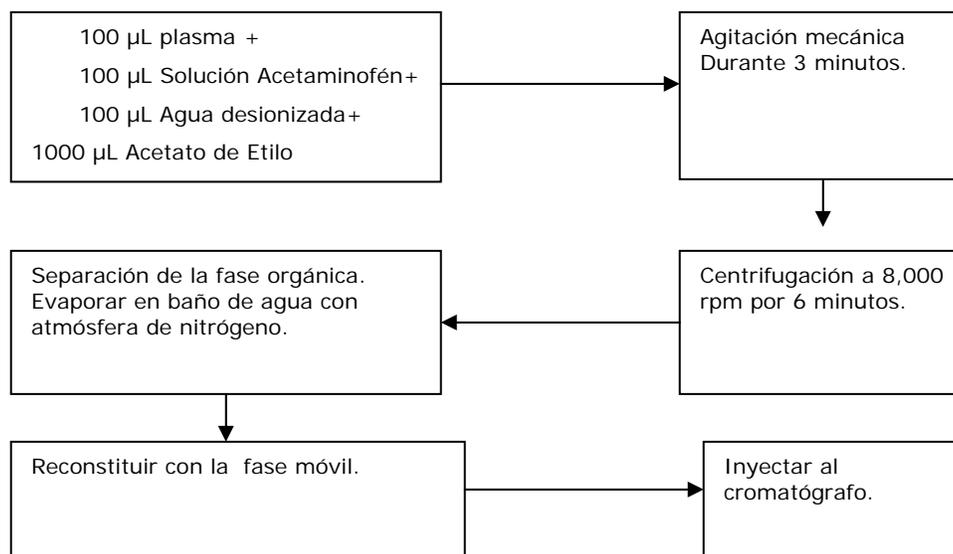
Se preparo una curva de calibración con seis niveles de concentración de Acetaminofén (3,5,10,20,40 y 85  $\mu\text{g/mL}$ ) por triplicado. Las soluciones se inyectaron directamente al cromatógrafo y se analizaron bajo las condiciones operacionales descritas en el apartado 6.4.1.1.

##### **6.5.2 Selectividad.**

Se obtuvo plasma de seis primates y cada uno fue analizado para determinar posibles interferencias en el tiempo de retención, de la señal de interés por compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante

##### **6.5.3 Linealidad del Método**

La linealidad se realizó con los seis niveles de concentración propuestos por quintuplicado, utilizando la matriz biológica (plasma de primate no humano). El procedimiento se ilustra en la siguiente figura.



**Figura 7.** Procedimiento para linealidad del método.

#### 6.5.4 Límite de Cuantificación.

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración (3.0 µg/mL), se consideró que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.<sup>(1,5)</sup>

#### 6.5.5 Limite de Detección

Se analizaron por duplicado concentraciones de Acetaminofén por debajo del límite de cuantificación establecido (2.5, 2, 1.5 y 1.0 µg/mL).<sup>(1,5)</sup>

## **6.5.6 Precisión del Método**

### **6.5.6.1 Repetibilidad.**

Se analizó en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas como baja, media y alta del compuesto por analizar en la matriz biológica, las concentraciones correspondieron a 4.0, 15.0 y 62.5 µg/mL.

### **6.5.6.2 Reproducibilidad Intralaboratorio**

Se realizó el análisis por duplicado durante tres días, de las concentraciones baja, media y alta (4.0, 15.0 y 62.5 µg/mL).

### **6.5.6.3 Exactitud**

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se obtuvo el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración y se comparo contra su valor nominal.

### **6.5.6 Estabilidad de la Muestra.**

La estabilidad fue evaluada como a continuación se indica.

#### **6.5.6.1 Ciclos de Congelación-Descongelación.**

Se prepararon muestras por triplicado de las concentraciones baja y alta (4.0 y 62.5 µg/mL) en la matriz biológica, se congelaron a -20°C por 24 horas, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se

repitió el congelamiento-descongelamiento bajo las mismas condiciones dos veces más para que en el tercer ciclo después de descongelar las muestras a temperatura ambiente se analizaran éstas y una curva de calibración por triplicado preparada recientemente.

#### **6.5.6.2 Estabilidad a Largo Plazo.**

Se prepararon muestras por triplicado al nivel alto y bajo de concentración de Acetaminofén (4.0 y 62.5 µg/mL), se congelaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron y analizaron conjuntamente con una curva de calibración recientemente preparada a las 24 horas, 7, 14 y 28 días.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 PARAMETROS DEL SISTEMA

#### 7.1.1 Linealidad del Sistema

En la tabla 7.1 y 7.2, donde se presentan la relación del alturas obtenidas para el intervalo de concentraciones de 3 a 85.0  $\mu\text{g/mL}$ , el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el error debido a la regresión ( $S_{y/x}$ ) y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración. En la figura 7.1 se puede observar la grafica que muestra la relación lineal para el sistema en la determinación de acetaminofén en plasma no humano.

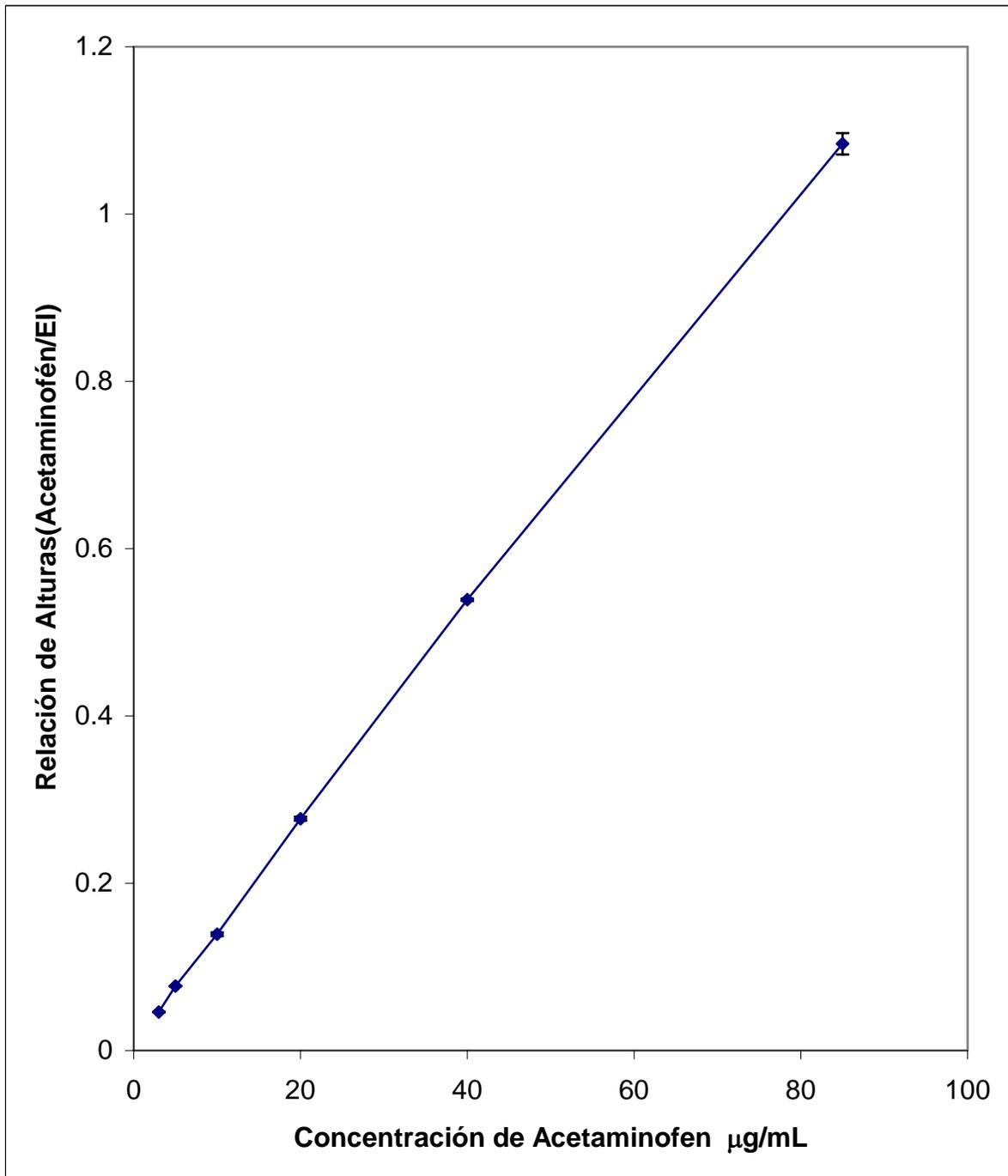
**Tabla 7.1.** Curvas de Linealidad para Acetaminofén  
(Concentración de Acetaminofén en  $\mu\text{g/mL}$  vs Relación de Alturas)

$\mu\text{g/mL}$	Relación Alturas	Relación Alturas	Relación Alturas	Promedio	%CV
3	0.046	0.045	0.046	0.046	1.011
5	0.078	0.077	0.077	0.077	1.103
10	0.136	0.140	0.140	0.139	1.349
20	0.278	0.275	0.280	0.277	0.845
40	0.541	0.538	0.539	0.539	0.269
85	1.093	1.070	1.091	1.084	1.174

**Tabla 7.2.** Parámetros de Linealidad del Sistema para Acetaminofén

Parámetros	Resultado	Especificación
$r^2$	0.9991	$\geq 0.99$
$S_{y/x}$	0.0121	$\leq 2.0$
CV	*	$\leq 2.0$

\* Los valores se observan para cada nivel de concentración en la tabla 7.1.



**Figura 7.1.** Grafica promedio de la linealidad del sistema para la determinación de Acetaminofén en plasma de primate no humano, en un intervalo de 3 a 85 µg/mL. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones +/- su desviación estándar.

## 7.1.2 Precisión del Sistema

Los resultados para la precisión del sistema se observan en la tabla 7.3.

**Tabla 7.3.** Precisión del sistema. Determinación de Acetaminofén en plasma de primate no humano.

Precisión del Sistema. Acetaminofén	
µg/mL	Relación de Alturas (Acetaminofén/EI)
10	0.1406
10	0.1394
10	0.1422
10	0.144
10	0.1391
10	0.1403
Promedio	0.1409
S	0.0018
C.V.	1.3173
Especificación CV ≤ 2.0	

## 7.2 PARAMETROS DEL MÉTODO

### 7.2.1 Selectividad

El análisis de muestras blanco de plasma de primate no humano no presento interferencia alguna por componentes provenientes de la matriz como se observa en las siguientes figuras , donde se presentan los cromatogramas típicos obtenidos de una muestra blanco (sin fármaco), una matriz cargada con Acetaminofén (20µg/mL) y una con estándar interno (Fenacetina 100µg/mL).

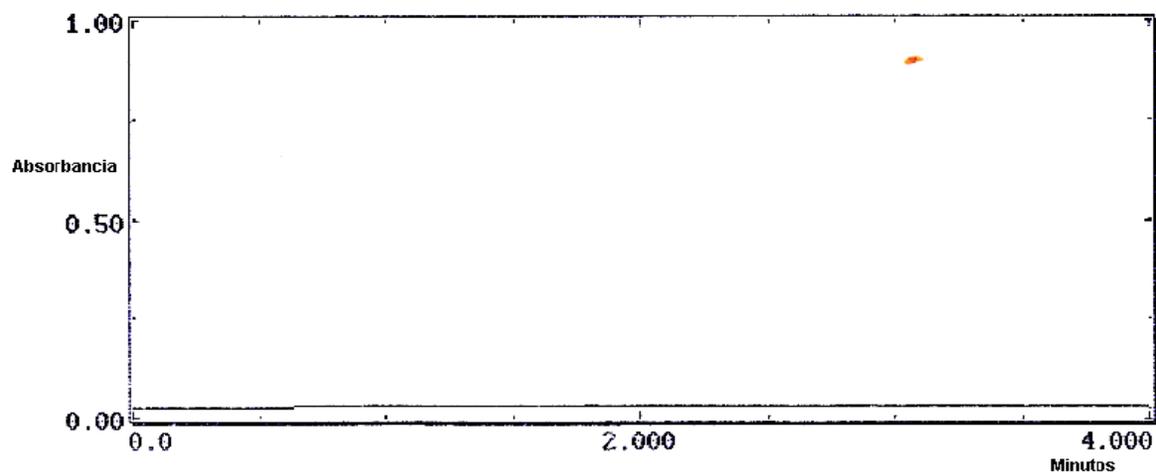


Figura 7.2. Cromatograma de la muestra blanco (plasma de primate no humano).

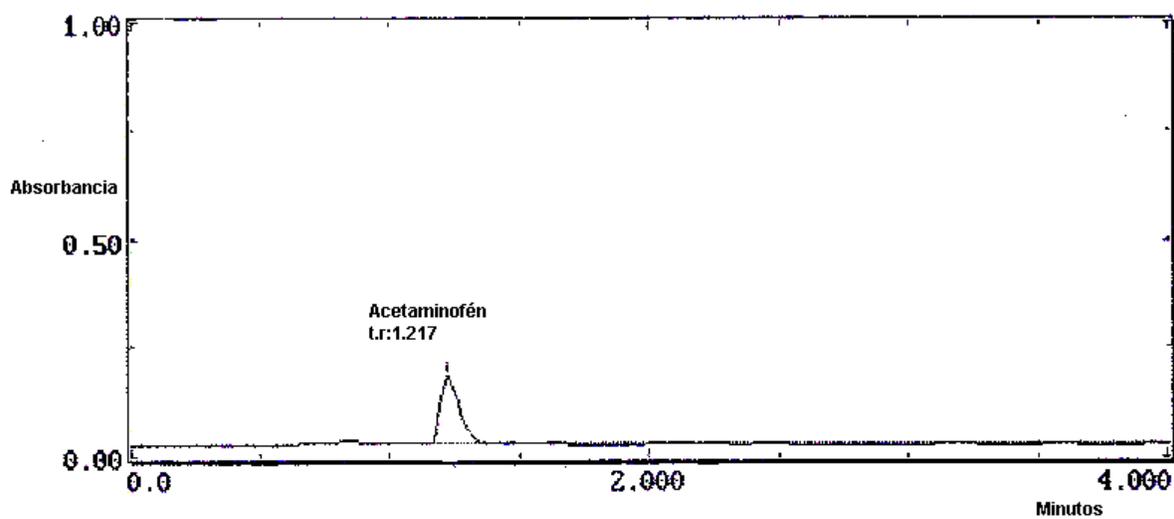


Figura 7.3. Cromatograma de la muestra de Acetaminofén en una concentración de 20 µg/mL (plasma de primate no humano).

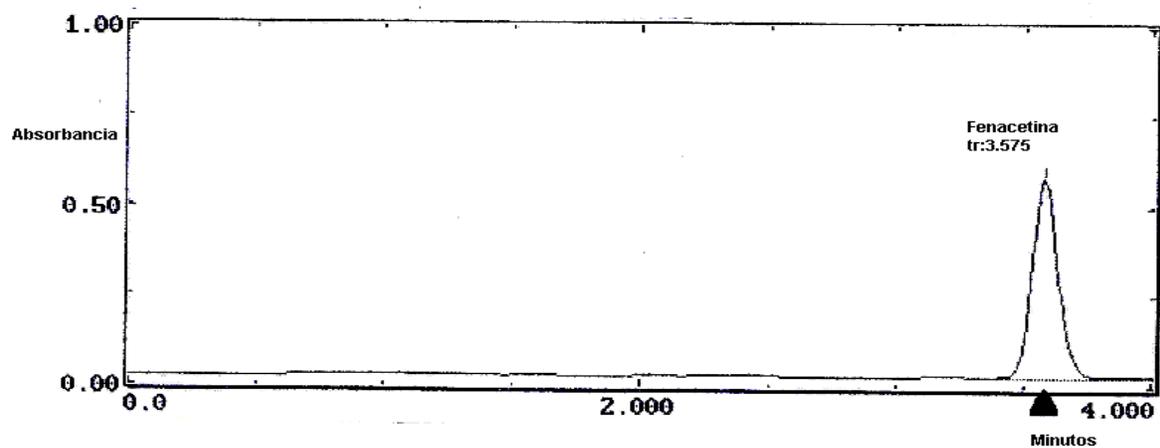


Figura 7.4. Cromatograma de la muestra de Fenacetina en una concentración de 100 µg/mL (plasma de primate no humano).

## 7.2.2 Linealidad del Método

La proporcionalidad entre las concentraciones de Acetaminofén y la respuesta medida (relación de alturas) se presentan en la tabla 7.4 y de forma grafica en la figura 7.5, los resultados cumplieron con los criterios de la linealidad del método (tabla 7.5).

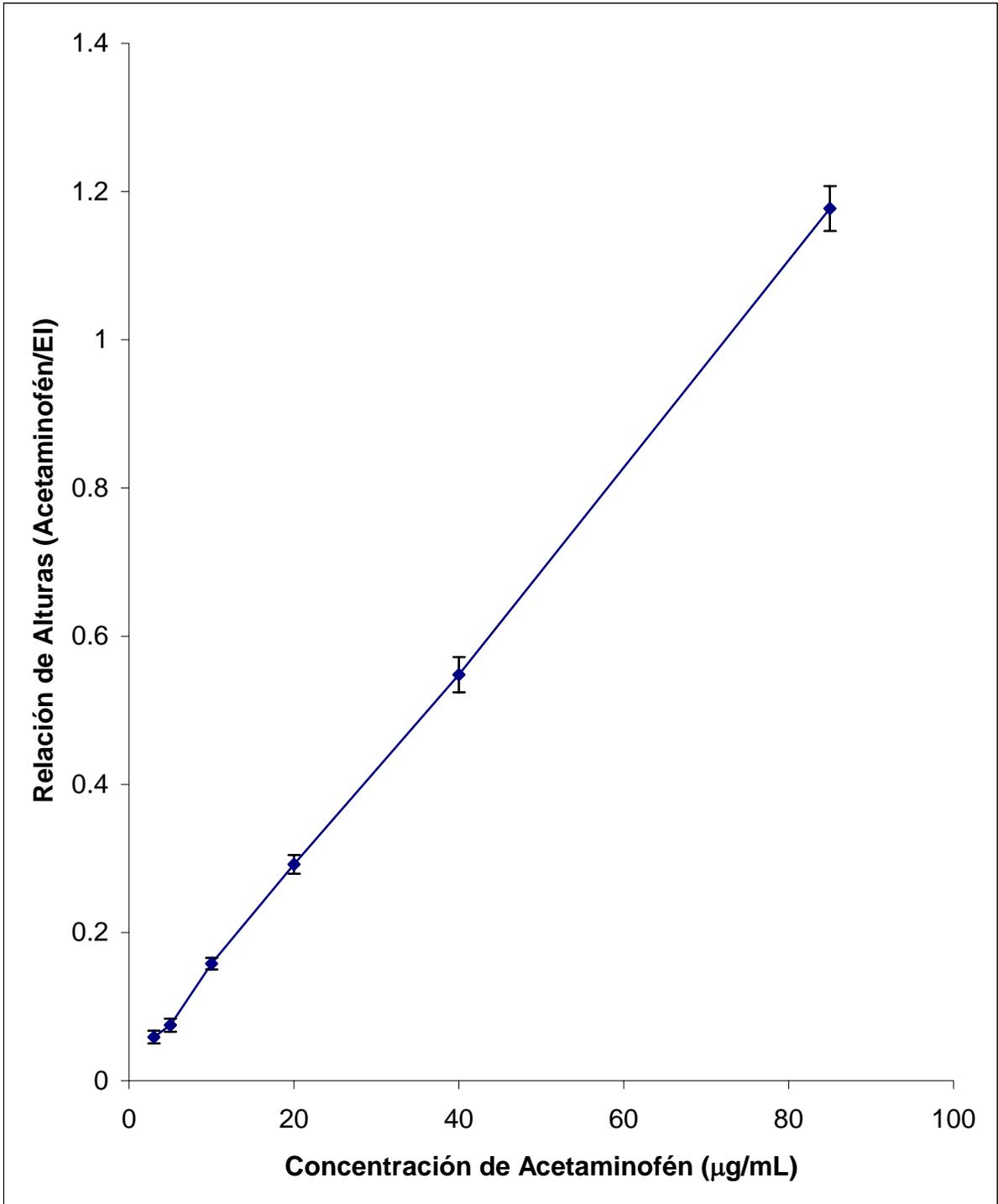
**Tabla 7.4.** Curvas de Linealidad para Acetaminofén  
(Concentración de Acetaminofén en  $\mu\text{g/mL}$  vs Relación de Alturas)

$\mu\text{g/mL}$	Relación de Alturas	Promedio	%CV*				
3	0.069	0.058	0.066	0.054	0.048	0.059	14.498
5	0.075	0.088	0.071	0.079	0.064	0.075	11.693
10	0.150	0.159	0.157	0.170	0.152	0.158	4.936
20	0.284	0.308	0.285	0.303	0.280	0.292	4.311
40	0.534	0.556	0.544	0.585	0.523	0.548	4.320
85	1.180	1.226	1.177	1.159	1.146	1.177	2.580

**Tabla 7.5.** Parámetros de Linealidad del Método para Acetaminofén

Parámetro	Resultado	Especificación
$r^2$	0.9997	$\geq 0.98$
%CV	*	$\leq 15\%$ y $\leq 20\%$ en el nivel de concentración mas bajo.
Ecuación de la Recta		
$y = 0.0136x + 0.015$		

\* Los valores se observan para cada nivel de concentración en la tabla 7.4.



**Figura 7.5.** Grafica promedio de la linealidad del método para la determinación de Acetaminofén en plasma de primate no humano, en un intervalo de 3 a 85 µg/mL. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones +/- su desviación estándar.

## 7.2.3 PRECISION DEL MÉTODO

### 7.2.3.1 Repetibilidad

Los resultados para la precisión del método en términos de repetibilidad evaluado a tres niveles de concentración se observan en la tabla 7.6, donde en ningún nivel de concentración el por ciento de coeficiente de variación obtenido fue mayor al 15%.

**Tabla 7.6.** Repetibilidad del método. Determinación de Acetaminofén en plasma de primate no humano.

Conc. Adicionada en $\mu\text{g/mL}$ Teórica	Conc. Recuperada $\mu\text{g/mL}$	Promedio	% CV*				
4	3.709	3.630	3.710	3.660	3.565	3.655	1.656
15	12.816	12.911	13.382	12.889	12.786	12.957	1.875
62.5	64.772	64.911	64.838	64.058	63.397	64.395	1.016

\* El valor de aceptación para esta prueba es que el CV sea  $\leq 15\%$ , para todos los niveles de concentración.

### 7.2.3.2 Reproducibilidad

La precisión del método en términos reproducibilidad evaluada a tres niveles de concentración en tres días diferentes evidencio un por ciento de coeficiente de variación mucho menor al 15% establecido como criterio de aceptación.

**Tabla 7.7.** Reproducibilidad del método. Resultados de la determinación de Acetaminofén en plasma de primate.

Dic de Análisis	Conc. Acetaminofén ( $\mu\text{g/mL}$ ) 4.0	Conc. Acetaminofén ( $\mu\text{g/mL}$ ) 15.0	Conc. Acetaminofén ( $\mu\text{g/mL}$ ) 62.5
1	3.615	15.450	62.278
	3.740	15.377	62.262
2	3.882	14.713	62.344
	3.599	14.745	62.295
3	3.699	16.295	62.426
	3.608	17.090	62.385
Promedio	3.690	15.611	62.331
Desviación Estándar	0.109	0.926	0.064
%CV	2.975	5.933	0.103
El Criterio de Aceptación es que el CV sea $\leq 15\%$			

### 7.2.3.3 Exactitud

La exactitud intra-día y entre días determinada con concentraciones baja, media y alta ( 4, 5 y 62.5 µg/mL) de Acetaminofén se presentan en las tablas 7.8 y 7.9 respectivamente.

**Tabla 7.8.** Resultados para exactitud de los datos de repetibilidad de la determinación de Acetaminofén en plasma de primate.

Conc. Determinada. Acetaminofén µg/mL	Conc. Determinada. Acetaminofén µg/mL	% Recuperado
4	3.709	92.738
4	3.630	90.772
4	3.710	92.757
4	3.660	91.507
4	3.565	89.136
15	12.816	85.441
15	12.911	86.078
15	13.382	89.215
15	12.889	85.931
15	12.786	85.245
62.5	64.772	103.635
62.5	64.911	103.858
62.5	64.838	103.741
62.5	64.058	102.494
62.5	63.397	101.435
El criterio de aceptación es que el % recuperado se encuentre entre 85-115 %, para todos los niveles de concentración.		

**Tabla 7.9.** Resultados para exactitud de los datos de reproducibilidad de la determinación de Acetaminofén en plasma de primate.

Día de Análisis	Conc. Acetaminofén (µg/mL) 4.0	%Exactitud	Conc. Acetaminofén (µg/mL) 15.0	%Exactitud	Conc. Acetaminofén (µg/mL) 62.5	%Exactitud
1	3.615	90.389	15.450	103.0	62.278	99.645
	3.740	93.524	15.377	102.513	62.262	99.619
2	3.882	97.069	14.713	98.087	62.344	99.750
	3.599	89.979	14.745	98.306	62.295	99.672
3	3.699	92.479	16.295	108.633	62.426	99.881
	3.608	90.204	17.090	113.934	62.385	99.816
Promedio	3.690	92.274	15.611	104.079	62.331	99.731
El criterio de aceptación es que el % recuperado se encuentre entre 85-115 %, para todos los niveles de concentración.						

## 7.2.4 Estabilidad de la Muestra

La estabilidad a largo plazo (1-28 días) y en tres ciclos de congelamiento-descongelamiento se presentan en las tablas 7.10 y 7.11 respectivamente. Los resultados obtenidos para ambas condiciones cumplieron con los criterios de precisión ( $\%CV \leq 15$ ) y exactitud (85-115% del valor nominal) requeridos para este parámetro.

**Tabla 7.10.** Estabilidad de Acetaminofén en muestras de plasma de primate (sin procesar) mantenidas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

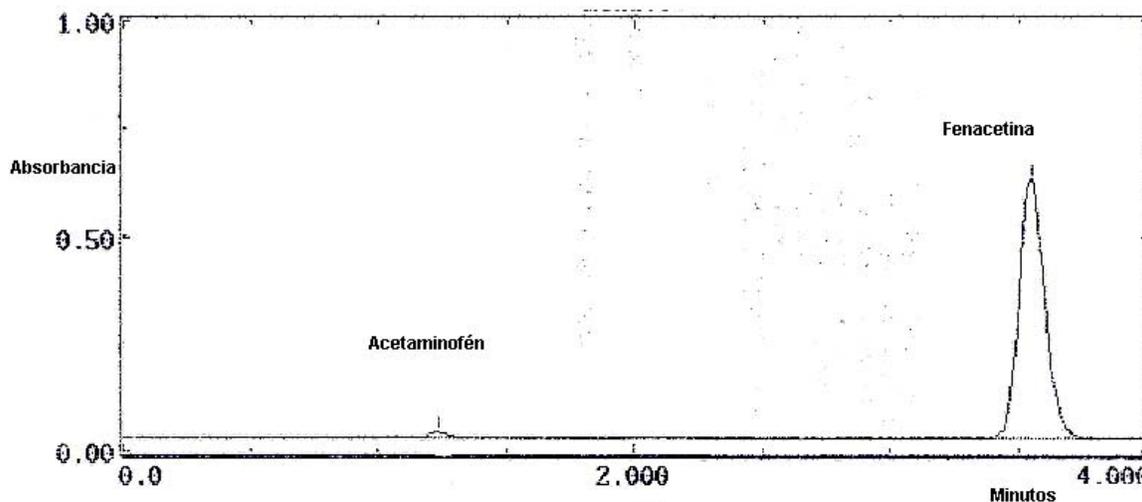
No. De Replica	Conc. Teórica Acetaminofén ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Conc. Inicial Acetaminofén ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Conc.a las 24 Hrs Acetaminofén en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Conc.a los 7 días Acetaminofén en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Conc.a los 14 días Acetaminofén en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Conc.a los 30 días Acetaminofén en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	4	3.879	3.806	3.731	3.558	3.464
2		3.616	3.780	3.702	3.550	3.459
3		3.900	3.552	3.672	3.541	3.452
	Promedio	3.798	3.712	3.7019	3.550	3.458
	(%)Exactitud	94.968	95.710	97.251	95.145	97.201
	% CV	4.174	3.767	0.8013	0.2383	0.1734
1	15	14.717	14.294	14.389	14.3661	14.257
2		14.625	14.551	14.567	14.3591	14.239
3		14.770	14.750	14.576	14.3521	14.179
	Promedio	14.704	14.531	14.511	14.3591	14.225
	(%)Exactitud	98.032	98.738	101.519	99.786	99.020
	% CV	0.498	1.572	0.7255	0.0490	0.2865
1	62.5	61.442	61.595	61.737	61.1971	60.125
2		61.038	61.286	61.483	61.0563	59.706
3		61.114	61.169	61.313	61.0352	59.646
	Promedio	61.198	61.350	61.511	61.0962	59.826
	(%)Exactitud	97.917	99.849	99.863	98.9616	97.759
	% CV	0.3512	0.3590	0.3467	0.1441	0.4362
*Los criterios de aceptación:						
Exactitud: 85-115 % para todos los niveles						
CV: $\leq 15\%$ para todos los niveles						

**Tabla 7.11.** Resultados del Ciclo de Congelación-Descongelación para la determinación de Acetaminofén en plasma de primate no humano.

Conc. Adicionada Acetaminofen ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Recuperada Acetaminofen ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Exactitud	%CV
4	3.421	85.539	2.437
4	3.422	85.571	
4	3.279	81.993	
15	15.745	104.967	6.498
15	16.908	112.723	
15	14.856	99.041	
62.5	60.640	97.024	2.252
62.5	63.013	100.820	
62.5	60.594	96.951	
*Los criterios de Aceptación:			
Exactitud: 85-115 % para todos los niveles			
CV: $\leq 15\%$ para todos los niveles			

### 7.2.5 Limite de Detección

Para este parámetro se determino que la señal mínima de detección se encuentra en una concentración de  $1.5 \mu\text{g/mL}$ , esto se puede observar en la figura 7.6.



**Figura 7.6.** Cromatograma de la muestra para el limite de detección del método donde el Acetaminofén esta en una concentración de  $1.5 \mu\text{g/mL}$  (plasma de primate no humano).

### 7.2.6 Limite de Cuantificación

Los resultados de este parámetro demostraron que el límite de cuantificación establecido en 3  $\mu\text{g/mL}$  cumple con los criterios de exactitud y precisión requeridos (ver tabla 7.12)

**Tabla 7.12.** Resultados para el limite de cuantificación de la determinación de Acetaminofén en plasma de primate.

Concentración Teórica Acetaminofén [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Concentración Recuperada Acetaminofén [ $\text{mg/ml}$ ]	Relación de Alturas . (Acetaminofén/EI)	%Exactitud
3	2.975	0.0413	99.197
3	3.173	0.0441	105.787
3	2.965	0.0412	98.837
3	2.880	0.0400	96.009
3	3.087	0.0429	102.911
3	2.917	0.0405	97.255
Promedio	3	0.0417	100
S	0.1101	0.0015	3.672
C.V.	3.672	3.672	3.672
*Los criterios de Aceptación:			
Exactitud: 85-115 % para todos los niveles			
CV: $\leq 15\%$ para todos los niveles			

## VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

### 8.1 Parámetros de Sistema

El cumplimiento de los parámetros del sistema linealidad ( $r^2$  mayor a 0.99) y precisión ( $\%CV \leq 2\%$ ) indica que la respuesta medida por el equipo (alturas de pico) para la determinación cuantitativa de acetaminofén sin interferencia por la matriz biológica ( plasma de primate no humano), se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso.

### 8.2 PARAMETROS DEL MÉTODO

#### 8.2.1 Selectividad

El método analítico presentado se considera selectivo para la cuantificación de Acetaminofén en plasma de primate no humano al no evidenciar interferencia por productos endogenos, metabolitos o fármaco concomitante tal como se presenta en las figuras 7.2 a 7.4. La resolución entre Acetaminofén y el estándar interno usado fue la adecuada para éste método cromatografico al presentar un valor de 2.358

#### 8.2.2 Linealidad del Método

El método analítico fue lineal en el rango de concentración estudiado (3.0 a 85.0  $\mu\text{g/mL}$ ) con un coeficiente de determinación mayor a 0.99 tal como se presenta en la figura 7.5, la curva de calibración tuvo una respuesta lineal del tipo  $y = a + bx$  (tabla 7.5), evidenciando la

proporcionalidad de los niveles de concentración de Acetaminofén en plasma no humano con respecto a la respuesta medida (relación de alturas : altura de pico de Acetaminofén/ altura de pico de estándar interno) según los resultados presentados en la tabla 7.4.

### **8.2.3 Precisión del Método**

#### **8.2.3.1 Repetibilidad**

La concordancia de los resultados experimentales obtenidos bajo las mismas condiciones de análisis a tres niveles de concentración reflejaron una alta precisión del método en términos de repetibilidad, al obtenerse coeficientes de variación menores al 2% en las concentraciones evaluadas (tabla 7.6), valores muy por debajo del criterio de aceptación requerido ( $\%CV \leq 15\%$ ). Indicando que los errores sistemáticos que pudieron presentarse en el desarrollo de la metodología analítica fueron controlados.

#### **8.2.3.2 Reproducibilidad**

La capacidad del método analítico propuesto para proporcionar resultados experimentales reproducibles cuando fue sometido con su aplicación rutinaria durante tres días expuso la reciprocidad obtenida entre las determinaciones independientes bajo la condición establecida en los niveles de concentración estudiados (tabla 7.7), al obtenerse coeficientes de variación no mayores al 6% y cumpliendo por lo tanto con el criterio de aceptación requerido y confirmando la precisión del método también en términos de reproducibilidad.

### **8.2.3.3 Exactitud**

Los resultados para la exactitud expresada como la concordancia que existe entre el por ciento de recobro experimental y el valor de referencia (nominal) obtenidos en los ensayos intra-día y entre-días (tablas 7.8 y 7.9) expresan la cercanía entre éstos valores, en todos los casos el por ciento de recobro se mantuvo dentro del intervalo del 85 al 115% tal como lo requiere el criterio de aceptación.

### **8.2.4 Estabilidad de la Muestra.**

El acetaminofén en plasma de primate no humano es estable y puede cuantificarse con precisión y exactitud hasta por 30 días siempre y cuando se resguarde a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; tal como puede observarse en los resultados de la tabla 7.10.

#### **8.2.4.1. Ciclos de Congelación- Descongelación**

La muestra biológica (plasma de primate no humano) que contiene acetaminofén, sometida a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento no mostró diferencia con respecto a su análisis inicial; indicando que ésta conservo sus características y es confiable la cuantificación del activo aun si fuera sometida a esta condición.

### **8.2.5 Limite de Detección**

La capacidad del método para detectar acetaminofén en plasma de primate no humano se determino como la concentración en la matriz

biológica que se detecto pero no cuantifico en términos de la respuesta analítica (pico cromatografico) observado en la figura 7.6.

### **8.2.6 Limite de Cuantificación**

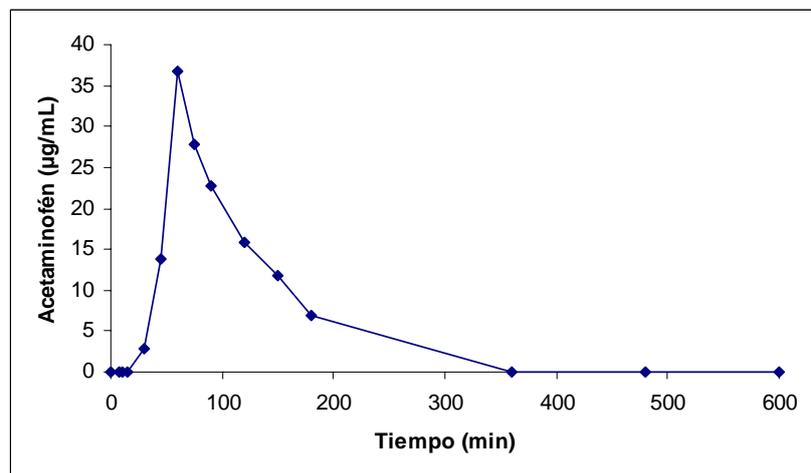
El método analítico es capaz de determinar acetaminofén en plasma de primate no humano en el punto mas bajo de la curva de calibración (tabla 7.12), pues se cumplen los criterios de precisión ( $CV \leq 155$ ) y exactitud (85-115% con respecto al valor nominal).

## IX. APLICACIÓN DEL MÉTODO

Con la finalidad de verificar la aplicación del método analítico a estudios farmacocinéticos se administró a un mono (mono rhesus, *macaca mulatta*) una dosis oral única de acetaminofén de 10mg/kg de peso; tomándose muestras de sangre a los 0 (antes de la administración), 7.5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 360, 480 y 600 minutos para definir un curso temporal de concentración plasmática contra tiempo que permitiera obtener los parámetros farmacocinéticos.

La figura 9.1 presenta el curso temporal en el que puede observarse claramente la fase de absorción, distribución y eliminación del fármaco administrado. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos son similares a los humanos, por lo tanto se evidencia la utilidad y aplicabilidad de la metodología analítica validada.

Tabla 9.1 Parámetros Farmacocinéticos de Acetaminofén en Plasma de Primate no Humano	
Parametro	Resultado
<i>C max.</i>	36.68 µg/mL
<i>T max</i>	60 minutos
<i>t<sub>1/2</sub></i>	52.410 min
<i>ABC</i>	3272.535µg*min/mL



**Figura 9.1.** Curso Temporal de Acetaminofén en Plasma de Primate no Humano, después de la administración una solución oral de 10 mg/kg de peso.

## IX. CONCLUSIONES

El método cromatográfico propuesto para la separación y cuantificación en muestras de plasma de primate no humano, cumple con los criterios de validación que son contemplados en la NOM-177-SSA1-1998, para métodos en fluidos biológicos. Es así que se asegura que el método analítico para determinar acetaminofén en plasma de primate no humano es selectivo y demás características que le confieren confiabilidad para la correcta determinación de acetaminofén en estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y/o bioequivalencia en primates no humanos.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
2. *ICH Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures* (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, March 1995, Geneva, Switzerland,).
3. *ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology* (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, May 1997, Geneva, Switzerland,).
4. Swartz M. E.( 1997). Analytical Method Development and Validation. USA.Marcel Dekker.3-25.
5. FDA (2001).Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research.
6. Michael Swartz and Ira Krull ( 2003) . Validation of Bioanalytical Methods —Highlights of FDA's Guidance Validation. LCGC North America. 21(2) :136-142.
7. Secretaria de Salud ( 2000). Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 7ª Ed. Editorial talleres gráficos de publicaciones e impresiones de calidad. México. Tomo I 226, 234-237,902,903.
8. Merck and Company (1996).The Merck Index. 12ª edition. Merck and Co. Inc USA. 6,7.
9. U.S. Pharmacopeia XXIII (1999). National Formulary 19. U.S.A. 16,17

10. Katzung B. (1991). Farmacología Básica y Clínica. Editorial El Manual Moderno, México. 381-386.
11. Bowman W. (1980). Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México .682-691.
12. Litter M.( 1986). Farmacología Experimental y Clínica. 7ª Edición. Librería " El Ateneo". Argentina .451-456.
13. Vademecum Farmacéutico.(2001.) Información Profesional Especializada. 10ª Ed. Rezza Editores, S.A. México .496-499.
14. Pyllis R.Brown (1990). High-Performance Liquid Chromatography. Past Developments. Present Status, and Future Trends. Analytical Chemistry.,62 (19) 995 A-1008 A.
15. Harris.(2002). Química Analítica Cuantitativa. Segunda Edición. Editorial Limusa. México. 692-728.
16. T. Hanai.( 1999). HPLC a Practical Guide. RSC Chromatography Monographs. USA . 2-45.
17. Weston A. (1997).HPLC and CE Principles and Practice.. Academic Press .USA. 88-120.
18. Scott P.W. (2002).Liquid Chromatography Theory. Marcel Dekker. USA. 3-83.
19. Haleem I. J.(2002). A Century of Separation Science. Marcel Dekker. USA. 4-29.
20. Willard E. (1983).Instrumental Methods of Analysis. 7ª edition .Marcel Dekker.USA. 626-629
21. Yost R.W., Etre L.S. and Conlon R.D.(1981). Introducción a la Cromatografía de Líquidos Práctica. Perkin-Elmer Corp. U.S.A. 17-57, 112-1154.
22. Snyder, L.R. and Kirkland.(1979). Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 125-234, 453-482.

23. Braithwaite A. (1999). Chromatographic Methods. 5<sup>a</sup> edition. Marcel Dekker. USA. 7-21, 362-388
24. George, L. (1998). HPLC Method for Pharmaceutical Analysis. A Wiley-Interscience Publication Volume 2. John Wiley & Sons INC. U.S.A. 1463-1473.
25. Runser D. J. (1981). Troubleshooting HPLC Systems. A User's Guide. Wiley and Sons. USA. 20-42.
26. Somenath Mitra and Roman Brukh. (2003). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons INC. USA . 3-15.
27. Ronald e. Majors. (2003). Trends in Sample Preparation. LCGC Europe USA.. 2-8
28. A.A.M. Stolker. (2002). Current Trends and Developments in Sample Preparation. National Institute of Public Health and the Environment. USA. 3-11.
29. Sadek P.C. (1996). The HPLC Solvent Guide. John Wiley & Sons INC. USA. 1-31, 205-335.
31. DeAntonis K. (2003). Handbook of Instrumental for Analytical Chemistry. John Wiley & Sons INC .USA. 17-33, 147-161.