



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

***DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN METÓDO ANALÍTICO
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TERBINAFINA
EN PLASMA HUMANO***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

VERÓNICA SÁNCHEZ SOLÍS





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.

Jurado Asignado

Presidente Inés Fuentes Noriega
Vocal Helgi Helen Jung Cook
Secretario Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
1er sup. Lauro Misael del Rivero Ramírez
2do sup. María de Lourdes Mayet Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Centro Analítico para Estudios Biofarmacéuticos

Asesor:

Helgi Helen Jung Cook


Sustentante:

Verónica Sánchez Solís


Dedicado a:

A **JESUCRISTO hijo de DIOS Topoderoso** mi **SEÑOR** y **SALVADOR** ¡ te amo ! tu eres mi todo, mi razón de ser y de existir, sin ti nada soy pero contigo todo lo puedo, eres maravilloso y hermoso mi Señor Jesús te amo y te amo, gracias por tu vida , por tu amor, por tu gran e inagotable misericordia y que decir de tu infinita gracia. A mis padres **ROSARIO** y **DAVID**, gracias por su amor, por sus consejos, por su animo, por su paciencia para conmigo y me siento muy orgullosa de pertenecer a la familia que ustedes formaron, su ejemplo me acompañará el resto de mis días, mamita te amo con todo mi corazón te admiro mucho, papito te amo mucho gracias por ser un buen ejemplo y ambos les agradezco por su arduo trabajo, mi vida sin ustedes tampoco seria nada, los amo, este triunfo también es suyo. A mi hermano **JUAN** que Dios te conceda lo que tu corazón anhela, nunca te olvides de Él, a mi cuñada **VALE**, animo flaquita Dios te fortalece y sustenta, te amo, a mis sobrinas más queridas **NANCY** y **VRIDIANA**, ternuritas esfuerzence mucho en los estudios y cuenten conmigo para todo, las amo mucho. A mi hermano **VIDAL**, flaco sus brazos están siempre abiertos para abrazarnos y consolarnos a pesar de lo que hacemos, esfuézzate y se valiente, **ANITA** te necesita como su cabeza, los amo que Dios los fortalezca a ambos en todo. A **GUSTAVO** el amor de mi vida, te amo mucho cariño y, agradezco a Dios el haberte enviado a mi vida, este tiempo que hemos estado juntos ha sido maravilloso y ahora me siento completa, hay un hermoso camino por recorrer y juntos será mas fácil por que mejor son dos que uno y cordón de tres dobleces no se rompe tan fácil.

Unas palabras para:

Mi amiga y hermana **Esme**, sabes que te amo y te deseo lo mejor en esta etapa de tu vida, besos al peque que viene en camino y a ti **Adán** para que sigas siendo sensible a la voz de Dios, pero también a la de tu esposa, besos a los dos. A **Joselina** y **Gustavo** bien hecho, su hijo es un excelente varón. A **Key** ya no te enojas tanto, te amo y sigue contando conmigo, a **Miriam** ¡tu puedes! así que sigue esforzándote. A mi abuelita **Candelaria**, que aunque ya no esta conmigo me dejo un hermoso tesoro a su hija, mi mamá, a mi abuelita **Lupe** la quiero mucho, a todas mis tías y tíos, primos y primas, sobrinos y sobrinas. A mis amigos y amigas. A **Levantare** que me ha sostenido, aunque yo no lo hubiese pedido, con sus oraciones gracias. A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por que en sus aulas viví momentos inolvidables y sus maestros me han llevado a una madurez tanto profesional como emocional, no me hubiese gustado estudiar en otro lugar y sustentaré con orgullo y trabajo tus colores y tus preceptos ¡gracias! A **CAEBIO** por apoyar a los estudiantes para concretar parte de su camino profesional, a todo su personal, Cuauthemoc, Rafael, Mario, Karina, Cindy, Noemí fue muy interesante conocerles y convivir con ustedes. Y a usted **Dra Helgi** por que sin conocerme creyó en mi ¡gracias! Y mi más sincero deseo para que su camino siga siendo tan prospero, pero más que algún día conozca de aquel que se dijo Yo soy el principio y el fin, el alfa y el omega.

Y para quien alguna vez lea esto le digo:

Teme a Dios, y guarda sus mandamientos; por que esto es el todo del hombre

(Eclesiastés 12:13)

MÉXICO, D. F.

2006

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES	
2.1 Monografía de Terbinafina	2
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	2
2.2 Farmacocinética.....	2
2.3 Farmacodinamia.....	5
2.4 Usos terapéuticos y dosis.....	6
2.5 Reacciones adversas.....	7
2.6 Métodos analíticos para la cuantificación de Terbinafina.....	7
2.7 Estudios de biodisponibilidad de Terbinafina.....	9
2.8 Normatividad mexicana para estudios de intercambiabilidad.....	10
2.9 Validación de métodos bioanalíticos.....	10
2.10 Fundamentos de espectrometría de masas.....	13
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Reactivos material y equipo.....	21
3.2 Preparación de soluciones.....	22
3.3 Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control de Terbinafina.....	23
3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	26
3.5 Condiciones cromatográficas.....	26
3.6 Validación del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	27
3.6.1 Selectividad.....	27
3.6.2 Supresión iónica.....	27
3.6.3 Linealidad.....	28
3.6.4 Recobro absoluto.....	28
3.6.5 Precisión.....	29

ÍNDICE

3.6.5.1 Repetibilidad.....	29
3.6.5.2 Reproducibilidad.....	29
3.7 Exactitud.....	30
3.8 Límite de cuantificación.....	30
3.9 Estabilidad.....	31
3.9.1 Estabilidad a largo plazo.....	31
3.9.2 Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación.....	31
3.9.3 Estabilidad a temperatura ambiente (corto plazo).....	32
3.9.4 Estabilidad de la muestra procesada.....	33
3.10 Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos.....	34
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1 Tiempos de retención de Terbinafina y Naftifina.....	35
4.1.1 Selectividad.....	35
4.2 Linealidad.....	38
4.3 Recobro.....	39
4.4 Precisión.....	39
4.5 Exactitud.....	40
4.6 Límite de cuantificación.....	41
4.7 Estabilidad.....	42
4.8 Supresión iónica.....	45
4.9 Estudio preliminar de farmacocinética de Terbinafina en voluntarios sanos.....	46
5. CONCLUSIONES.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Concentraciones promedio de Terbinafina en distintos tejidos (mg/Kg).....	3
Tabla 2. Esquema de preparados, dosis y vías de administración.....	7
Tabla 3. Diluciones de Terbinafina en solución diluyente metanol-agua (50:50).....	24
Tabla 4. Curva de calibración y puntos control en solución metanol-agua (50:50).....	25
Tabla 5. Curva de calibración de Terbinafina y puntos control en plasma.....	25
Tabla 6. Selectividad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina.....	37
Tabla 7. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	38
Tabla 8. Porcentaje de recobro de Terbinafina.....	39
Tabla 9. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	40
Tabla 10. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	40
Tabla 11. Exactitud del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	41
Tabla 12. Exactitud del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en diferentes días.....	41
Tabla 13. Límite de cuantificación.....	42
Tabla 14. Estabilidad de Terbinafina en plasma en congelación.....	43
Tabla 15. Estabilidad de Terbinafina en ciclos de congelación-descongelación.....	43
Tabla 16. Estabilidad de Terbinafina a temperatura ambiente.....	44
Tabla 17. Estabilidad de muestra procesada en el automuestreador.....	44
Tabla 18. Valores individuales de concentración de Terbinafina en plasma (ng/mL) después de la administración de una dosis oral única de 250 mg a 10 voluntarios sanos.....	47
Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos de Terbinafina después de la administración de una dosis oral única de 250 mg a 10 voluntarios sanos.....	47

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Vía metabólica propuesta para la Terbinafina. N-desmetilterbinafina (D), hidroxiterbinafina (OL), desmetilhidroxiterbinafina (DOL), carboxiterbinafina (CA).....	4
Figura 2. Mecanismo de acción de la Terbinafina sobre la biosíntesis del ergosterol.....	5
Figura 3. Mecanismo fungistático y fungicida de la Terbinafina.....	6
Figura 4. Esquema general de una ionización por electrospray.....	15
Figura 5. Proceso de ionización por electrospray.....	16
Figura 6. Analizador de masas del tipo Quadrupolo.....	18
Figura 7. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Terbinafina.....	35
Figura 8. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Naftifina.....	36
Figura 9. Cromatograma de la muestra blanco del voluntario 4.....	36
Figura 10. Cromatograma de la muestra blanco del voluntario 4.....	37
Figura 11. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.....	38
Figura 12. Supresión iónica.....	45
Figura 13. Valores promedio de concentración plasmática vs tiempo ($\pm ee$) después de la administración de 250 mg de Terbinafina a 10 voluntarios sanos.....	46

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son un grupo de enfermedades causadas por hongos que afectan la queratina de la piel y/o las mucosas. Las dermatofitosis o tiñas son las más frecuentes las cuales son producidas por hongos queratinofílicos denominados dermatofitos pertenecientes a tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Estos padecimientos son cosmopolitas debido a que los hongos causantes de los mismos se encuentran distribuidos en todo el globo terráqueo, por lo que representan un problema importante de salud pública, con la agravante que implica su presencia en pacientes inmunocomprometidos.

La Terbinafina es un agente antimicótico relativamente reciente, de la clase de las alilaminas, que se utiliza para el tratamiento de las micosis superficiales y que ha demostrado ser más efectiva que la griseofulvina, con períodos más cortos en el tratamiento (vía oral o tópica). Además presenta un perfil de seguridad adecuado y pocas interacciones con otros fármacos.

Dado que la Terbinafina es un fármaco relativamente nuevo, existe poca información acerca de su farmacocinética y biodisponibilidad, por lo que se llevó a cabo el presente trabajo, cuyo objetivo fue desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma humano, utilizando para ello Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tandem (LC/MS/MS).

GENERALIDADES

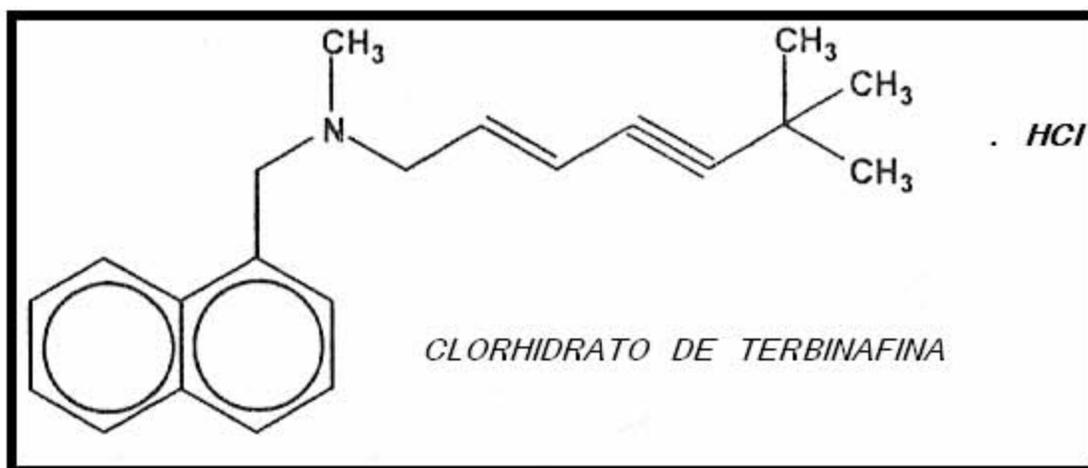
2.1 Monografía de Terbinafina

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

Fórmula molecular: $C_{21}H_{25}N$ como clorhidrato: $C_{21}H_{25}N.HCl$

Peso molecular: 291.43 g/mol

Nombres químicos: N-[(2E)+6,6-dimetil-2-hepteno-4inil]-N-metil-1-naftalenometanamina; trans-N-metil-n-(1-naftilmetil)-6,6-dimetilhept-2-en-4-inil-amina;(E)-N-(6,6-dimetil-2-hepten-4-inil)-N-metil-1-naftalenmetanamina.



Descripción: polvo blanco cristalino fino.

Punto de fusión: 195-198 °C.

Solubilidad: muy soluble en metanol y cloruro de metileno, soluble en etanol y ligeramente soluble en agua (1).

2.2 Farmacocinética

Después de la administración oral de 250 mg de Terbinafina ésta se **absorbe** adecuadamente en el tracto gastrointestinal en un porcentaje mayor al 70%. Como resultado del efecto de primer paso, la **biodisponibilidad** se reduce a un 40%(16). Los alimentos no afectan la absorción. La concentración máxima se alcanza a las 2h, siendo de 0.8 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (18).

Por ser altamente lipofílica la Terbinafina se **distribuye** extensamente en tejidos, de manera que después de su administración oral se encuentran altas concentraciones en tejido adiposo, estrato corneo, dermis, epidermis y uñas. La *tabla 1* muestra las concentraciones promedio por tejido (mg/Kg) después de la administración de Terbinafina a 250mg/día durante 12 días (18).

Tabla 1. Concentraciones promedio de Terbinafina en distintos tejidos (mg/Kg).

	Día 2	Día 6	Día 12
Estrato corneó	0.9	2.8	9.1
Epidermis/dermis	0.1	0.2	0.4
Tejido adiposo	38.2	43.1	39.1
Uñas	0.25-0.55	–	–

La **biotransformación** de la Terbinafina se lleva a cabo principalmente en el hígado (18). Siete isoenzimas CYP están involucradas en el metabolismo de la Terbinafina. Los metabolitos de la Terbinafina, no presentan actividad antifúngica, y se forman por cuatro principales rutas: una N-desmetilación mediada por CYP2C9, CYP2C8 y CYP1A2, una deaminación por CYP3A4, una alquil oxidación de la cadena lateral por CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 y la formación de dihidrodioles por CYP2C9 y CYP1A2. Las isoenzimas más importantes son: CYP2C9, CYP1A2 y CYP3A4 (19). De la N-desmetilación se producen los metabolitos N-desmetilterbinafina (**D**), desmetilhidroxiterbinafina (**DOL**), y un dihidrodiol (**D-DHDs**); la deaminación forma al 1-naftaldehído (**NAL**) que por oxidación forma el ácido 1-naftoico (**NA**) y por reducción el 1-naftalenmetanol (**NM**); la alquil oxidación de la cadena lateral por la hidroxilación del grupo terbutil forma los hidroxiterbinafina (**OL**) y desmetilhidroxiterbinafina (**DOL**) cuya oxidación posterior forma el ácido carboxílico; y finalmente la formación de óxido arenos seguida por una rápida hidrólisis para formar los dihidrodioles **DHD** y **D-DHDs**. La *figura 1* muestra las posibles rutas biotransformación de la Terbinafina en microsomas de hígado humano (19).

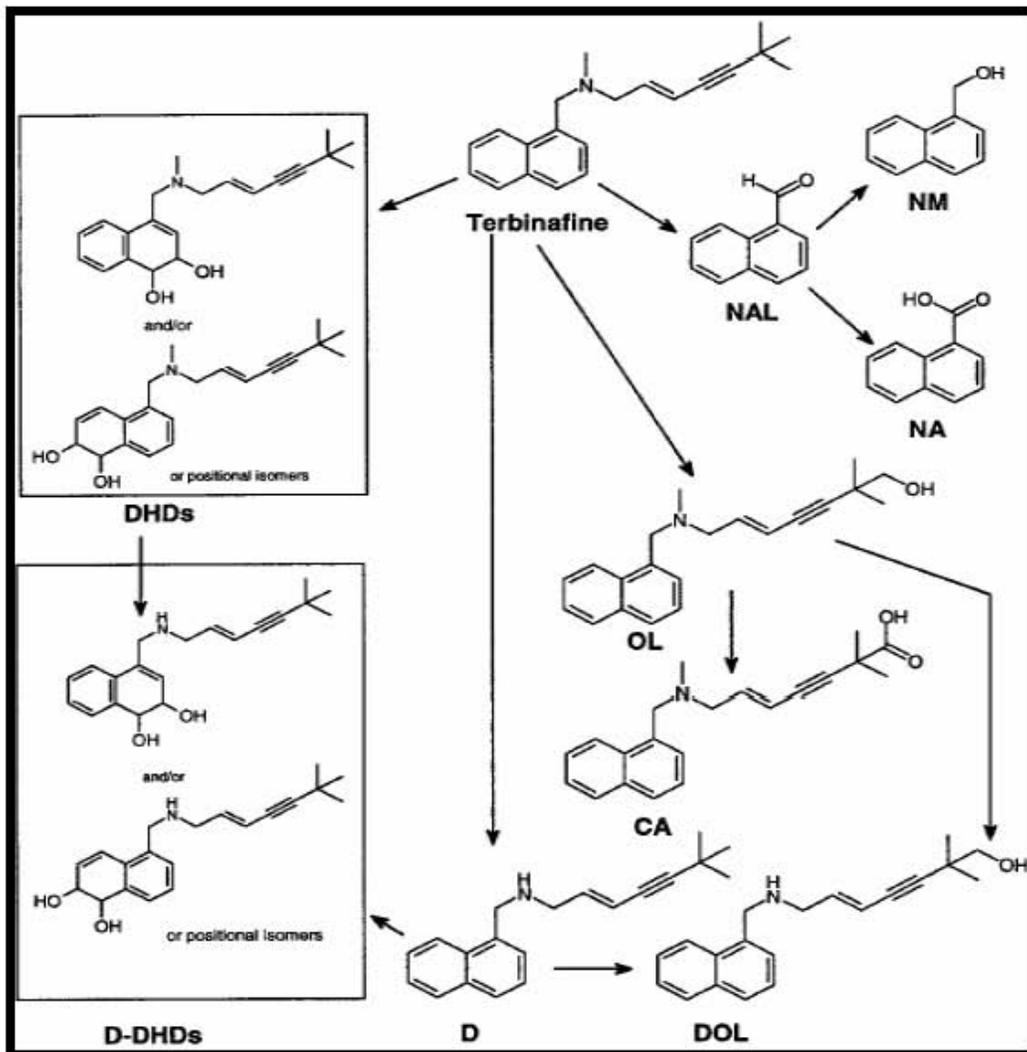


Figura 1. Vía metabólica propuesta para la Terbinafina. N-desmetilterbinafina (D), hidroxiterbinafina (OL), desmetilhidroxiterbinafina (DOL), carboxiterbinafina (CA).

La **eliminación** de la Terbinafina depende principalmente de la biotransformación. Los metabolitos son excretados en la orina en un 70% y cerca del 20% en las heces (18). La vida media de eliminación es de 17 a 36 horas aproximadamente. En tratamientos prolongados, la vida media de eliminación se estima que es de 17 días (8- 28 días). Existen reportes indicando que después de la administración de una dosis oral de 500 mg los parámetros farmacocinéticos son semejantes en adultos y en ancianos. En niños, la depuración se incrementa y la vida media se reduce. En pacientes con daño renal, la depuración se reduce en un 50% (depuración de creatinina < 50 mL/min). La depuración también se ve reducida en pacientes con cirrosis hepática (16).

2.3 Farmacodinamia

La membrana celular fúngica es muy parecida a la de las células de los mamíferos, y sólo difiere de éstas últimas en que contiene ergosterol en lugar de colesterol. La acción antifúngica de la Terbinafina se basa en la inhibición de la enzima escualeno-epoxidasa, que participa en la biosíntesis del ergosterol, concretamente en la epoxidación del escualeno, precursor del ergosterol (2). La *figura 2* esquematiza este proceso.

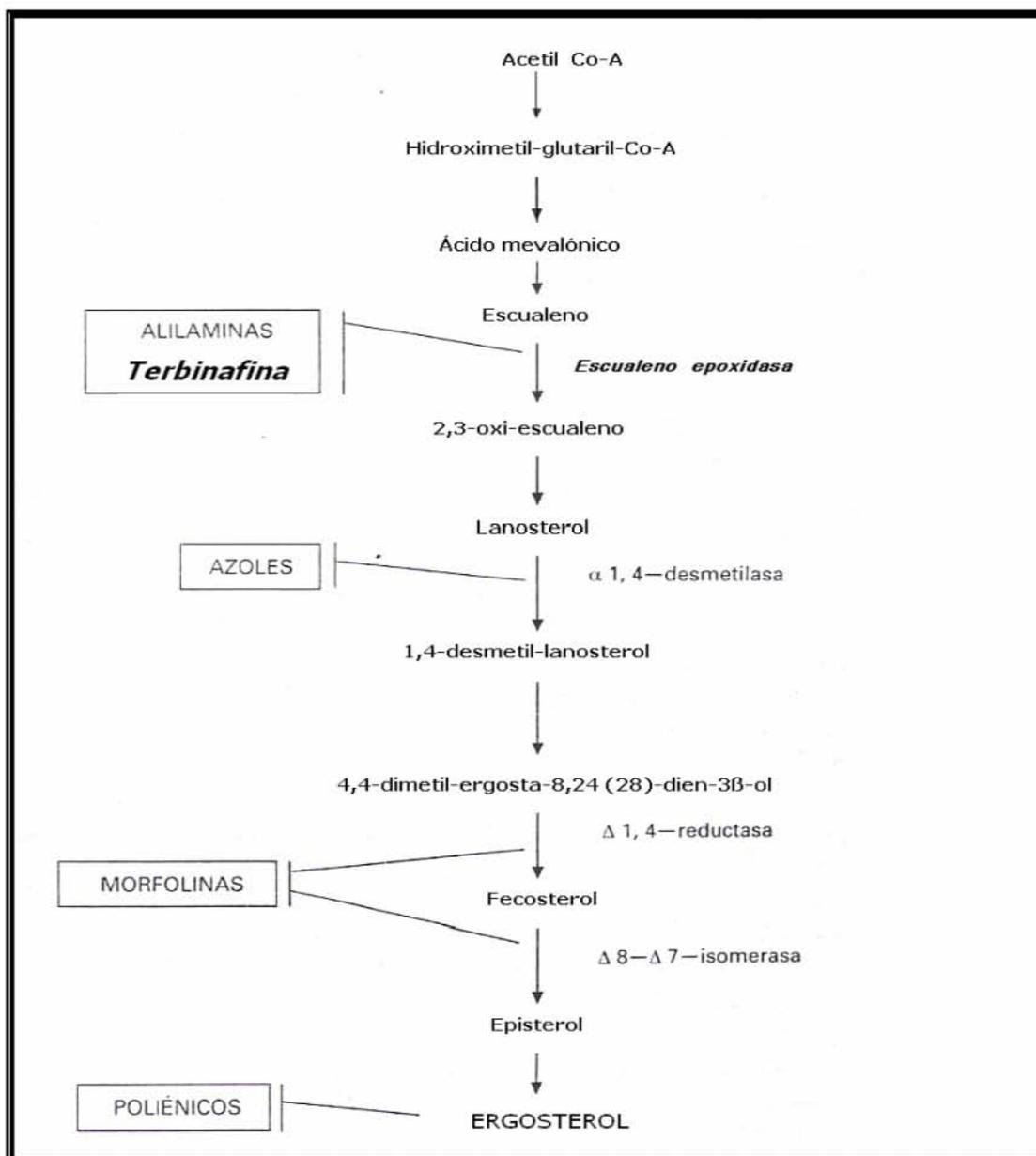


Figura 2. Mecanismo de acción de la Terbinafina sobre la biosíntesis del ergosterol.

En el hongo esto resulta en una deficiencia de ergosterol en la pared celular y una acumulación intracelular de escualeno, conduciendo a un desarrollo anormal de la membrana fúngica y a su muerte (2). La *figura 3* es una esquematización del mecanismo de acción fungistático y fungicida de la Terbinafina.

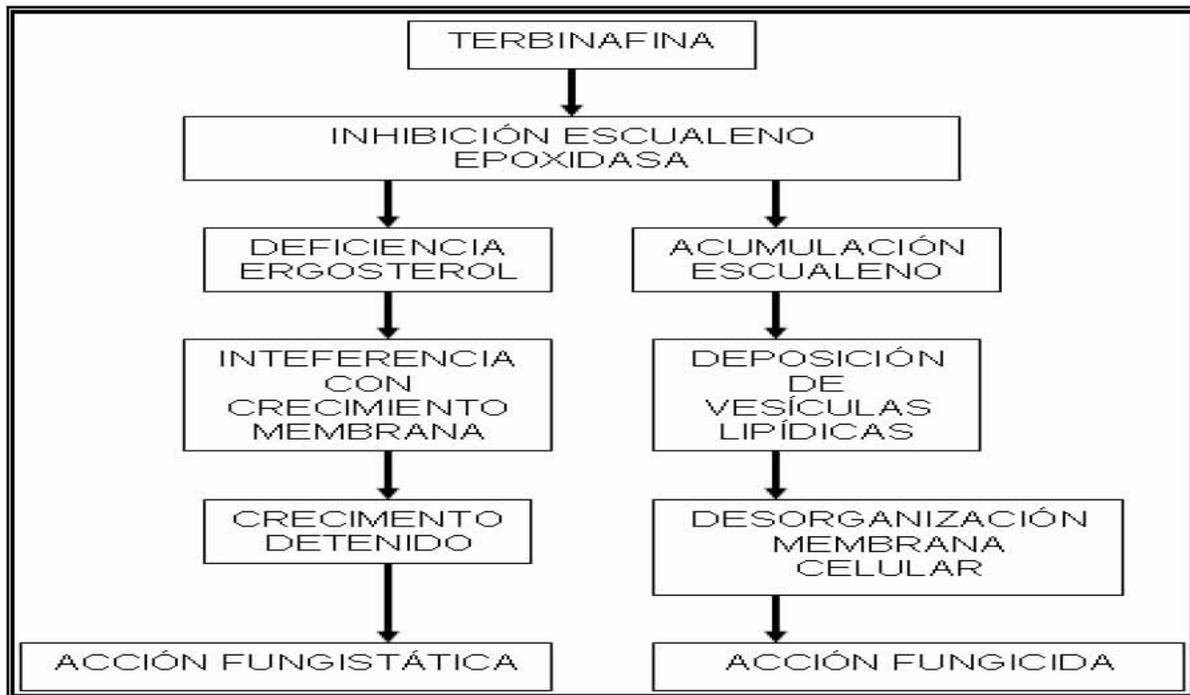


Figura 3. Mecanismo fungistático y fungicida de la Terbinafina.

2.4 Usos terapéuticos y dosis

La Terbinafina es uno de los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones dermatofíticas de piel y uñas, ya que muestra excelente actividad contra la mayoría de dermatofitos que incluye a las especies *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*. Menor actividad se ve contra hongos dematiáceos y filamentosos. Y contra levaduras patogénicas como *Candida sp.* muestra poca actividad antifúngica (3).

Para *tinea cruris* se recomienda una dosis oral diaria de 250 mg por 2 a 4 semanas. La terapia se puede prolongar hasta 6 semanas para *tinea pedis*; y por 4 semanas para *tinea corporis*. Para *tinea cruris* y *corporis* se recomienda la aplicación de una crema o solución al 1% de Terbinafina una o dos veces al día por dos semanas, y una semana para

tinea pedis. También puede utilizarse en *candidiasis cutánea* y *pitiriasis versicolor* por dos semanas (16). La *tabla 2* presenta una síntesis de los usos, dosis y vías de administración de la Terbinafina.

Tabla 2. Esquema de preparados, dosis y vías de administración.

Presentaciones	Dosis	Vías de administración
Tabletas 250 mg	1 tableta cada 24 h *	Oral
Tabletas 125mg	2 tableta 12 -24 h ♦	Oral
Crema 1%	1 aplicación 12-24 h*	Tópica
Solución 1%	1 aplicación 12-24 h*	Tópica
Pulverizador 1%	1 aplicación 12-24 h	Tópica

* 2-4 semanas para *tinea cruris*, 6 semanas para *tinea pedis* y 4 semanas para *tinea corporis*.

♦ Para aquellos casos con los que no se cuente con tabletas de 250 mg.

• 1-2 semanas para *tinea cruris* y *corporis*; 1 semana para *tinea pedis*; 2 semanas para *candidiasis cutánea* y *pityriasis versicolor*.

2.5 Reacciones adversas

Los efectos adversos más frecuentes después del uso oral de Terbinafina son trastornos gastrointestinales tales como náuseas, diarrea, dolor abdominal, dispepsia y flatulencia. Se puede producir pérdida del gusto y ocasionalmente puede ser bastante severo como para producir anorexia y pérdida de peso. Otros efectos adversos frecuentes incluyen dolor de cabeza y síntomas dermatológicos como rash o urticaria, algunas veces con artralgia o mialgia (4), irritación, sensación de quemadura, comezón y resequedad (5).

La resistencia a Terbinafina es rara. A la fecha solamente se ha caracterizado una cepa de *Trichophyton rubrum* la cual es altamente resistente, pero que presenta susceptibilidad normal a fármacos con otro mecanismo de acción. La resistencia a la Terbinafina en esta cepa se debe a una mutación en el gen de la escualeno epoxidasa, lo cual da lugar a una sustitución en el aminoácido F397L (20).

2.6 Métodos analíticos para la cuantificación de Terbinafina

De Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE y col. desarrollaron un método para la cuantificación de Terbinafina en plasma humano empleando Cromatografía Líquida

acoplada a Espectrometría de Masas en Tandem con ionización por electrospray positiva. La corrida cromatográfica fue de 5 minutos. El método fue lineal en el rango de 1.0-2000 ng/mL. El límite de cuantificación fue de 1.0 ng/mL. La técnica a seguir fue: a una alícuota de 200 μ L de plasma se le adicionaron 20 μ L de Naftifina estándar interno (a 1 μ g / mL en metanol-agua 50:50). Las muestras se extraen con 4mL de una mezcla dietil éter-hexano (80:20). Se agita en vortex durante 40 segundos y la fase orgánica se evapora a sequedad con N₂ a 37°C. El residuo seco se reconstituye con 200 μ L de fase móvil y se inyectan 20 μ L al cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas fueron una columna de fase reversa marca Génesis C₁₈ 4 μ m (150 mm x 4.6 i.d) operada a 40°C. Fase móvil (acetonitrilo – ácido fórmico 10 mM 80:20) a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de masas fueron: un espectrómetro Micromass model Quattro II en modo ion positivo y transiciones de 292.2/140.7 y 288.2/116.9 para Terbinafina y Naftifina respectivamente (6).

Por otro lado Almeida y col. llevaron a cabo un estudio de Biodisponibilidad Comparativa de Dos Formulaciones de Terbinafina (250 mg). Los niveles en plasma de Terbinafina fueron determinados empleando Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tandem (LC/MS/MS). Se emplearon 50 μ L de plasma y Naftifina como estándar interno, la extracción se llevó a cabo con ter-butil-metiléter. El volumen de inyección fue de 10 μ L. Las condiciones cromatográficas fueron una columna de fase reversa marca Zorbax SB-C18 y un detector de masas API 3000. El método fue lineal en el rango de 9.99-2497.0 ng/mL. Y el límite de cuantificación fue de 9.99 ng/mL; la precisión y exactitud no presentaron desviaciones por encima del 20% cuando se analizaron por quintuplicado (7).

Brignol N. y col. utilizaron la técnica analítica LC/MS/MS para la Cuantificación de Terbinafina en Plasma Humano y de Cerdo. El método de extracción se llevó a cabo con 0.08 mL de muestra los cuales se transfirieron a un tubo de vidrio, se le añadieron 50 μ L de una solución de [¹³C, ²H₃] Terbinafina estándar interno (a 39.6 ng/mL en acetonitrilo/H₂O) y se mezcló brevemente en vortex, se añadieron 20 μ L de solución amortiguadora de fosfato 0.25M de pH 9.1 seguidos de 200 μ L de acetonitrilo. La mezcla se agitó por un minuto en vortex y se centrifugó (1000g por 5 min.). El sobrenadante se separó y transfirió

a un microvial para análisis de cromatografía líquida y 50 µL de éste se inyectaron al cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas fueron: una columna de fase reversa C₁₈, 5 µm (15 cm X 4.6 mm i.d); fase móvil (acetato de amonio 20 mM - acetonitrilo/ácido acético) a 2 mL/min. El análisis de masas se llevó a cabo utilizando el modo ion positivo y los iones moleculares de relación *m/z* fueron de 292.2/140.8 para Terbinafina y de 296.2/140.8 para el Estándar interno. El método fue lineal en el rango de 0.0679-100 ng/mL. El límite de cuantificación fue de 0.0679 ng/mL (8).

Se han desarrollado otros métodos para la cuantificación de Terbinafina que utilizan Cromatografía Líquida como el de Denouel, J. y col. quienes desarrollaron un método para la Determinación de Terbinafina y su Metabolito Desmetilado en Plasma Humano por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. El método emplea 500 µL de plasma, 1 mL de búfer de boratos de pH 9.0 y 8 mL de n-hexano. La solución se agita a 200 rpm por 25 min y se centrifuga a 2000g por 10 min. Se toman 7 mL del sobrenadante y se agitan por 15 min con 1 mL de H₂SO₄/ isopropanol (17:3) y se centrifuga a 2000g 5 min. El sobrenadante se descarta y se inyectaron 250 µL de la fase acuosa al cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas fueron una columna Pecospher C₁₈, 3 µm (10 cm X 4.6 mm i.d), fase móvil trietilamino 12 mM y ácido orto-fosfórico 20 mM/acetonitrilo (1:1) a flujo de 1 mL/min y detección a 224 nm. El método fue lineal en el rango de 2-2500 ng/mL para Terbinafina y su metabolito desmetilado (9).

2.7 Estudios de biodisponibilidad de Terbinafina

De Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE y col. llevaron a cabo un estudio de bioequivalencia en el que participaron 24 voluntarios sanos de ambos sexos (12 hombres y 12 mujeres), se tomaron muestras sanguíneas, utilizando EDTA como anticoagulante, a los tiempos cero, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h. La concentración máxima promedio C_{max} fue de 1094 ± 490 (ng/L) para la formulación de referencia y 1106 ± 458 (ng/L) para la formulación de prueba. El T_{max} fue de 2.0 y 1.0 h para la formulación de referencia y de prueba respectivamente. El ABC_{inf} fue de 5853 ± 2639 ng*h/mL para la formulación de referencia y 5931 ± 2863 ng*h/mL para la formulación de prueba. La t_{1/2} de eliminación fue de 41.75 h para la formulación de

referencia y de 34.95 h para la formulación de prueba. No se reportaron efectos de género y las formulaciones se consideraron bioequivalentes en términos de velocidad y cantidad absorbida (6).

Por otro lado Almeida y col. llevaron a cabo un estudio de Biodisponibilidad Comparativa de Dos Formulaciones, en el cual se administraron 250 mg de Terbinafina en voluntarios sanos de ambos sexos. La concentración máxima promedio, C_{max} , fue de 1563.34 ± 677.10 ng/mL para la formulación de referencia y 1545.46 ± 641.32 ng/mL para la formulación de prueba. El T_{max} fue de 1.33 h para ambas formulaciones. El ABC_{inf} fue de 6518.90 ± 2187.39 ng/mL para la formulación de referencia y 6611.30 ± 2454.85 ng/mL para la formulación de prueba. La $t_{1/2}$ de eliminación fue de 28.50 h para la formulación de prueba y de 27.79 h para la formulación de referencia. No se reporto ningún efecto de género y las formulaciones fueron bioequivalentes en términos de velocidad y cantidad absorbida (7).

2.8 Normatividad mexicana para estudios de intercambiabilidad

En México existe una norma que establece los criterios y lineamientos para la validación de métodos en fluidos biológicos para su uso en estudios de bioequivalencia. Esta es la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, **Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y los requisitos a los que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.**

Según la norma los parámetros que deben incluirse en la validación de métodos bioanalíticos son: rango, recuperación absoluta, linealidad, precisión (repetibilidad-reproducibilidad intralaboratorio), exactitud, estabilidad (condiciones de almacenamiento-ciclos de congelación-descongelación), límite de cuantificación, límite de detección, selectividad y tolerancia.

2.9 Validación de métodos bioanalíticos

La validación de un método bioanalítico tiene como fin principal demostrar que el método desarrollado cumple con el propósito para el cual fue diseñado, es decir, que las condiciones cromatográficas y/o espectrométricas, así como los procesos de extracción empleados garantizan la identificación y cuantificación de uno o más analitos. Todo ello

deberá documentarse. A continuación se presenta la definición de los parámetros empleados en la validación de métodos analíticos así como la forma en que deben llevarse a cabo:

Selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos (metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante) que pudieran estar presentes en la muestra. La prueba se realiza analizando muestras blanco de matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar (10).

Exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia; se evalúa mediante el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, el cual debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración, excepto los métodos por RIA que deben estar dentro del 20% (10).

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 (10).

Repetibilidad es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para ello se analiza por quintuplicado en un mismo día, un mínimo de tres concentraciones conocidas baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% y en los métodos por radioinmunoanálisis (RIA) no debe ser mayor que el 20% (10).

Reproducibilidad intralaboratorio es 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, equipo, columnas o analistas. Se requiere analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero

deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% y en los métodos por RIA no debe ser mayor al 20% (10).

Recuperación absoluta (recobro) es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica. Para evaluar este parámetro se analizan al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, y se comparan los resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango (10).

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. Se requiere definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango (10). Para ello deberán prepararse curvas de calibración en la misma matriz biológica que las muestras a ser analizadas. La curva deberá incluir una muestra blanco, una muestra cero y de seis a ocho muestras que cubran el rango de concentración esperada en el estudio en particular (21).

Límite de cuantificación es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. Para ello analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera 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%. Para métodos RIA debe considerarse $\pm 25\%$. Otros criterios distintos a éste, deben ser justificados (10).

Estabilidad de una muestra es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis; ésta prueba determina las condiciones de temperatura y tiempo, entre otros, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Se determina al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango (10). Las pruebas a realizar son las siguientes:

- Condiciones de almacenamiento: evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un período por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis (10).
- Ciclos de congelación-descongelación: evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras (10).
- Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad (10).

2.10 Fundamentos de espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que ha evolucionado considerablemente en los últimos años; es altamente sensible, rápida y en combinación con técnicas de separación como cromatografía líquida puede ser y es utilizada para identificar y monitorear importantes moléculas en fluidos biológicos. También se utiliza para obtener información química y estructural acerca de las moléculas (15).

El fundamento de la técnica es la separación de iones de átomos o moléculas con base en las diferencias de su relación masa-carga (m/z). Esta utiliza un espectrómetro de masas para producir iones, los cuales posteriormente son separados y detectados (14). Los espectrómetros de masas constan de tres partes fundamentales, una fuente de ionización, un analizador y un detector.

La muestra a ser analizada debe ser introducida a la fuente de ionización del instrumento, una vez dentro de ésta, las moléculas de la muestra son ionizadas, ya que los iones son más fáciles de manejar que las moléculas neutras. Estos iones son extraídos hacia la región del analizador del espectrómetro de masas donde son separados de acuerdo a su relación m/z . Los iones separados son detectados y esta señal es enviada a un sistema de datos donde las relaciones masa-carga son almacenadas junto con sus abundancias relativas para posteriormente ser presentadas como un espectro de masas (11).

El analizador y detector del espectrómetro de masas y a menudo también la fuente de ionización son mantenidos a alto vacío permitiendo que los iones viajen de un extremo del espectrómetro al otro sin sufrir hidratación alguna a causa de las moléculas de aire (11).

Introducción de la muestra

El método de introducción de la muestra a menudo depende del método de ionización a utilizar, así como también el tipo y complejidad de la muestra. La muestra puede ser introducida directamente a la fuente de ionización o puede sufrir algún tipo de separación cromatográfica camino a la fuente de ionización. Este último método implica que el espectrómetro de masas sea acoplado directamente a cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gas o electroforesis capilar, donde la muestra es separada en una serie de componentes que entran al espectrómetro secuencialmente para su análisis individual (11).

Métodos de ionización

Existen varios métodos de ionización y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. El método de ionización a utilizar dependerá de la muestra en estudio y del espectrómetro disponible. A continuación se citan los métodos de ionización de uso más frecuente:

Ionización química a presión atmosférica (APCI)

Ionización química (CI)

Ionización por impacto de electrones (EI)

Ionización por termo-spray (TSP)

Bombardeo rápido atómico (FAB)

Desorción de campo/ ionización de campo

Ionización por desorción láser asistida por matrix (MALDI)

Ionización por electro-spray (ESI)

Los métodos de ionización más utilizados en los ensayos bioquímicos son el *MALDI* y *ESI*, ya que este último se utiliza en el método desarrollado aquí, es el que a continuación se describe.

En la *ionización por electrospray (ESI)* la muestra se disuelve en un solvente polar y volátil, posteriormente es bombeada a través de un capilar de acero inoxidable extremadamente delgado (75-150µm diámetro interno), el cual está situado en el interior de la fuente de ionización del espectrómetro, a una velocidad de flujo entre 1µL/min y 1

mL/min. A la punta del capilar se le aplica un voltaje muy alto de aproximadamente 3-4 kV generando un fuerte campo eléctrico que como consecuencia cuando la muestra emerge de la punta del capilar, ésta se dispersa en forma de gotas de muestras, altamente cargadas, este proceso es asistido por un gas nebulizante que es co-axialmente introducido alrededor del exterior del capilar. Este gas usualmente Nitrógeno ayuda a dirigir al spray que emerge de la punta del capilar, hacia el espectrómetro de masas (11). La *figura 4* da una visualización de lo descrito anteriormente.

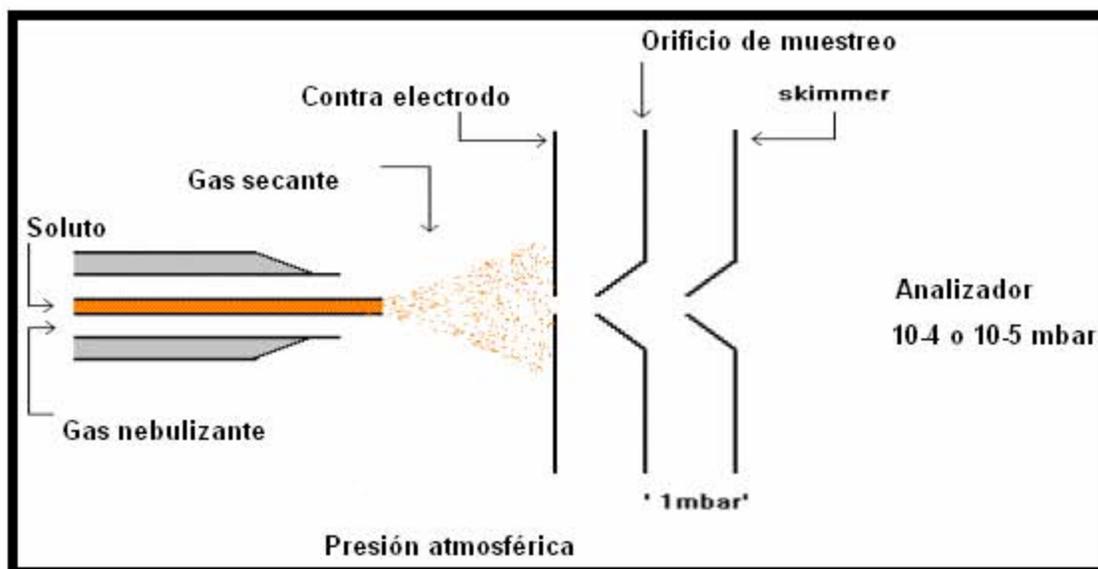


Figura 4. Esquema general de una ionización por electrospray.

Las gotas cargadas disminuyen en tamaño por la evaporación del disolvente debido a un flujo caliente de Nitrógeno conocido como gas secante el cual pasa por la parte frontal de la fuente de ionización (11).

Eventualmente los iones de muestra cargados, libres de disolvente son liberados de las gotas, algunos de los cuales pasan a través del orificio de muestreo hacia una zona de vacío intermedio y de aquí a través de una pequeña apertura pasan al analizador de masas del espectrómetro, el cual es mantenido a alto vacío (11). La *figura 5* esquematiza el proceso de ionización.

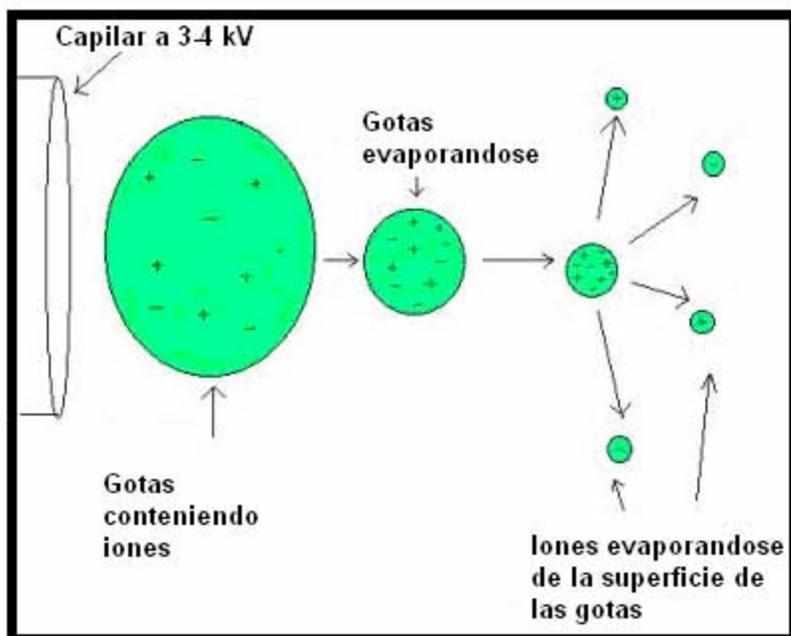


Figura 5. Proceso de ionización por electrospray.

La *ESI* es una técnica analítica muy sensible y puede verse afectada con la presencia de soluciones amortiguadoras no volátiles y otros aditivos que deben evitarse tanto como sea posible (11).

Por otro lado una ionización puede ser positiva o negativa y esto depende de los grupos funcionales que contenga la muestra. Si tiene grupos funcionales que rápidamente acepten un protón tales como aminas, la detección en modo ion positivo debe usarse. Y si por el contrario la muestra tiene grupos que fácilmente pierden un protón la detección en modo ion negativo es el que se emplea (11).

En el modo de ionización positiva se añade una cantidad traza de ácido fórmico para ayudar a la protonación de las moléculas de la muestra; en el modo de ionización negativa se añade una cantidad traza de una solución de amonio o una amina volátil para ayudar a la desprotonación de las moléculas de la muestra (11).

Analizadores de masas

Al igual que los métodos de ionización existen varios tipos de analizadores de masas, cada analizador tiene sus propias características y aplicaciones. Los siguientes son solo algunos de los analizadores de masas de mayor uso:

Sector magnético

Este tipo de instrumentos separa los iones, en un campo magnético, de acuerdo al momento y a la carga del ion. Los valores m/z se determinan mediante la ecuación $m/z = r^2 B^2 e / 2V$ y solo un ion de m/z con radio de arco (r), campo magnético (B) y un voltaje de aceleración (V) determinados cumplirá esta ecuación. De esta manera se lleva a cabo la separación de los iones según su relación m/z (13).

Analizador TOF (Time-Of-Flight)

En estos instrumentos todos los iones formados son acelerados por pulsos de potenciales hacia un tubo evacuante. El tiempo que tardan en llegar al detector es lo que se mide, el cual está en función de su valor m/z (14).

Analizador ICR (Ion Cyclotron Resonance)

Este utiliza un magneto superconductor para atrapar los iones de una muestra en una pequeña celda. Los iones son mantenidos en la trampa por una combinación de campos magnéticos estáticos y campo eléctricos, los iones son detectados *in situ* por los impulsos eléctricos, que los iones circulantes crean en el plato del detector colocado en el exterior de la trampa, y a partir de éstos es posible calcular los valores m/z de los iones atrapados (14).

Quadrupolo

Dado que este analizador fue el utilizado en el presente trabajo se describe de una manera más amplia. En los espectrómetros de masas con estos analizadores un campo eléctrico acelera los iones fuera de la región de ionización hacia el analizador de masas (13)

Este consta de 4 barras colocadas una frente a la otra como se muestra en la *figura 6*, a medida que los iones viajan hacia el *quadrupolo*, son filtrados de acuerdo a su valor m/z y solo un único m/z determinado puede alcanzar el detector. El valor de m/z que es transmitido por el *quadrupolo* está determinado por el voltaje de radio frecuencia (RF) y por el potencial de corriente directa (DC) aplicado a las barras. Estos voltajes producen un campo eléctrico oscilante que funciona como un filtro de paso para transmitir el valor de m/z seleccionado (13)

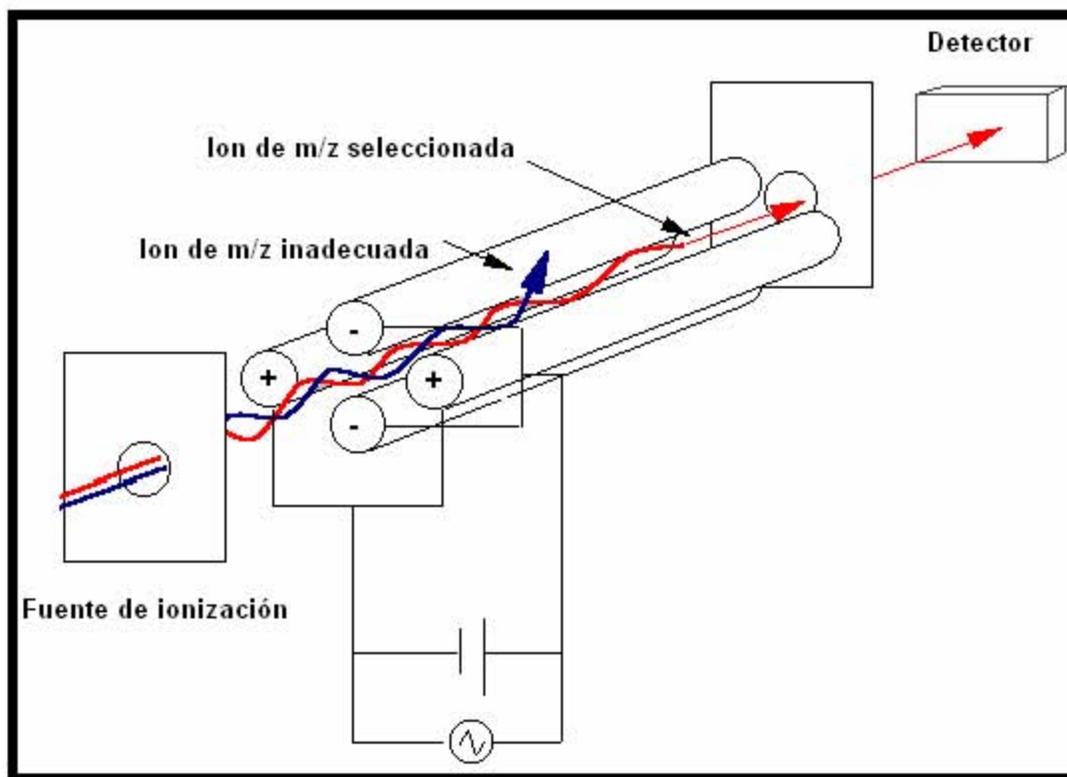


Figura 6. Analizador de masas del tipo Quadrupolo.

En el caso del voltaje RF este rechaza o transmite iones de acuerdo a su m/z , alternándolos en diferentes planos. Los cuatro electrodos están conectados en pares y el potencial RF es aplicado en dos de estos pares de electrodos. Durante la primera parte del ciclo RF las barras superiores e inferiores están a un potencial positivo y las barras izquierda y derecha están a un potencial negativo; esto direcciona a los iones positivos al plano horizontal. Durante la segunda mitad del ciclo RF la polaridad de las barras se invierte, esto cambia el campo eléctrico y direcciona a los iones al plano vertical. El campo del cuadrupolo continua alternándose a medida que los iones viajan a través del analizador de masas, esto hace que los iones sufran un conjunto de movimientos complejos, que producen una onda tridimensional (13).

El campo del *cuadrupolo* transmite los iones seleccionados por que la amplitud de esta onda tridimensional depende del valor de m/z del ion, los potenciales aplicados y la frecuencia RF. Si se selecciona una frecuencia RF y un potencial adecuado, el *cuadrupolo* funcionara como un filtro de pasa alto, es decir, transmite iones de valor m/z alto y rechaza iones de valor m/z bajo. Los iones de valor m/z bajo tienen un a mayor velocidad de

aceleración por la que la onda de estos iones tiene una mayor amplitud. Si esta amplitud es lo bastante grande los iones colisionaran con los electrodos y no alcanzarán el detector. Los valores límite de m/z bajos se cambian al ajustar el potencial RF o la frecuencia RF. Cualquier ion con un m/z mayor a este límite es transmitido por el cuadrupolo. Un voltaje de DC también es aplicado a través de las barras del analizador. Este potencial combinado con el potencial RF actúa como un filtro de paso bajo, es decir, rechaza a los iones de un valor m/z alto (13).

La combinación de filtros de paso bajo y alto, producidos por potenciales RF y DC se ajusta para transmitir iones de valores m/z determinados. Todos los iones fuera de este valor son rechazados por el filtro del cuadrupolo. Los *cuadrupolos* son llamados filtros de masas debido a su similitud entre la selección m/z por *cuadrupolo* y la selección de una longitud de onda por un filtro óptico o la selección de una frecuencia por un filtro electrónico (13).

Los espectrómetros con analizadores de este tipo son los más usados, por su tamaño pequeño, su rapidez de análisis de masas, su alta eficiencia de transmisión y sus modestos requerimientos de vacío, estas características lo hacen de un costo menor y por tanto más accesible para los laboratorios que los utilizan (13).

Detectores

La detección de los iones se basa en su carga o momentum. Para señales grandes se utiliza una copa estilo Faraday para coleccionar los iones y medir la corriente. Los primeros espectrómetros usaban placas fotográficas para medir la abundancia iónica a cada relación m/z . Actualmente la mayoría de los detectores amplifican la señal iónica usando un colector similar a un tubo fotomultiplicador. Estos detectores incluyen: multiplicadores de electrones y placas multicanal (13). Básicamente y en palabras sencillas el proceso de detección es el monitoreo de la corriente del ion, su amplificación y su transmisión a un sistema de datos en donde es registrado como un espectro de masas. Los valores m/z son graficados contra sus intensidades para mostrar el número de componentes en la muestra, la masa molecular de cada componente y la abundancia relativa de varios componentes de la muestra (11).

Espectrometría de masas en tandem

La técnica de Espectrometría de Masas en Tandem (*MS/MS*) es una adecuación de la espectrometría de masas y generalmente se usa para obtener información estructural acerca de la muestra, por una fragmentación específica de ésta en el interior del espectrómetro de masas y por la identificación de los iones fragmento resultantes. Pero no solo lo anterior es posible sino que también puede ser utilizada para identificar un compuesto específico en una mezcla compleja, como podría ser un fármaco, con base a su patrón de fragmentación característico en una muestra de sangre u orina (11).

Un espectrómetro de masas en *tandem* es un espectrómetro de masas que tiene más de un analizador, generalmente dos. Los analizadores están separados por una celda de colisión dentro de la cual se encuentra un gas inerte (xenón, argón) para colisionar con los iones de la muestra seleccionada (11). El primer analizador selecciona un ion de relación m/z particular, este posteriormente es fragmentado de manera específica por medio de colisiones de alta energía, finalmente el segundo analizador escanea estos fragmentos (12).

La adquisición de datos de los experimentos de espectrometría en tandem puede ser de varias formas pero ya que aquí se utilizó el modo Monitoreo Reacción Múltiple (MRM) es el que se describe. Básicamente en este modo los iones que son transmitidos a través del primer analizador y los fragmentos específicos que surgen de estos iones y que son medidos por el segundo analizador, son seleccionados según el interés del usuario. Para ello el compuesto en escrutinio debe ser ampliamente conocido y estar bien caracterizado antes de llevar a cabo este tipo de experimentos (11).

Es importante decir que la técnica analítica de Espectrometría de Masas en Tandem tiene una alta sensibilidad y rapidez en el análisis de muestras.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR TERBINAFINA EN PLASMA

3.1 Reactivos, material y equipo

Reactivos

Éter etílico grado HPLC J.T Baker

Hexano HPLC JT Baker

Metanol HPLC Merck

Ácido fórmico RA J T Baker

Acetato de amonio RA

Agua HPLC

Plasma humano congelado, con etiqueta de sangre segura y con resultado negativo a las pruebas de VIH, hepatitis B y VDRL. Este plasma fue obtenido del Hospital Médica Sur

Sustancias de referencia

Terbinafina clorhidrato (Psicofarma lote TF0310904 pureza: 99.9%)

Naftifina clorhidrato (USP lote F)

Materiales

Tubos de ensayo 16x100 mm con rosca

Tubos de centrífuga

Pipetas Pasteur

Bulbos para Pipeta Pasteur

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Repipeteador

Puntas para repipeteador

Vasos de precipitado de 100 y 250 mL

Matraces volumétricos de 10, 500 y 1000 mL

Probetas de 100, 500 y 1000 mL

Placas de 96 pozos de 500 μ L

Cubiertas de silicón para placas de 96 pozos

Sistema de filtración

Membrana de filtración Millipore de 0.45 μm tipo HA y diámetro de 45 mm

Aparatos

Agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II

Centrífuga refrigerada Hettich

Cromatógrafo de Líquidos Agilent 1100 acoplado a un Espectrómetro de Masas-Masas API 3000

Balanza analítica Ohaus Explorer

Bomba de vacío

Campana de extracción

Evaporador de nitrógeno

3.2 Preparación de soluciones

Solución de ácido fórmico 20 mM- acetato de amonio 5 mM

En un matraz de 500 mL adicionar 300 mL de agua HPLC y añadir 429 μL de ácido fórmico al 88% y mezclar. Añadir 0.1986 g de acetato de amonio, llevar a volumen con agua HPLC y mezclar.

Solución diluyente metanol-agua (50:50)

Mezclar agua HPLC y metanol HPLC en proporción 50:50 de acuerdo a la cantidad a utilizar.

Solución de extracción

Mezclar éter HPLC y hexano HPLC en proporción 80:20.

Plasma humano

El plasma que se utilizó para la preparación de las curvas patrón y los puntos control, provenía del Hospital Medica Sur y se encontraba libre de pirógenos y con sello de sangre segura para las pruebas VDRL, VIH y hepatitis.

3.3 Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control de Terbinafina

Estándar interno Naftifina (500ng/ml)

Pesar con exactitud 0.0112 g de clorhidrato de Naftifina, equivalentes a 10 mg de Naftifina, y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar el aforo con metanol HPLC, mezclar. Esta solución contiene 1000 µg/mL de Naftifina. Transferir 1 mL de la solución de 1000 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente metanol-agua (50:50). Esta solución contiene 100 µg/mL de Naftifina.

De esta última solución de 100 µg/mL transferir 500 µL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente metanol-agua (50:50) y mezclar. Esta solución contiene 5000 ng/ml de Naftifina.

De esta solución de 5000 ng/mL tomar una alícuota de 100 µL y transferir a un tubo de ensayo, añadir 900 µL de solución diluyente metanol-agua (50:50). Esta solución contiene 500 ng/mL de Naftifina.

Soluciones patrón de Terbinafina

Pesar con exactitud 0.0112 g de clorhidrato de Terbinafina, equivalentes a 10 mg de Terbinafina, y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol HPLC. Esta solución contiene 1000 µg/mL de Terbinafina.

Transferir 1 mL de la solución de 1000 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente metanol-agua (50:50). Esta solución contiene 100 µg/mL de Terbinafina.

Transferir 1 mL de la solución de 100 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente metanol-agua (50:50). Esta solución contiene 10 µg/mL de Terbinafina.

Transferir 1 mL de la solución 10 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente metanol-agua (50:50). Esta solución contiene 1 µg/mL de Terbinafina.

Diluciones de Terbinafina en solución diluyente

Utilizando las soluciones patrón de 100, 10 y 1 µg/mL de Terbinafina en solución diluyente

metanol-agua (50:50) se prepararon soluciones a concentraciones de 30, 25, 20, 10, 6, 5, 2, 1, 0.5, 0.3, 0.2 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de Terbinafina en solución diluyente metanol-agua (50:50). En la *tabla 3* se indica la metodología utilizada para la preparación de estas soluciones.

Curva de calibración y puntos control en solución diluyente

A partir de las diluciones de Terbinafina resultantes del párrafo anterior, se prepararon los puntos de la curva de calibración siendo estos de 3000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20 y 10 ng/mL de Terbinafina y los puntos control de 2500(alto), 600(medio) y 30(bajo) ng/mL de Terbinafina en solución diluyente metanol-agua (50:50). La *tabla 4* presenta la metodología utilizada para preparar los puntos de la curva de calibración así como los puntos control.

Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma

En la *tabla 5* se indica la metodología para la preparación de la curva de calibración de Terbinafina en plasma, a concentraciones en el rango de 10-3000 ng/mL así como los puntos control a 30, 600 y 2500 ng/mL de Terbinafina, también en plasma.

Tabla 3. Diluciones de Terbinafina en solución diluyente metanol-agua (50:50).

Concentración solución patrón de Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota de la solución patrón de Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) (mL)	Volumen de solución diluyente MeOH-H ₂ O (50:50) (mL)	Volumen final (mL)	Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
100	0.300	0.7	1	30
100	0.250	0.75	1	25
100	0.200	0.8	1	20
100	0.100	0.9	1	10
10	0.600	0.4	1	6
10	0.500	0.5	1	5
10	0.200	0.8	1	2
10	0.100	0.9	1	1
1	0.500	0.5	1	0.5
1	0.300	0.7	1	0.3
1	0.200	0.8	1	0.2
1	0.100	0.9	1	0.1

Tabla 4. Curva de calibración y puntos control en solución metanol-agua (50:50)

Curva de calibración				
Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) concentración inicial (μg/mL)	Alicuota de la solución de Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) (mL)	Volumen de solución diluyente MeOH-H ₂ O (50:50) (mL)	Volumen final (mL)	Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) concentración final (ng/mL)
30	0.100	0.900	1	3000
20	0.100	0.900	1	2000
10	0.100	0.900	1	1000
5	0.100	0.900	1	500
2	0.100	0.900	1	200
1	0.100	0.900	1	100
0.5	0.100	0.900	1	50
0.2	0.100	0.900	1	20
0.1	0.100	0.900	1	10
Puntos control alto, medio y bajo				
25	0.100	0.900	1	2500
6	0.100	0.900	1	600
0.3	0.100	0.900	1	30

Tabla 5. Curva de calibración de Terbinafina y puntos control en plasma.

Curva de calibración				
Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) concentración inicial (μg/mL)	Alicuota de la solución de Terbinafina en MeOH-H ₂ O (50:50) (mL)	Volumen de plasma (mL)	Volumen final (mL)	Terbinafina en plasma concentración final (ng/mL)
30	0.100	0.900	1	3000
20	0.100	0.900	1	2000
10	0.100	0.900	1	1000
5	0.100	0.900	1	500
2	0.100	0.900	1	200
1	0.100	0.900	1	100
0.5	0.100	0.900	1	50
0.2	0.100	0.900	1	20
0.1	0.100	0.900	1	10
Puntos control alto, medio y bajo				
25	0.100	0.900	1	2500
6	0.100	0.900	1	600
0.3	0.100	0.900	1	30

3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma

Para desarrollar el método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma, se tomó en consideración los métodos previamente reportados (6-8), a partir de los cuales se seleccionó la transición iónica a monitorear.

Las condiciones cromatográficas a evaluar fueron la fase móvil y el método de extracción. Con respecto a la fase móvil se probaron combinaciones de la concentración de metanol-ácido fórmico y acetato de amonio, hasta llegar a las proporciones en las que la señal de los analitos fuera superior a la señal del ruido del equipo. Con respecto al método de extracción se evaluaron diferentes proporciones de los solventes de extracción y los tiempos de agitación que permitieran obtener el mejor recobro posible.

Las condiciones finales para la extracción de Terbinafina en plasma fueron las siguientes:

- Tomar 200 μ L de plasma
- Adicionar 100 μ L de solución de estándar interno de Naftifina a 500 ng/mL en MeOH-H₂O (50:50)
- Añadir 4 mL de éter-hexano (80:20)
- Agitar por 40 segundos en vortex
- Decantar el solvente orgánico a un tubo de ensayo limpio
- Evaporar en baño María bajo corriente de Nitrógeno
- Disolver el residuo en fase móvil
- Inyectar 10 μ L al sistema LC/MS/MS

3.5 Condiciones cromatográficas

Las *condiciones cromatográficas* utilizadas fueron las siguientes:

Precolumna C₁₈

Columna Phenomenex Gemini C₁₈, 5 μ m (150x4.6 mm)

Fase móvil: 90% metanol

10% solución de ácido fórmico 20mM + acetato de amonio 5mM

Velocidad de flujo de 0.8 mL/min

Temperatura del automuestreador: 10 ° C

Tiempo de corrida: 3 minutos

Respuesta medida: áreas relativas (analito / estándar interno)

Las *condiciones de espectrometría de masas* fueron:

Fuente de ionización turbo ion spray en modo positivo (ES^+)

Las transiciones iónicas monitoreadas fueron 292.116/141.200 para Terbinafina y 288.134/117.200 para Naftifina.

Los iones fueron monitoreados por Multiple Reaction Monitoring (MRM)

3.6 Validación del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma

La validación del método consistió en la evaluación de los siguientes parámetros:

3.6.1 Selectividad

Para evaluar la selectividad se prepararon:

Muestras blanco de plasma obtenidas de seis donadores diferentes.

Muestra blanco de la mezcla del plasma de los seis donadores adicionada de Naftifina a concentración de 500 ng/mL.

Muestra blanco de la mezcla del plasma de los seis donadores adicionada de Terbinafina a la concentración de 10 ng/mL y Naftifina a 500 ng/mL.

Muestra blanco de sangre bemoquizada.

Muestra blanco de plasma heparinizado.

A cada una de las muestras se les aplicó el método de extracción y se inyectaron 10 μ L al cromatógrafo.

Criterio de aceptación: No deberá presentarse interferencia en el tiempo de retención de Terbinafina (analito de interés), ni en el de Naftifina (estándar interno). En caso de que se presente alguna señal en el tiempo de retención de la Terbinafina ésta debe ser menor al 20 % de la respuesta de una concentración de 10 ng/mL. Para el estándar interno la interferencia no debe ser mayor que el 5% de su respuesta con respecto a la concentración de 500 ng/mL.

3.6.2 Supresión iónica

Se conectó una bomba de infusión a la entrada del tornillo inferior de la T de entrada al espectrómetro de masas a través de la cual se infundió una solución en fase móvil de Terbinafina y Naftifina a una concentración de 50 μ g/mL a una velocidad de 50 μ L/min.

Se aplicó el procedimiento de extracción a una muestra blanco de la mezcla de plasma y se inyectó a través del sistema cromatográfico preparado con las condiciones normales para el método.

Criterio de aceptación: la prueba se considera válida si la línea base no presenta inflexiones positivas o negativas en los tiempos de retención de Terbinafina y Naftifina.

3.6.3 Linealidad

Para determinar la linealidad del método, se prepararon tres curvas de calibración en plasma a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 y 3000 ng/mL de Terbinafina de acuerdo a lo indicado en la tabla 5. Las muestras se procesaron utilizando el método previamente descrito en la sección 3.3.

Se determinó el modelo matemático que mejor describe la relación entre la concentración y la respuesta, verificando que fuera continua y reproducible a lo largo del intervalo de trabajo y se calculó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto de las tres curvas y de todos los datos {global}. La ecuación de la recta obtenida se utilizó para el cálculo de la concentración recuperada de cada una de las muestras preparadas en la corrida analítica. La concentración recuperada se obtuvo interpolando los valores de la relación de áreas en la curva de calibración correspondiente, considerando como incógnita la concentración del analito.

Criterio de aceptación: el método es lineal si el coeficiente de determinación (r^2) de cada una de las curvas y de todos los datos (global) es igual o mayor que 0.98 y los valores del coeficiente de variación y el % de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración deben ser menores o iguales al 15 %, excepto para el nivel de concentración más bajo, el cual puede tener un % de desviación absoluta menor o igual al 20%.

3.6.4 Recobro absoluto

Se prepararon por triplicado puntos control en plasma a concentraciones de 30, 600 y 2500 ng/mL de Terbinafina y puntos control en solución a las mismas concentraciones. Las muestras se analizaron empleando el método propuesto en la sección 3.3 y se inyectaron al cromatógrafo.

Para cada una de las determinaciones (muestras en solución y muestras en plasma) se calculó la relación de áreas entre los analitos de interés y el estándar interno. Posteriormente se determinó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración comparando el promedio de la respuesta obtenida en plasma con respecto a la obtenida en solución a la misma concentración. Lo anterior se describe en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \left(\frac{\text{Promedio relación de áreas en plasma}}{\text{Promedio relación de áreas en solución}} \right) \times 100$$

Criterio de aceptación: el porcentaje de recobro del analito no debe ser necesariamente del 100 %, pero debe ser consistente en el rango de concentración estudiado.

3.6.5 Precisión

La *Precisión del método* se evaluó mediante la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad:

3.6.5.1 Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad, se prepararon por quintuplicado puntos control de Terbinafina a concentraciones de 30, 600 y 2500 ng/mL y una curva de calibración preparada el día del análisis. Las muestras se procesaron empleando el método analítico propuesto en la sección 3.3 y se inyectaron al cromatógrafo.

La valores de respuesta de de los puntos control (30, 600 y 2500 ng/mL) se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. De cada nivel de concentración se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación

Criterio de aceptación: el método es repetible si el coeficiente de variación no excede al 15%.

3.6.5.2 Reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad se prepararon por triplicado en tres días o corridas diferentes, puntos control de Terbinafina a las concentraciones de 30, 600 y 2500 ng/mL y una curva de calibración. Las muestras (puntos control y curvas de calibración) se

analizaron utilizando el método analítico propuesto en la sección 3.3 y se inyectaron al cromatógrafo.

Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración preparada el día del análisis y se calculó de la concentración recuperada. Para cada nivel de concentración se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: el método es repetible si el coeficiente de variación, de la concentración recuperada, para cada nivel de concentración no es mayor que el 15%

3.7 *Exactitud*

La exactitud del método se determinó a partir de los resultados de concentración recuperada provenientes de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. Para cada uno de los niveles de concentración se determinó la concentración recuperada y su valor promedio respectivo. El % de desviación absoluta se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Des. Absoluta} = \left(\frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right) \times 100$$

Criterio de aceptación: el método es exacto si los valores individuales y promedio de desviación absoluta están dentro del 15% del valor nominal de concentración, es decir, el % de desviación absoluta es menor o igual que el 15%

3.8 *Límite de cuantificación*

Se prepararon por sextuplicado, muestras de plasma conteniendo Terbinafina a una concentración de 10ng/mL y una curva de calibración. Se aplicó el método analítico propuesto en la sección 3.3 y las muestras se inyectaron al cromatógrafo.

Los valores de respuesta de cada una de las réplicas se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: el valor promedio de las seis determinaciones debe estar dentro del 20% del valor nominal y el coeficiente de variación no debe ser mayor al 20%

3.9 Estabilidad

Por medio de las pruebas de estabilidad se determinan las condiciones a las cuales la Terbinafina permanece estable durante su almacenamiento o proceso.

3.9.1 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon puntos control de Terbinafina en plasma, a concentraciones de 30, 600 y 2500 ng/mL. De cada uno de los puntos se tomaron 3 alícuotas las cuales se analizaron junto con una curva de calibración, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3. El volumen restante se almacenó a -70°C por un período de 107 días. Al término de este período, las muestras se descongelaron y se analizaron conjuntamente con una curva de calibración en plasma, preparada el día del análisis.

La concentración promedio recuperada de los puntos control antes del proceso de congelación se comparó con la concentración promedio recuperada a los 107 días de almacenamiento en congelación y se determinó el % de desviación absoluta mediante la fórmula:

$$\% \text{ Des. Absoluta} = \frac{[\text{Concentración recuperada inicial}] - [\text{Concentración recuperada final}]}{[\text{Concentración recuperada inicial}]} \times 100$$

[Concentración recuperada inicial] = concentración recuperada obtenida antes del proceso de congelación

[Concentración recuperada final] = concentración recuperada obtenida después de los 107 días de congelación a -70°C

Criterio de aceptación: El criterio de aceptación para la prueba está definido por los valores de la desviación absoluta. El valor promedio a cada nivel de concentración, no deberá ser mayor al 15% con respecto al valor original o al de referencia.

3.9.2 Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación

Se prepararon por triplicado dos series de puntos control alto, medio y bajo de Terbinafina en plasma (30, 600 y 2500 ng/mL) y se almacenaron en congelación a -70°C por 24 horas. Transcurrido este período de tiempo, se descongeló una serie y se volvió a congelar, lo cual constituyó un ciclo de congelación–descongelación. Esta serie se sometió

al procedimiento anterior 2 veces más, al término de lo cual se descongeló conjuntamente con la serie que se mantuvo en congelación. Ambas series se analizaron conjuntamente, utilizando al método propuesto.

Para cada uno de los puntos, se calculó la concentración recuperada interpolando los valores de respuesta en la curva de calibración preparada el día de análisis. Se tabularon las concentraciones recuperadas de ambas series y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se calculó la desviación empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Des. Absoluta} = \frac{[\text{Concentración recuperada inicial}] - [\text{Concentración recuperada final}]}{[\text{Concentración recuperada inicial}]} \times 100$$

[Concentración recuperada inicial] = concentración recuperada de los puntos control que no se sometieron a ciclos de congelación-descongelación

[Concentración recuperada final] = concentración recuperada de los puntos control sometidos a tres ciclos de congelación-descongelación

Criterio de aceptación: los resultados de concentración recuperada para ambos conjuntos deben cumplir con el criterio de precisión presentando un coeficiente de variación no mayor al 15%. El porcentaje de desviación absoluta no deberá ser mayor que el 15% respecto al valor inicial.

3.9.3 Estabilidad a temperatura ambiente (corto plazo)

Se prepararon por triplicado dos series de puntos control a 30, 600 y 2500 ng/mL de Terbinafina en plasma y se almacenaron en congelación a -70° C por 24 horas. Se descongeló una serie de puntos control y se mantuvo a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo por un periodo de 6 horas. Después de este período se descongelaron los puntos control de la serie restante, se procesaron ambas series de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3 y se inyectaron al cromatógrafo.

Se calculó la concentración recuperada de ambas series, interpolando los valores de respuesta en la curva de calibración preparada el día del análisis. Se tabularon las concentraciones recuperadas y se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Se calculó la desviación absoluta utilizando el valor promedio de la concentración recuperada a cada nivel de concentración, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Des. Absoluta} = \frac{[\text{Concentración recuperada inicial}] - [\text{Concentración recuperada final}]}{[\text{Concentración recuperada inicial}]} \times 100$$

[Concentración recuperada inicial] = concentración recuperada de los puntos control que se mantuvieron en congelación

[Concentración recuperada final] = concentración recuperada de los puntos control sometidos a mantenidos a temperatura ambiente

Criterio de aceptación: El porcentaje de desviación absoluta no deberá ser mayor que el 15% respecto al valor inicial.

3.9.4 Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon por triplicado dos series de puntos control a 30, 600 y 2500 ng/mL de Terbinafina en plasma y se procesaron utilizando el método descrito en la sección 3.3. Una de las series se inyectó al cromatógrafo inmediatamente (0 horas). La otra serie se mantuvo en el automuestreador (10°) durante 72 horas y transcurrido este tiempo se inyectaron al cromatógrafo.

Se calculó la concentración recuperada de ambas series, interpolando los valores de respuesta en una curva de calibración preparada el día del análisis.

Se calculó el % de desviación absoluta utilizando el valor promedio de la concentración recuperada a cada nivel de concentración, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Des. Absoluta} = \frac{[\text{Concentración recuperada inicial}] - [\text{Concentración recuperada final}]}{[\text{Concentración recuperada inicial}]} \times 100$$

[Concentración recuperada inicial] = concentración promedio recuperada de los puntos control analizados inmediatamente.

[Concentración recuperada final]= concentración promedio recuperada de los puntos control que permanecieron durante 72 horas en el automuestreador

Criterio de aceptación: El % desviación absoluta no deberá ser mayor al 15%

3.10 Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos

Se llevó a cabo un estudio piloto para evaluar la farmacocinética de Terbinafina. En el estudio participaron 10 voluntarios clínicamente sanos, a los cuales se les administró una dosis oral única de 250 mg de Terbinafina con 250 mL de agua. Los voluntarios se mantuvieron en ayuno por 4 horas más, tiempo al cual se les administró un desayuno ligero. Se tomaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0 y 72.0 horas. Se separó el plasma por centrifugación y las muestras se almacenaron a -70° C. El día del análisis, se descongelaron las muestras, se tomaron alícuotas de 200 μ L y se analizaron empleando el método descrito en la sección 3.3.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 *Tiempos de retención de Terbinafina y Naftifina*

Las *figuras 7 y 8* muestran los cromatogramas de Terbinafina y Naftifina en plasma a concentración de 10 ng/mL y 500 ng/mL respectivamente, en ellas se puede observar que el tiempo de retención para Terbinafina es de 1.95 y para Naftifina de 1.69 minutos.

4.1.1 *Selectividad*

Las *figuras 9 y 10* muestran un cromatograma representativo, para Terbinafina y Naftifina respectivamente, de un blanco de plasma de un donador. En ellas se puede observar que no existen picos que interfieran en los tiempos de retención de los analitos.

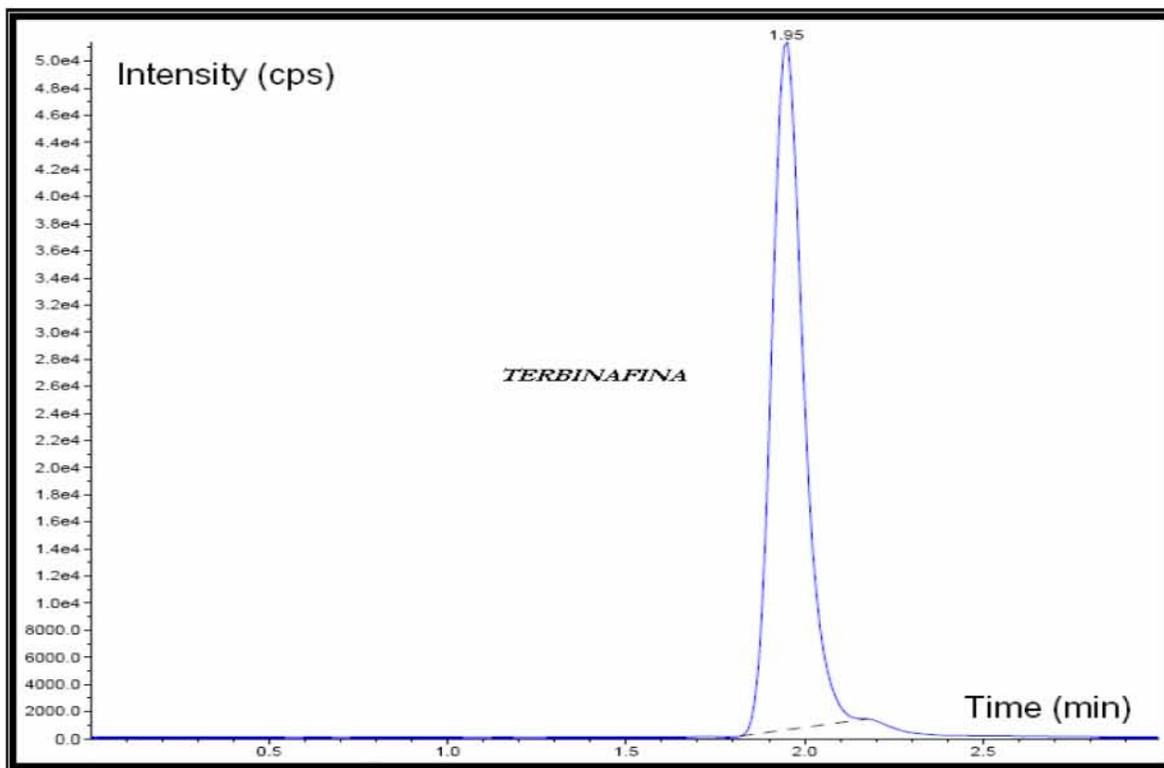


Figura 7. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Terbinafina.

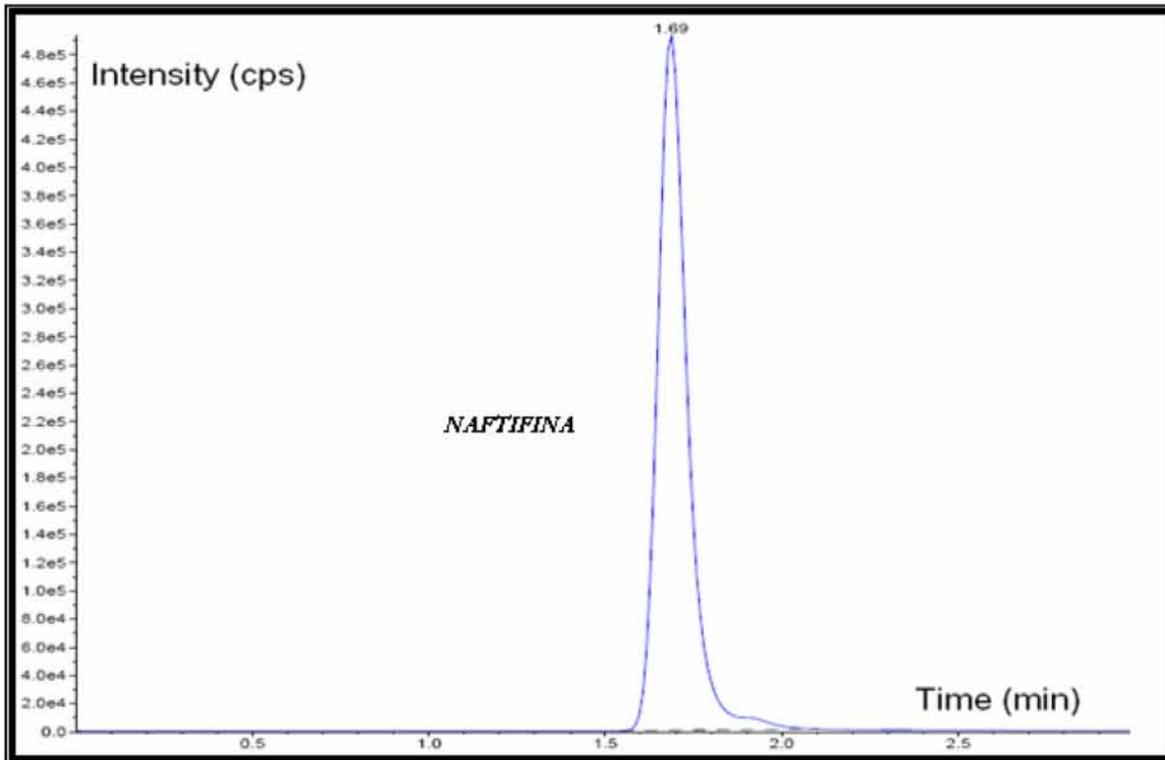


Figura 8. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Naftifina.

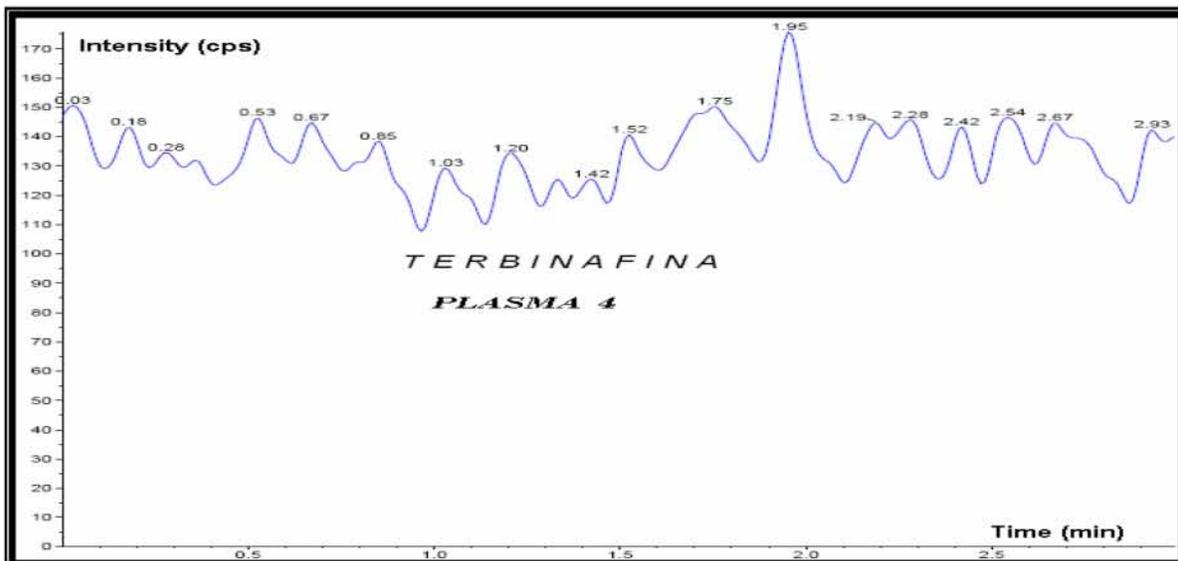


Figura 9. Cromatograma de la muestra blanco del voluntario 4.

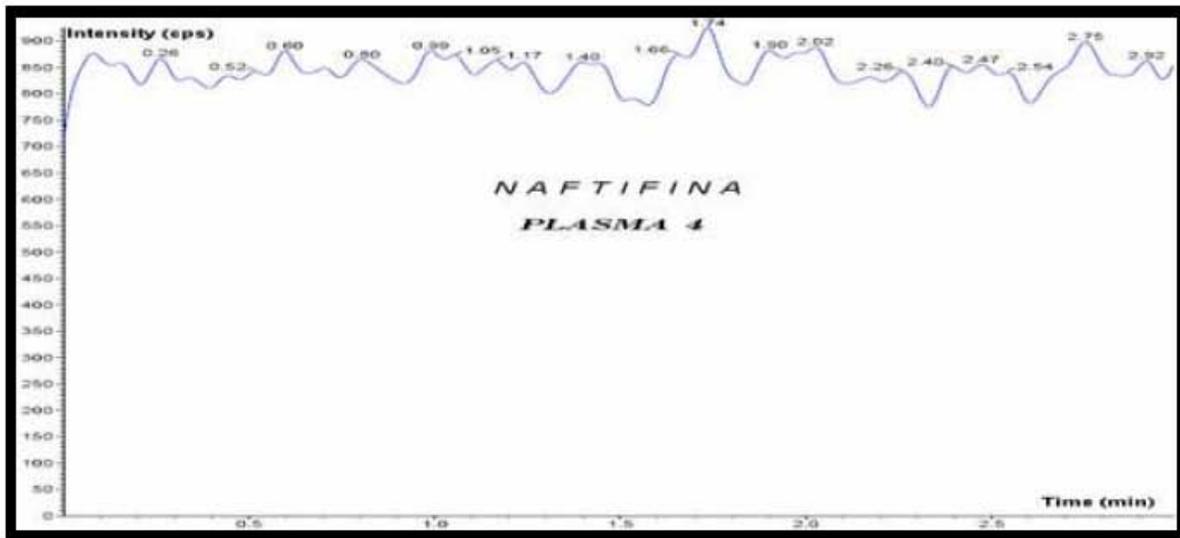


Figura 10. Cromatograma de la muestra blanco del voluntario 4.

La *tabla 6* presenta los resultados obtenidos del análisis de las muestras blanco provenientes de los seis donadores, el pool (mezcla de las seis muestras blanco), la muestra heparinizada y la muestra hemolizada. En ella se puede apreciar que las muestras 1, 2 y 4 así como las muestras de plasma hemolizado y heparinizado no presentan señal de área, para Terbinafina y Naftifina. En el caso de las muestras 3, 5 y 6, se presentan señales de área para Terbinafina, sin embargo, en ninguno de los casos, el área registrada por el equipo fue mayor al 20 % del área obtenida con una muestra plasmática (C1-P-10) de 10 ng/mL de Terbinafina, por lo que se concluye que el método es selectivo.

Tabla 6. Selectividad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina.

MUESTRA PLASMÁTICA	ÁREA ANALITO	CONCENTRACIÓN ANALITO (ng/mL)	ÁREA ESTÁNDAR INTERNO
POOL	0	N/A	0.00
PLASMA 1	0	N/A	0.00
PLASMA 2	0	N/A	0.00
PLASMA 3	395	N/A	0.00
PLASMA 4	0	N/A	0.00
PLASMA 5	629	N/A	0.00
PLASMA 6	832	N/A	0.00
PLASMA HEPARINIZADO	0	N/A	0.00
MTA HEMOLIZADA	0	N/A	0.00
BCO + IS	0	N/A	1280000
C1-P-10	33500	10.0	1330000

4.2 Linealidad

La *figura 11* muestra la relación entre la respuesta promedio y la concentración, obtenida de las tres curvas de calibración. Al hacer la regresión, se encontraron los siguientes parámetros: pendiente: 0.0033, ordenada al origen: -0.0176 y coeficiente de determinación de 0.9987 lo que indica que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

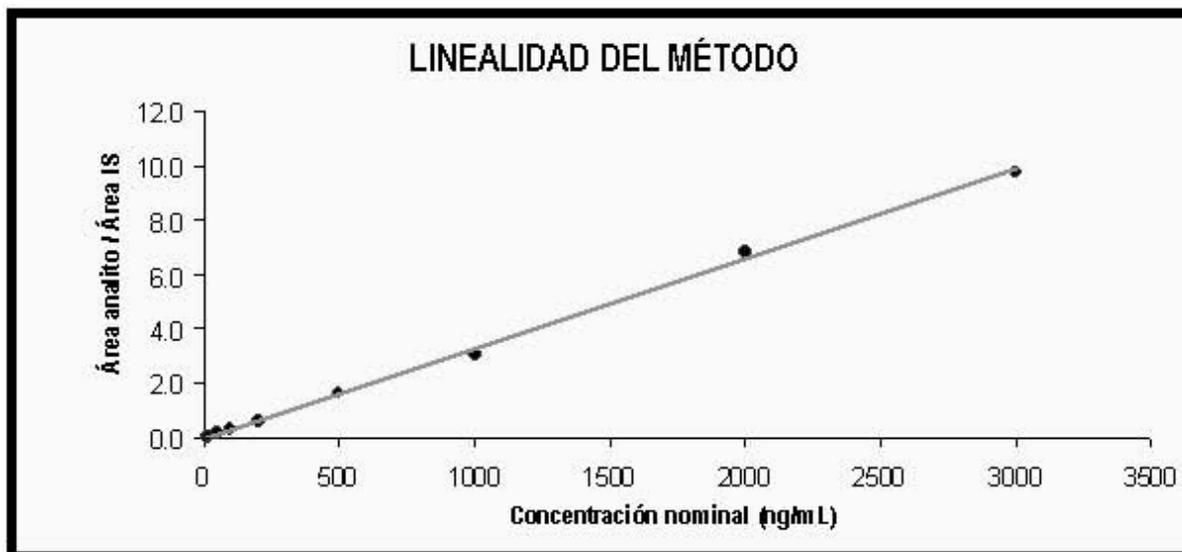


Figura 11. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.

En la *tabla 7* se presentan los valores individuales de la concentración recuperada de cada una de las curvas de calibración, así como su promedio (PROM), desviación estándar (DS), coeficiente de variación (CV) y el % de desviación absoluta (%D.ABS). Dado que en cada nivel de concentración los valores de desviación absoluta no fueron mayores al 15 %, la prueba de linealidad se acepta como válida.

Tabla 7. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.

CURVA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (ng/mL)								
	10	20	50	100	200	500	1000	2000	3000
1	9.990	20.200	48.600	101.000	196.000	519.000	945.000	2100.000	2990.000
2	9.930	20.200	50.000	105.000	194.000	492.000	944.000	2100.000	3010.000
3	10.000	20.200	48.600	101.000	193.000	525.000	934.000	2100.000	3010.000
PROM	9.973	20.200	49.067	102.333	194.333	512.000	941.000	2100.000	3003.333
DS	0.038	0.000	0.808	2.309	1.528	17.578	6.083	0.000	11.547
%CV	0.380	0.000	1.647	2.257	0.786	3.433	0.646	0.000	0.384
%D.ABS	0.267	1.000	1.867	2.333	2.833	2.400	5.900	5.000	0.111

4.3 Recobro

En la *tabla 8* se muestran los resultados del % de recobro obtenido para los puntos control a 30, 600 y 2500 ng/mL de Terbinafina. Como se observa, el porcentaje de recobro promedio fue del 73% y el coeficiente de variación para cada punto control fue menor al 15%, lo que indica que éste es reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 8. Porcentaje de recobro de Terbinafina.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)	FACTOR RESPUESTA EN PLASMA (FR)	FACTOR RESPUESTA EN SOLUCIÓN (FR)	% DE RECOBRO
30	0.099	0.142	69.569
30	0.099	0.139	
30	0.097	0.143	
PROMEDIO	0.098	0.141	
%CV	1.202	1.313	
600	2.135	2.957	72.109
600	2.139	2.948	
600	2.159	3.017	
PROMEDIO	2.144	2.974	
%CV	0.597	1.267	
2500	8.406	10.495	76.486
2500	8.022	10.642	
2500	8.095	10.925	
PROMEDIO	8.174	10.687	
%CV	2.495	2.043	
	PROMEDIO TOTAL		72.721
	%CV		4.256

4.4 Precisión

En las *tablas 9 y 10* se presentan los resultados de repetibilidad y reproducibilidad de los puntos control de Terbinafina a concentraciones de 30, 600 y 2500 ng/mL, En ellas se puede observar que los coeficientes de variación, para cada nivel de concentración, no exceden al 15% lo que indica que hay poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el método repetidas veces.

Tabla 9. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.

MUESTRA	CONCENTRACION RECUPERADA (ng/mL)		
	30	600	2500
1	29.900	651.000	2750.000
2	30.100	680.000	2660.000
3	30.700	648.000	2690.000
4	30.400	677.000	2630.000
5	31.500	674.000	2720.000
PROM	30.520	666.000	2690.000
D.E	0.626	15.248	47.434
C.V.%	2.051	2.289	1.763

Tabla 10. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.

DIA	REPLICA	CONCENTRACION RECUPERADA (ng/mL)		
		30	600	2500
1	1	29.900	651.000	2750.000
	2	30.100	680.000	2660.000
	3	30.700	648.000	2690.000
2	1	32.600	603.000	2660.000
	2	32.700	602.000	2540.000
	3	32.500	629.000	2480.000
3	1	30.800	682.000	2630.000
	2	29.400	617.000	2520.000
	3	29.500	657.000	2550.000
PROM		30.911	641.000	2608.889
D.E.		1.350	30.191	90.062
C.V.%		4.369	4.710	3.452

4.5 Exactitud

En la *tablas 11 y 12* se presentan los valores de % desviación absoluta de los puntos control derivados de la pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. En ellas se puede observar que los todos los valores son menores al 15 %, por lo que se concluye que el método es exacto.

Tabla 11. Exactitud del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en plasma.

RÉPLICA	REPETIBILIDAD		
	% DESVIACIÓN ABSOLUTA		
	30 ng/mL	600 ng/mL	2500 ng/mL
1	0.333	8.500	10.000
2	0.333	13.333	6.400
3	2.333	8.000	7.600
4	1.333	12.833	5.200
5	5.000	12.333	8.800
PROMEDIO	1.733	11.000	7.600

Tabla 12. Exactitud del método analítico para la cuantificación de Terbinafina en diferentes días.

DIA	REPLICA	REPRODUCIBILIDAD		
		% DESVIACIÓN ABSOLUTA		
		30 ng/mL	600 ng/mL	2500 ng/mL
1	1	0.333	8.500	10.000
	2	0.333	13.333	6.400
	3	2.333	8.000	7.600
2	1	8.666	0.500	6.400
	2	9.000	0.333	1.600
	3	8.333	4.833	0.800
3	1	2.666	13.666	5.200
	2	2.000	2.833	0.800
	3	1.666	9.500	2.000
PROMEDIO		3.037	6.833	4.356

4.6 Limite cuantificación

La *tabla 13* muestra los valores de concentración recuperada de cada una de las seis replicas analizadas, así como el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se puede observar que el valor se encuentra en el $\pm 20\%$ de la concentración nominal. Así mismo el coeficiente de variación de las seis determinaciones no fue mayor al 20%. Por lo anterior se consideró que el límite de cuantificación de terbinafina es de 10 ng/mL.

Tabla 13. Limite de cuantificación.

RÉPLICA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA
1	11.100
2	12.000
3	11.600
4	11.200
5	11.200
6	11.200
PROMEDIO	11.383
D.E	0.349
% CV	3.064

4.7 Estabilidad

En la *tabla 14*, se muestran los resultados de estabilidad de Terbinafina a largo plazo. En ella se puede observar que el porcentaje de desviación absoluta para cada nivel de concentración, no fue mayor al 15%, lo que indica que las muestras pueden almacenarse por periodos de hasta 107 días.

Los resultados de estabilidad de Terbinafina en ciclos de congelación-descongelación, *tabla 15*, muestran que las muestras pueden someterse a 3 ciclos de congelación descongelación sin que sufran degradación.

En la *tabla 16* se presentan los resultados de estabilidad a temperatura ambiente. Al analizar los resultados se encontró que las muestras pueden mantenerse durante de 6 h en la mesa de trabajo, sin que sufran degradación.

De los datos de estabilidad de de la muestra procesada que se presentan en la *tabla 17* se puede observar que las muestras pueden mantenerse en el automuestreador durante un período de 72 horas, por lo que es posible analizar un gran número de muestras en una misma corrida analítica.

Tabla 14. Estabilidad de Terbinafina en plasma en congelación.

PUNTOS CONTROL ANTES DE CONGELACIÓN			
CONCENTRACIÓN RECUPERADA (ng/mL)			
	30	600	2500
	26.7	587	2530
	26.1	544	2600
	27.3	565	2400
PROM	26.700	565.333	2510.000
%CV	2.247	3.803	4.043
PUNTOS CONTROL A 107 DIAS DE CONGELACIÓN			
	26.5	576	2780
	27.5	618	2540
	26	597	2670
PROM	26.667	597.000	2663.333
D.E	0.764	21.000	120.139
%CV	2.864	3.518	4.511
NOMINAL	30	600	2500
%D.ABS	0.125	5.601	6.109

Tabla 15. Estabilidad de Terbinafina en ciclos de congelación-descongelación.

PUNTOS CONTROL SIN CICLOS DE CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN			
CONCENTRACIÓN RECUPERADA (ng/mL)			
	30	600	2500
	31.700	665.000	2820.000
	31.900	673.000	2800.000
	32.700	674.000	2770.000
PROM	32.100	670.667	2796.667
D.E	0.529	4.933	25.166
%CV	1.648	0.736	0.900
PUNTOS CONTROL CON 3 CICLOS DE CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN			
	30.300	629.000	2690.000
	29.500	629.000	2670.000
	29.400	644.000	2750.000
PROM	29.733	634.000	2703.333
D.E	0.493	8.660	41.633
%CV	1.659	1.366	1.540
NOMINAL	30	600	2500
%D.ABS	7.373	5.467	3.337

Tabla 16. Estabilidad de Terbinafina a temperatura ambiente.

PUNTOS CONTROL SIN DESCONGELAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE POR 6 HORAS			
CONCENTRACIÓN RECUPERADA (ng/mL)			
	30	600	2500
	30.100	671.000	2560.000
	27.600	611.000	2630.000
	29.900	652.000	2620.000
PROM	29.200	644.667	2603.333
D.E	1.389	30.665	37.859
%CV	4.758	4.757	1.454
PUNTOS CONTROL A TEMPERATURA AMBIENTE POR 6 HORAS			
	32.500	582.000	2540.000
	33.100	607.000	2440.000
	27.800	635.000	2540.000
PROM	31.133	608.000	2506.667
D.E	2.902	26.514	57.735
%CV	9.322	4.361	2.303
NOMINAL	30	600	2500
%D.ABS	6.621	5.688	3.713

Tabla 17. Estabilidad de muestra procesada en el automuestreador.

PUNTOS CONTROL SIN PERMANECER EN AUTOMUESTREADOR			
CONCENTRACIÓN RECUPERADA (ng/mL)			
	30	600	2500
	31.700	581.000	2750.000
	30.600	601.000	2750.000
	29.700	607.000	2480.000
PROM	30.667	596.333	2660.000
D.E	1.002	13.614	155.885
%CV	3.266	2.283	5.860
PUNTOS CONTROL EN AUTOMUESTREADOR POR 72 HORAS			
	31.900	551.000	2460.000
	30.300	550.000	2770.000
	30.900	565.000	2560.000
PROM	31.033	555.333	2596.667
D.E	0.808	8.386	158.219
%CV	2.605	1.510	6.093
NOMINAL	30	600	2500
%D.ABS	1.196	6.875	2.381

4.8 Supresión iónica

La *figura 12* presenta el cromatograma de la prueba de supresión iónica para Terbinafina y Naftifina. Se observa que a los tiempos de retención de los analitos no se presenta ninguna inflexión de la línea que indique un efecto de supresión iónica causada por matriz biológica y/o fase móvil.

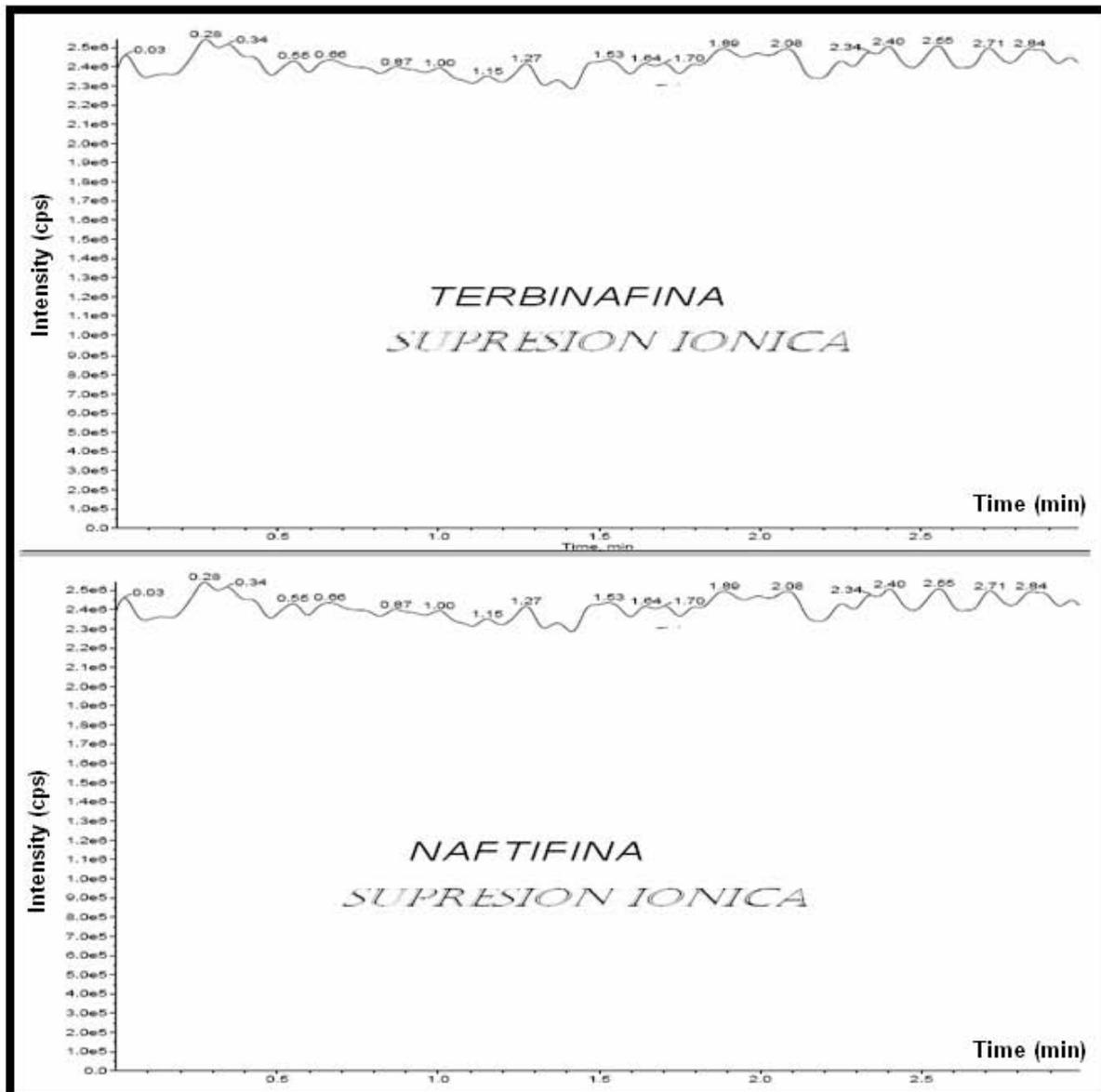


Figura 12. Supresión iónica.

4.9 Estudio preliminar de farmacocinética de Terbinafina en voluntarios sanos

El método desarrollado fue empleado en un estudio piloto de farmacocinética. Al analizar las muestras de los voluntarios se encontró que el método fue selectivo, ya que no se presentaron interferencias en el tiempo de retención de la Terbinafina o de la Naftifina. En la *figura 13* se presenta la gráfica promedio de concentración plasmática vs tiempo de los 10 voluntarios que participaron en el estudio mientras que en *tabla 18* se muestran los valores individuales de concentración plasmática a los tiempos de muestreo establecidos. En ella se puede observar que el rango de concentraciones de la curva de calibración (10–3000 ng/mL) fue adecuado, ya que permitió caracterizar el perfil plasmático de este fármaco en los voluntarios. La *tabla 19* muestra los parámetros farmacocinéticos individuales obtenidos, utilizando el modelo no compartimental del programa Win Non Lin. En ella se puede observar que el C_{max} promedio fue de 1567.2 ± 667.19 ng/mL; el T_{max} fue de 1.65 ± 0.85 h; el ABC_{0-72h} fue de 6028.48 ± 1780.33 (ng*h/mL); el ABC_{inf} fue de 6452.64 ± 1887.94 (ng*h/mL) y la $t_{1/2}$ de eliminación fue de 21 ± 8.39 h. De acuerdo a estos resultados, se puede observar, que los tiempos de muestreos seleccionados, son adecuados para caracterizar la farmacocinética de este fármaco en humanos.

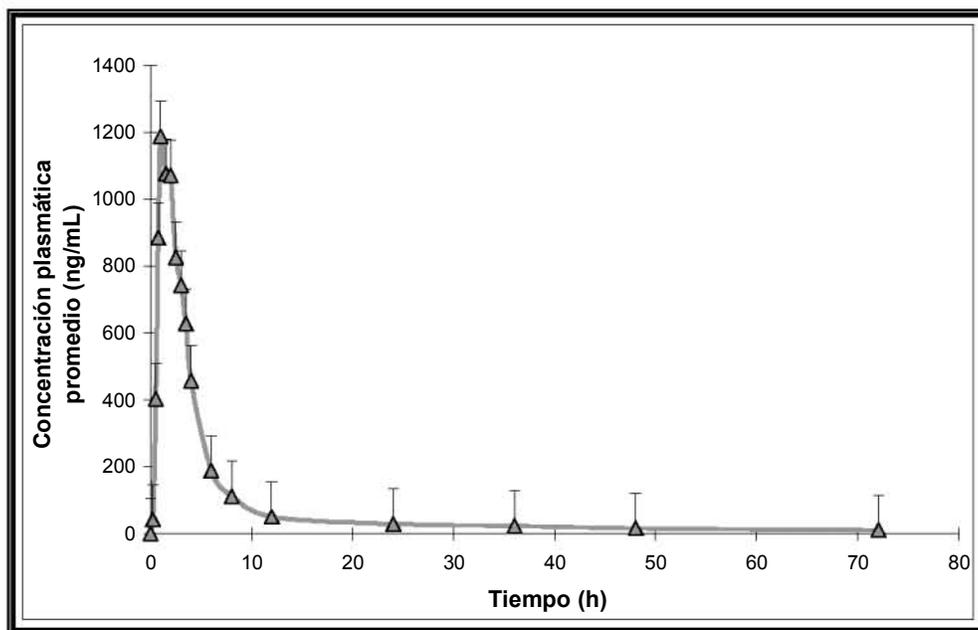


Figura 13. Valores promedio de concentración plasmática vs tiempo (\pm ee) después de la administración de 250 mg de Terbinafina a 10 voluntarios sanos.

Tabla 18. Valores individuales de concentración de Terbinafina en plasma (ng/mL) después de la administración de una dosis oral única de 250 mg a 10 voluntarios sanos.

CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (ng/mL)											
TIEMPO DE MUESTREO	SUJETO 1	SUJETO 2	SUJETO 3	SUJETO 4	SUJETO 5	SUJETO 6	SUJETO 7	SUJETO 8	SUJETO 9	SUJETO 10	PROMEDIO
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	51.2	0	70.1	0	12.2	46.9	172	0	61.7	33.9	40.75
0.5	839	369	1070	113	219	187	616	67.4	478	465	402.17
0.75	1650	921	2260	891	288	421	1050	123	926	1190	883.70
1	2060	1090	2710	1480	426	588	1540	232	1320	1610	1187.00
1.5	1320	884	2110	1520	640	812	1510	402	1120	1500	1074.50
2	891	732	1560	2470	1290	961	1230	401	1170	1070	1070.64
2.5	634	561	1050	1630	942	977	1030	345	923	988	825.68
3	505	609	746	1130	1190	851	1140	309	760	911	741.27
3.5	470	508	576	799	799	723	1160	605	591	656	626.41
4	475	393	435	669	617	600	341	452	426	607	456.27
6	188	149	181	200	264	313	175	261	161	168	187.82
8	116	79.1	112	163	150	211	59.7	133	92.9	98.1	111.16
12	46.3	41.5	83.5	71.6	58.1	85.1	24.5	32.1	35.8	53.1	49.42
24	22.8	24.3	60.5	48.2	23	24.2	17.1	13.8	19.5	32.7	28.19
36	15.5	20.5	44	30.3	20.6	25.8	14.8	10.5	13.1	18.4	22.68
48	10.4	14.95	30	23.8	10.2	14.2	0	0	0	15.7	15.20
72	0	0	18.3	11.9	0	0	0	0	0	0	9.29

Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos de Terbinafina después de la administración oral de una dosis única de 250 mg a 10 voluntarios sanos.

SUJETO	VIDA MEDIA (h)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng.h/mL)	AUC _{0-∞} (ng.h/mL)
1	21.19	1	2060	5527.70	5845.68
2	34.25	1	1090	4410.23	5148.85
3	27.03	1	2710	8810.63	9524.24
4	23.41	2	2470	8405.88	8807.75
5	15.61	2	1290	5518.50	5748.16
6	7.4	2.5	977	5921.23	6072.79
7	33	1.5	1540	7559.85	8264.55
8	14.89	3.5	605	3145.43	3370.93
9	16.55	1	1320	4875.63	5188.36
10	20	1	1610	6109.73	6555.05
PROM	21.299	1.65	1567.2	6028.48	6452.64
DS	8.39	0.85	667.19	1780.33	1887.94

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por De Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE (6) y Almeida S (7), se encontró que los valores son similares, lo que indica que la farmacocinética en población mexicana es semejante a otras poblaciones.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos acoplado a masas para la cuantificación de Terbinafina en plasma. Para ello se utilizó un volumen de 200 μ L de plasma, una columna Phenomenex Gemini C₁₈ y metanol-ácido fórmico-acetato de amonio como fase móvil.

El método desarrollado fue:

- Lineal, preciso, exacto y selectivo en el rango de concentraciones de 10-3000 ng/mL.
- Sensible, con un límite de cuantificación de 10 ng/mL.
- Los analitos en plasma son estables a -70 ° C por un período de 107 días.
- Rápido ya que el tiempo de retención de Terbinafina es de 1.95 minutos, por lo que pueden analizarse hasta 6 voluntarios por día.
- Apropiado para el análisis de las muestras plasmáticas de voluntarios sanos a los que se les administró una dosis de 250 mg de Terbinafina.

El método puede ser utilizado para llevar a cabo estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y/o bioequivalencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. The Index Merck. 13ª Edición, Merck Co. Inc., 2001, pp. 9232.
2. Velasco A. Farmacología Fundamental. McGraw-Hill, 2003, pp. 822,823,828.
3. A. Rahman, M. Susan, C. Milap, Oral Terbinafine: a new antigungal agent. *Ann. Pharmacother.* (1997) 31:445-456.
4. Martindale: The Complete Drug Reference, 34ª Edición, The Pharmaceutical Press, 2005, pp.408,409.
5. PDR Generics. 4ª Edición, Medical Economics Company, 1998, pp. 2297-99.
6. De Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, et al., Terbinafine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study. *Therapeutic Drug Monitoring.* (2001) 23:709-716.
7. Almeida S, Felipe A, et al., Comparative bioavailability of two formulations of terbinafine-Data from a cross-over, randomised, open-label bioequivalence study in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research.* (2004) 54:757-762.
8. Brignol N, Bakhtiar R, et al., Quantitative analysis of terbinafine (Lamisil) in human and minipig plasma by liquid chromatography coupled mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry,* (2000) 14:141-149.
9. Denouel J, Keller H.P, et al., Determination of terbinafine and its demethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B. Biomedical Application,* (1995) 663:353-359.

10. Secretaria de Salud. NOM-177-SSA1-1998 **Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y los requisitos a los que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.** Diario Oficial de la Federación, 7 de mayo de 1999.

11. An Introduction to Mass Spectrometry
<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>

12. Mass Spectrometry
http://instruct.uwo.ca/chemistry/362b/12_MS.pdf

13. An Introduction to Mass Spectrometry
<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>

14. Mass Spectrometry Glossary of Terms
www.specstrocopynow.com

15. Introduction to Mass Spectrometry
<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/analytic/ac-meths.htm>

16. Martindale: The Complete Drug Reference
<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>

17. Aditya K y Neil H. Terbinafine: An update. Journal of the American Academy Dermatology. (1997) 37:979-88.

18. Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of Terbinafine and Itraconazole. Journal of the American Academy Dermatology. (1998) 38:(part3)

19. Alison E, Vickers R, et. al. Multiple Cytochrome P-450s Involved in the Metabolism of Terbinafine Suggest a Limited Potential for Drug-Drug Interactions. *Drug Metabolism and Disposition*. (1999) 27:1029-38.

20. Osborne CS, Leitner I, et. al. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2006) 50:2234-2236.

21. FDA. **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**. US Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM, mayo 2001.