



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR OXICODONA EN PLASMA HUMANO, MEDIANTE
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADO A
UN DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MASAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SAÚL PORTILLO PÉREZ



MÉXICO, D. F.

2008



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	Ricardo Rodríguez Sáenz
1er suplente	Maria De Los Dolores Campos Echeverría
2do suplente	Lauro Misael Del Rivero Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

ICT S.A. DE C.V.

Asesor:

Helgi Helen Jung Cook

Sustentante:

Saúl Portillo Pérez

La dicha del hombre se llama "Yo quiero". F. Nietzsche

La paciencia es un árbol cuya raíz es amarga y cuya fruta es muy dulce.

Nada es imposible: hay vías para llevarnos a todas las cosas. Si tuviéramos bastante voluntad, siempre tendríamos bastantes medios. Rochefoucauld

El que teme a la muerte nunca hará el papel de hombre vivo. Seneca

La peor rueda del carro es la que siempre chilla.

Los indecisos pierden la mitad de su vida, los enérgicos la duplican.

Se juzga que un hombre es capaz de cosas grandes por la atención que dedica a las pequeñas. Tacito

Cuando uno deja de aprender, deja de escuchar, deja de mirar y de hacer preguntas, preguntas nuevas, entonces es tiempo de morir. Lilian Smith

La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen mal, sino por las que se sientan a ver lo que pasa. Albert Einstein

No es porque las cosas son difíciles que no nos atrevemos; es por que no nos atrevemos que son difíciles. Seneca

Nunca he encontrado una persona tan ignorante que no se pueda aprender algo de ella. Galileo Galilei

El hombre inteligente no es el que tiene muchas ideas, sino el que sabe sacar provecho de las pocas que tiene.

Para cambiar es necesario saber; para saber hay que aprender; y para aprender hay que hacer grandes sacrificios. Samuel Aun Weor

La ciencia se puede aprender de memoria, pero la sabiduría no. Lawrence Sterne

No es necesario derramar una sola gota de sudor para postergar hacer cualquier cosa.

Solo los inseguros ansían la seguridad.

Toda la teoría del universo esta dirigida infaliblemente hacia un solo individuo, y éste eres TÚ. Walt Whitman

Si estoy triste es que dudo de mí y lo que es peor dudo de Dios.

Las cicatrices de la experiencia forman el carácter.

La integridad del hombre se mide por su conducta, no por su profesión.

Para Moni, Edith, Astrid y Macaria.

Agradezco a mis padres por su apoyo, cariño y paciencia, a la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante la Facultad de Química que me brindo la oportunidad de forjarme en sus aulas para lograr una mejor sociedad, a todos mis profesores, en especial a la Dra. Helgi Jung que me brindo todo su apoyo y tiempo para poder concluir el presente trabajo y a la Maestra Socorro Alpizar que gracias a su apoyo logre concluir mis estudios.

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES	
2.1 Monografía de Oxycodona	2
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	2
2.1.2 Farmacología.....	4
2.1.3 Farmacocinética.....	4
2.1.4 Farmacodinamia.....	7
2.1.5 Indicações.....	8
2.1.6 Contraindicaciones.....	8
2.1.7 Dosis.....	8
2.1.8 Presentaciones comerciales.....	9
2.1.9 Reacciones adversas.....	9
2.1.10 Métodos analíticos para la cuantificación de oxycodona.....	10
2.2 Normatividad mexicana para estudios de intercambiabilidad.....	12
2.3 Validación de métodos bioanalíticos.....	12
2.3.1 Selectividad.....	12
2.3.2 Exactitud.....	13
2.3.3 Precisión.....	13
2.3.3.1 Repetibilidad.....	13
2.3.3.2 Reproducibilidad intralaboratorio.....	13
2.3.4 Recuperación absoluta.....	14
2.3.5 Linealidad.....	14
2.3.6 Limite de cuantificación.....	14
2.3.7 Estabilidad.....	14
2.4 Fundamentos de espectrometría de masas.....	16
2.4.1 Introducción de la muestra.....	18
2.4.2 Métodos de ionización.....	18
2.4.2.1 Ionización por electrospray.....	20
2.4.2.2 Disolventes para electrospray.....	23
2.4.3 Analizadores de masas.....	24

2.4.3.1 Sector magnético.....	24
2.4.3.2 Analizador TOF.....	24
2.4.3.3 Analizador ICR.....	25
2.4.3.4 Cuadrupolo.....	25
2.4.4 Detectores.....	28
2.4.5 Espectrometría de masas en Tandem.....	29
2.4.6 Determinación cuantitativa de especies moleculares.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Reactivos, material y equipo.....	32
3.2 Preparación de soluciones.....	33
3.3 Preparación de soluciones estándar, curva de calibración y puntos control de oxycodona.....	34
3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de oxycodona en plasma humano.....	39
3.4.1 Ionización.....	39
3.4.2 Fase móvil.....	39
3.4.3 Selección de solvente de extracción y estándar interno.....	40
3.4.4 Método de extracción de fluido biológico	41
3.5 Justificación de utilizar concentraciones de oxycodona en solución diluyente al doble que las de concentración en plasma.....	41
3.6 Validación del método analítico.....	42
3.6.1 Selectividad.....	42
3.6.2 Supresión iónica.....	43
3.6.3 Recobro absoluto.....	44
3.6.4 Linealidad.....	44
3.6.5 Precisión.....	45
3.6.5.1 Repetibilidad.....	45
3.6.5.2 Reproducibilidad.....	46
3.7 Exactitud.....	46
3.8 Limite de cuantificación.....	46
3.9 Efecto de dilución.....	47
3.10 Estabilidad.....	47

3.10.1 Estabilidad a largo plazo.....	47
3.10.2 Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación.....	48
3.10.3 Estabilidad a temperatura ambiente.....	49
3.10.4 Estabilidad de la muestra procesada.....	50
3.10.5 Estabilidad de la muestra reinyectada.....	51
3.10.6 Estabilidad de la muestra evaporada.....	51
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1 Espectros de ionización de la oxycodona y metoprolol.....	53
4.2 Selección de solvente de extracción y estándar interno.....	54
4.2 Tiempo de retención de oxycodona y metoprolol.....	55
4.3 Selectividad.....	55
4.4 Supresión iónica.....	60
4.5 Recobro.....	61
4.6 Linealidad.....	62
4.7 Precisión.....	64
4.8 Exactitud.....	66
4.9 Limite de cuantificación.....	67
4.10 Efecto de dilución.....	68
4.11 Estabilidad.....	69
5. CONCLUSIONES.....	73
6. BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Medicamentos comercializados actualmente en México, que contienen oxycodona.....	9
Tabla 2.2 Muestra los tipos de fuente de ionización más utilizados.....	19
Tabla 3.1 Soluciones stock de oxycodona en solución diluyente.....	36
Tabla 3.2 Metodología utilizada para preparar los puntos de la curva de calibración y los puntos control en plasma humano.....	37
La tabla 3.3 Metodología utilizada para preparar los puntos de la curva de calibración y los puntos control en solución diluyente.....	38
Tabla 3.4 Muestra las condiciones en las que operara el espectrómetro de masas para identificar la oxycodona y el metoprolol.....	39
Tabla 3.5 Muestra las diferentes proporciones de solventes orgánicos utilizados para seleccionar el más adecuado para la extracción.....	40
Tabla 4.1 Muestra diferentes combinaciones de solventes orgánicos probados y el coeficiente de variación para cada analito.....	54
Tabla 4.2 Muestra el coeficiente de variación de la cuantificación de los candidatos a estándar interno.....	54
Tabla 4.3 Por ciento de recobro de oxycodona y estándar interno.....	61
Tabla 4.4 Curvas de calibración en plasma para determinar la linealidad.....	62
Tabla 4.5 Linealidad del método analítico para la cuantificación de oxycodona en plasma (global).....	63
Tabla 4.6 Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de oxycodona.....	64
Tabla 4.7 Reproducibilidad del método analítico en tres días diferentes para un analista.....	64
Tabla 4.8 Reproducibilidad del método analítico entre tres analistas diferentes...	65
Tabla 4.9. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona en plasma.....	66
Tabla 4.10. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona en diferentes días.....	66
Tabla 4.11. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona entre tres diferentes analistas.....	67
Tabla 4.12 Limite de cuantificación.....	68

Tabla 4.13 Efecto de dilución del control alto.....	68
Tabla 4.14 Estabilidad de la muestra a largo plazo 313 días.....	70
Tabla 4.15 Estabilidad en cinco ciclos de congelación-descongelación.....	70
Tabla 4.16 Estabilidad a temperatura ambiente 113 horas.....	71
Tabla 4.17 Estabilidad de la muestra procesada 22horas.....	71
Tabla 4.18 Estabilidad de la muestra reinyectada 17 horas.....	72
Tabla 4.19 Estabilidad de la muestra evaporada 25 horas.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura química de la oxycodona.....	2
Figura 2.2 Muestra el espectro ultravioleta en solución acida.....	3
Figura 2.3 Muestra el espectro infrarrojo de la oxycodona.....	3
Figura 2.4 Muestra el espectro de masas de la oxycodona.....	4
Figura 2.5 Diferentes metabolitos de la oxycodona.....	6
Figura 2.6 Muestra en forma esquemáticamente las principales componentes de los espectrómetros de masas.....	17
Figura 2.7 Esquema general de una ionización por electrospray.....	20
Figura 2.8 Cono de Taylor	21
Figura 2.9 Reducción de tamaño de gota en ESI.....	21
Figura 2.10 Proceso de ionización por electrospray.....	22
Figura 2.11. Analizador de masas del tipo Cuadrupolo.....	26
La figura 2.12 muestra un diagrama esquemático de un arreglo de las barras de un cuadrupolo.....	28
Figura 2.13 Muestra el arreglo de un sistema triple cuadrupolo.....	30
Figura 4.1 Muestra el espectro de ionización de la oxycodona.....	53
Figura 4.2 Muestra el espectro de ionización para el metoprolol	53
Figura 4.3 Cromatograma que muestra el tiempo de retención de la oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	55
Figura 4.4 Cromatograma de la muestra blanco de un voluntario, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	56
Figura 4.5 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-EDTA, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	56
Figura 4.6 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-heparina, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	57
Figura 4.7 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-hemolizado, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	57
Figura 4.8 Cromatograma de la muestra blanco del pool de plasma, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	58
Figura 4.9 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-estándar interno, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).....	58

Figura 4.10 Cromatograma de la muestra blanco del pool adicionada de oxicodona a la concentración de 0.25ng/mL (izquierda) y metoprolol a 250ng/mL (derecha).....59

Figura 4.11 Cromatograma de la muestra blanco de plasma hemolizado adicionada de oxicodona a la concentración de 0.25 ng/mL (izquierda) y metoprolol a 250 ng/mL (derecha).....59

Figura 4.12 Cromatograma del blanco de la prueba de supresión iónica.....60

Figura 4.13 Cromatograma de oxicodona y el estándar interno de la prueba de supresión iónica.....60

Figura 4.14 Linealidad del método analítico para la cuantificación de oxicodona en plasma.....63

INTRODUCCIÓN



La oxycodona es un fármaco opiode semisintético derivado de la tebaína, utilizado en la práctica clínica a partir de 1917. Su principal propiedad de valor terapéutico es su acción analgésica y su efecto sedante. El mecanismo exacto de acción no es completamente conocido, aunque se cree que actúa inhibiendo selectivamente la liberación de neurotransmisores de las terminaciones nerviosas aferentes que conducen estímulos dolorosos. Además, la oxycodona es un agonista de los receptores de opioides Mu y en menor medida de los Kappa.

La oxycodona se puede administrar por vía oral, subcutánea o intravenosa.

En México, actualmente se comercializan, para su administración oral, tres productos: ENDOCODIL: Tabletas de liberación rápida, en dosis de 5,10, 20 y 40 mg, OXYCONTIN: Tabletas de liberación prolongada, en dosis de 10, 20 y 40 mg y, PLEXICODIM: Tabletas de oxycodona y paracetamol en dosis de 5 mg y 325 mg respectivamente.

Dado el amplio uso de este fármaco y el tipo de padecimientos en el que se utiliza, es importante determinar la biodisponibilidad de los productos comerciales conteniendo este fármaco.

Aunado a ello, los cambios en la normatividad de nuestro país, establecen que los productos farmacéuticos deberán registrarse cada 5 años. Así mismo se establece que la documentación de registro deberá incluir los datos de farmacocinética o bioequivalencia.

Con base en lo mencionado anteriormente y dada la importancia de la oxycodona en la práctica clínica, se llevó a cabo el presente trabajo cuyo objetivo fue:

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar oxycodona en plasma humano, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas (LC-MS-MS).



2.1 Monografía de Oxycodona

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de oxycodona⁽¹⁾

Sinónimos. 7,8-Dihidro-14-hidroxicodeinona; Dihidrona; Oxicona; NSC-19043.

(5 α)-4,5-Epoxi-14-hidroxi-3-metoxi-17-metilmorfinano-6-ona

$C_{18}H_{21}NO_4=315.4$

CAS—76-42-6

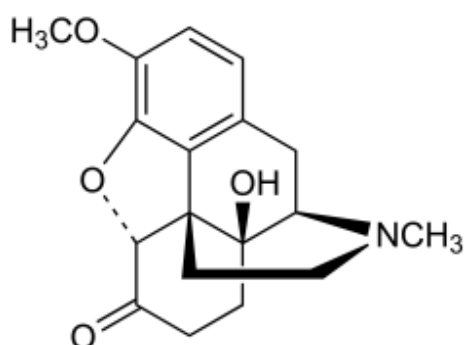


Figura 2.1 Estructura química de la oxycodona.

Punto de fusión: 218°- 220° (en alcohol).

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua y éter; soluble en metanol y cloroformo.

Clorhidrato de Oxycodona

$C_{18}H_{21}NO_4HCl,=351.82$

Descripción: Cristales o polvo blanco o casi blanco, inodoro e higroscópico.

Punto de fusión: 270°- 272° con descomposición.

Solubilidad: Soluble 1 en 10 de agua, 1 en 60 de etanol, y 1 en 600 de cloroformo; prácticamente insoluble en éter.

Constante de disociación

pK_a 8.9 (20°).

Coefficiente de partición

Log P (octanol/agua), 0.7.

Espectro ultravioleta.

Solución acuosa acida—280 nm ($A^1_{1\text{cm}}=44a$).

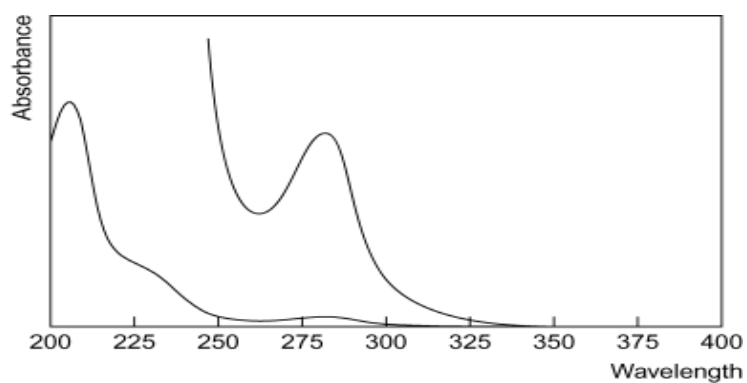


Figura 2.2 Muestra el espectro ultravioleta de la oxycodona en solución acida.

Espectro infra-rojo.

Picos principales en números de onda 1719, 1501, 1033, 1255, 934, 980 cm^{-1} (Disco de KBr).

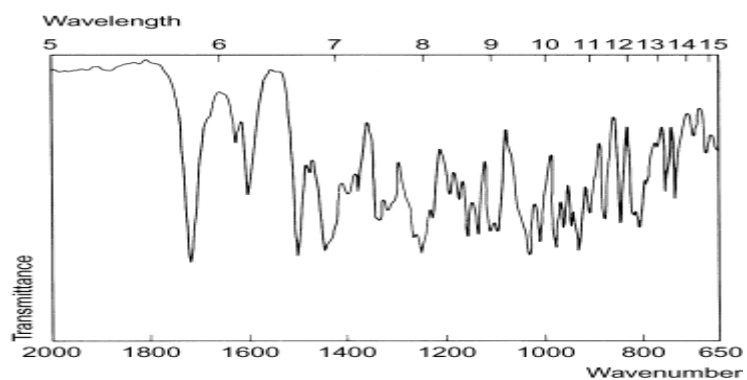


Figura 2.3 Muestra el espectro infra-rojo de la oxycodona.



Espectro de masas.

Iones principales en m/z 315, 230, 316, 70, 44, 42, 258, 140.

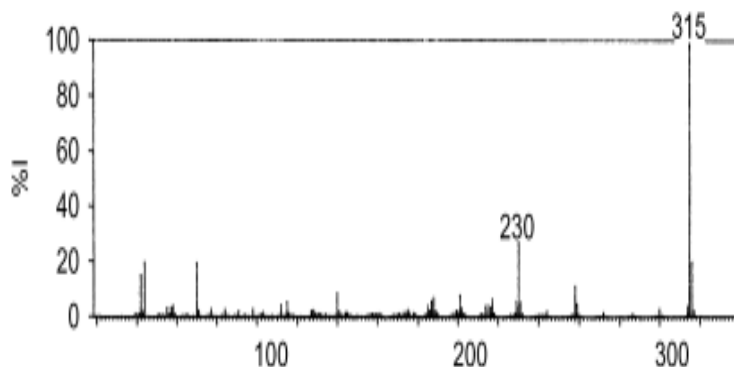


Figura 2.4 Muestra el espectro de masas de la oxycodona.

2.1.2 Farmacología

El ingrediente analgésico, oxycodona, es un fármaco semi-sintético con múltiples efectos cualitativamente similares a los de la morfina, los más prominentes de estos efectos envuelven el sistema nervioso central y órganos compuestos de músculo liso. La oxycodona, como clorhidrato, es un agonista puro cuyo efecto terapéutico principal es la analgesia y ha sido utilizado clínicamente desde 1917. Como todo agonista opioide puro, no existe un límite del efecto de analgesia, tal como se muestra con agonistas parciales o analgésicos no opiodes. ⁽²⁾

2.1.3 Farmacocinética

Las sustituciones de los grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 6 de la morfina alteran de manera significativa las propiedades farmacocinéticas. La sustitución del hidroxilo por el metilo en el carbono 3, reduce la susceptibilidad al metabolismo hepático de primer paso de la molécula mediante conjugación con glucurónido en esta posición ⁽³⁾. Por lo tanto la oxycodona tiene altas proporciones de potencia oral:parenteral debido a que es parcialmente protegida de su conjugación y como resultado su biodisponibilidad es mayor (60-87%). La biodisponibilidad no se afecta por la ingesta de alimentos ⁽⁴⁾ o la edad (ancianos) ⁽⁵⁾ y, por tanto, sus concentraciones plasmáticas presentan menor variabilidad que las de morfina.



La oxicodona se absorbe en el tracto gastrointestinal. Se metaboliza en el hígado a noroxicodona, noroximorfona, alfa-noroxicodol y beta-noroxicodol a través de las isoenzimas de la familia CYP3A del citocromo P450 y, en menor grado, a oximorfona, alfa-oximorfol y beta-oximorfol a través del CYP2D6, otros metabolitos son el alfa y beta-oxicodol productos de la 6-cetorreducción ⁽⁶⁾. En la figura 2.5 se presenta la vía metabólica de la oxicodona. En la insuficiencia hepática hay una alteración relevante de la enzima que obliga a la reducción de la dosis. El gen CYP2D6 tiene tres mutaciones posibles, los pacientes que presenten alguna de ellas son más susceptibles a toxicidad por oxicodona. ⁽⁷⁾ La eliminación es por vía renal, el 8-14% en forma de oxicodona y el resto como noroxicodona y oximorfona, ambas conjugadas con ácido glucurónico. La eliminación renal del fármaco se reduce ligeramente en personas mayores de 65 años, por lo que no es necesario reducir dosis. Lo anterior justifica la sustitución de morfina por oxicodona en casos de insuficiencia renal moderada ⁽⁸⁾. En insuficiencia hepática o renal grave es necesaria la reducción de la dosis. La vida media de eliminación es de 3-5 horas, se alcanzan niveles plasmáticos estacionarios a las 24-36 horas ⁽⁹⁾, y su unión a proteínas plasmáticas es del 38-45% ⁽¹⁰⁾. La oxicodona se distribuye en la leche materna.

La formulación de oxicodona de liberación controlada (Oxicontin de ASOFARMA ^(11,38)) combina las características de un sistema de liberación inmediata y prolongada en un mismo comprimido (sistema Acrocontin, de dos polímeros hidrófobos en una matriz dual única). Su patrón de absorción gastrointestinal es bifásico: una fase de absorción inmediata y rápida (38% del comprimido) de una hora de duración con un pico plasmático a los 37 minutos; posteriormente una segunda fase de liberación lenta (62% restante) que alcanza niveles plasmáticos más elevados en el plazo de 6,2 horas ⁽¹²⁾. Entre 15 minutos a dosis altas y 45 minutos a dosis bajas, el 75% de los pacientes comienzan a notar alivio del dolor ⁽¹³⁾. De esta forma, a pesar de ser de liberación retardada, tiene una fase inicial que hace innecesaria la administración simultánea del mismo fármaco en forma de



comprimido de liberación inmediata, como ocurre en la práctica diaria en el paso de morfina de liberación inmediata a morfina de liberación controlada.

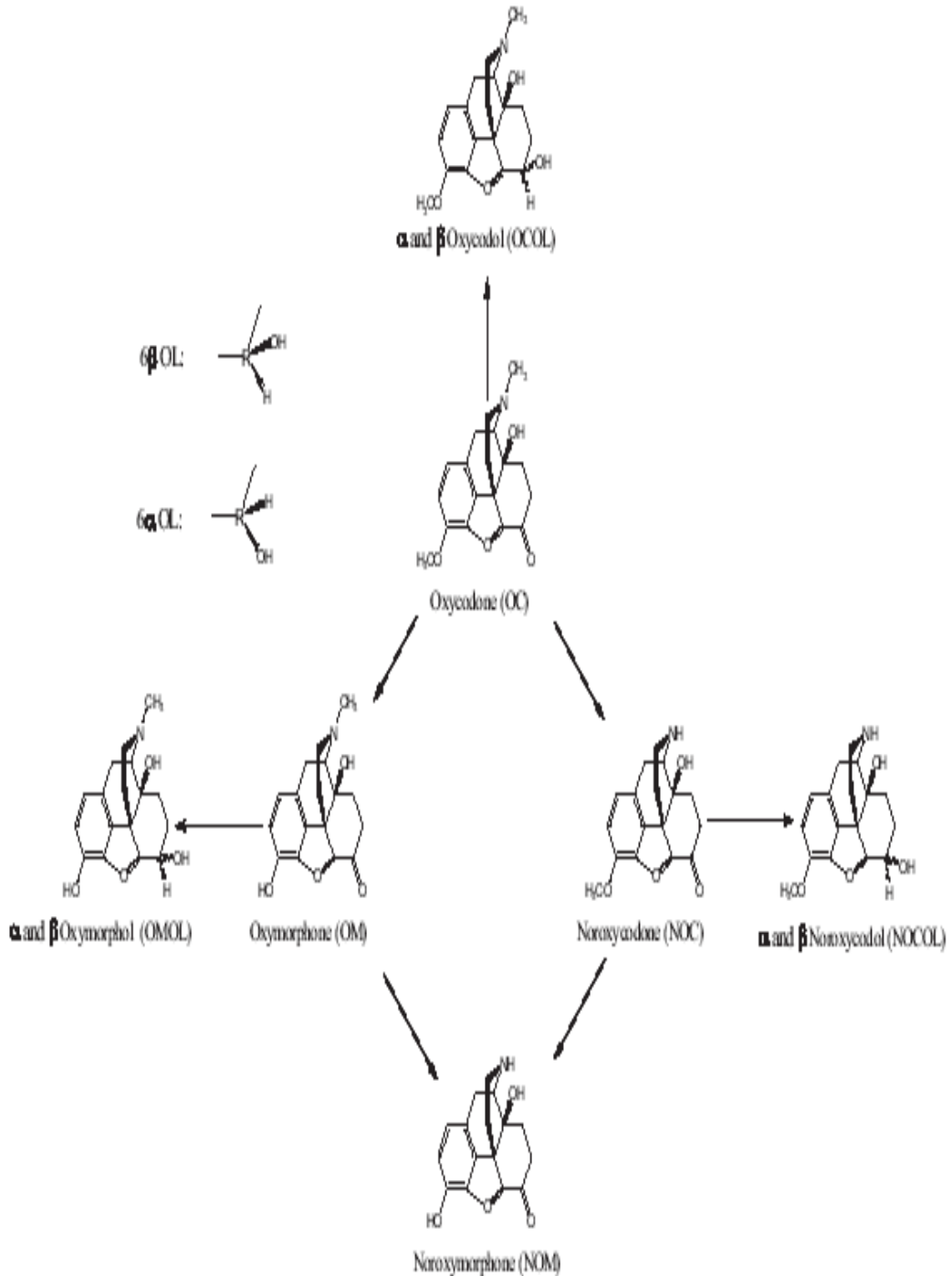


Figura 2.5 Diferentes metabolitos de la Oxycodona



2.1.4 Farmacodinamia

La oxycodona produce analgesia al unirse a receptores específicos ubicados de manera principal en regiones del cerebro y medula espinal implicadas en la transmisión y modulación del dolor. En diversos sitios del sistema nervioso y en otros tejidos se han identificado tres clases principales de receptores de opiodes los cuales son mu, kappa y delta, los cuales pertenecen a la familia de los que se acoplan a proteínas G.

La analgesia, así como las propiedades eufóricas, depresoras respiratorias y dependencia física (efectos agonistas típicos) resultan de manera fundamental de las acciones sobre los receptores mu. Así mismo, pueden contribuir a la analgesia, en particular a nivel espinal, los receptores delta y kappa, aunque es incierto en que grado contribuyen al efecto analgésico⁽³⁾.

La oxycodona derivado fenantrénico agonista leve a moderado de receptores mu y kappa ⁽¹⁴⁾. No obstante existe controversia respecto a este tema, ya que hay autores que postulan que el efecto analgésico es debido a la acción agonista sobre receptores kappa o mu ⁽¹⁵⁾ y otros indican que la acción analgésica se debe a la acción simultánea de ambos receptores ^(16,17). Parte de la actividad intrínseca antinociceptiva de oxycodona en la rata es mediada por los receptores opioides kappa y es reversible con naloxona ⁽¹⁴⁾, tal y como confirman los hallazgos de Davis y cols., en el 2003 ⁽¹⁸⁾. Esta circunstancia permite plantear la hipótesis de que la administración concomitante de morfina (acción agonista mu) y oxycodona (acción agonista kappa) podría aumentar los efectos analgésicos, disminuyendo la sedación con respecto a la administración por separado de los dos fármacos. Ross y cols. demuestran esta sinergia antinociceptiva en un modelo animal con ratas ⁽¹⁹⁾. Lauretti y cols., en un estudio doble-ciego, aleatorizado y cruzado con 22 pacientes, evaluaron la combinación de morfina con oxycodona en formulaciones de liberación retardada, para el tratamiento del dolor oncológico comparado con la administración de morfina sola. Comprobaron que la combinación es sinérgica y que tiene un perfil analgésico mejor y con menor incidencia de emesis.⁽²⁰⁾



2.1.5 Indicaciones

La oxycodona está indicada para el cuidado del dolor moderado a severo, donde el uso de un analgésico opiáceo es adecuado durante más de unos pocos días⁽³⁸⁾.

2.1.6 Contraindicaciones

La oxycodona no debe utilizarse en pacientes con hipersensibilidad conocida a la misma, o en cualquier situación en que los opiáceos están contraindicados. Esto incluye a pacientes con significativa depresión respiratoria (en cuadros sin control o en ausencia de equipo de resucitación) y en pacientes con asma bronquial o hipercapnia aguda o severa. La oxycodona no está aprobada en pacientes menores de 18 años, en el embarazo y la lactancia⁽³⁸⁾.

2.1.7 Dosis

El clorhidrato de oxycodona se administra por vía oral, subcutánea o intravenosa para aliviar el dolor moderado a intenso. Una dosis habitual de inicio para el dolor intenso en pacientes nunca tratados con opiodes es de 5mg cada 4 a 6 horas, que se incrementará posteriormente en caso necesario según la respuesta. En pacientes que han recibido un analgésico opiode potente, la dosis inicial de oxycodona debe basarse en las necesidades diarias de opiodes; los fabricantes del Reino Unido indican que 10mg de oxycodona por vía oral equivalen aproximadamente a 20mg de morfina por vía oral. La mayoría de los pacientes no necesitarán más de 400mg/día. También se utilizan preparaciones que contienen oxycodona y ácido acetilsalicílico o paracetamol. La oxycodona puede administrarse también como preparado de liberación modificada, cada 12 horas por vía oral.

Las dosis intravenosas de oxycodona oscilan entre 1 y 10mg, administrados en 1 a 2 minutos, y se repiten con una frecuencia no superior a 4 horas; la dosis inicial recomendada como perfusión intravenosa es de 2mg/hora. La vía intravenosa también puede utilizarse para la analgesia controlada por el paciente. Por vía subcutánea, la dosis inicial es de 5mg cada 4 horas; las perfusiones por vía subcutánea deben iniciarse con 7.5mg/día en pacientes nunca tratados con



opioides. Para cambiar de oxycodona por vía oral a vía parenteral, los fabricantes del Reino Unido advierten, como guía, que 2 mg de oxycodona por vía oral equivalen aproximadamente a 1mg de oxycodona por vía parenteral⁽²¹⁾.

2.1.8 Presentaciones comerciales en México

Actualmente en México la oxycodona está clasificada como analgésico y estupefaciente del Grupo I, conforme a los artículos 226, Fracción. I, 234, 240, 241 y 242 de la Ley General de Salud ⁽²²⁾y presenta tres registros los cuales se presentan en la tabla 2.1

Tabla 2.1 Medicamentos comercializados actualmente en México, que contienen oxycodona.

NOMBRE COMERCIAL	LABORATORIO REGISTRO No.	GENÉRICO	CONCENTRACIÓN
ENDOCODIL (Tabletas)	PSICOFARMA, S.A. DE C. V. Reg. No. 003M2006 SSA	Clorhidrato de oxycodona	5,10, 20 y 40 mg
OXYCONTIN (Tabs. de Lib.prolong.)	ASOFARMA DE MÉXICO, S.A. DE C. V. Reg. No. 387M97 SSA	Clorhidrato de oxycodona	10, 20 y 40 mg
PLEXICODIM (Tabletas)	LABORATORIOS PISA, S.A. DE C. V. Reg. No. 004M2003 SSA	Clorhidrato de oxycodona Paracetamol	5 mg 325 mg

2.1.9 Reacciones adversas

Las reacciones adversas que presenta la oxycodona son típicas de los opioides y muchas de ellas responden a una disminución de dosis como ocurre con la morfina. Somnolencia 37%, náuseas 32%, vómitos 8%, mareo 12%, cefalea 7%, prurito 5% y ortostatismo 5% ⁽²³⁾. Una sobredosis puede conducir a hipotensión, depresión respiratoria y paro cardíaco ⁽²⁴⁾. Otros efectos secundarios de incidencia menor al 1% son: secreción inadecuada de ADH, alergia, palpitaciones, retención urinaria, amenorrea e impotencia ⁽¹¹⁾. La Oxycodona tiene un perfil de abuso similar a la de otros agonista opioides potentes, por lo que puede ser objeto de búsqueda y abuso por personas con alteraciones latentes o manifiestas de adicción.



Los comprimidos de liberación prolongada no deben romperse, masticarse o triturarse ya que ello puede dar lugar a una sobredosis ⁽¹¹⁾. Por otra parte, la ingestión masiva de oxicodona puede producir edema pulmonar no cardiogénico, depresión respiratoria y paro cardiaco que puede ser refractaria a la administración de naloxona ⁽²⁵⁾.

2.1.10 Métodos analíticos para la cuantificación de oxicodona

Lalovic y colaboradores ⁽⁶⁾ desarrollaron un método de cuantificación de oxicodona, utilizando para ello oxicodona deuterada como estándar interno, solución buffer de boratos pH=8.9 para alcalinizar, una columna de extracción en fase sólida y los analitos fueron eluidos con la mezcla cloruro de metileno:isopropanol:hidroxido de amonio acuoso (80:20:2). El disolvente orgánico fue evaporado bajo corriente de nitrógeno a 60°C. Los extractos fueron reconstituidos con 100 µL de la fase móvil (solución amortiguadora de acetatos:acetonitrilo (85:15)) de donde 2 a 5 µL fueron inyectados al sistema LC-MS.

Kaiko y colaboradores ⁽⁵⁾ diseñaron un método mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). A las muestras se les adicionó oxicodona deuterada y noroxicodona deuterada como estándares internos. Se utilizó una solución de amortiguadora de fosfatos pH=6, una columna de extracción en fase sólida y los analitos se eluyeron con la mezcla cloruro de metileno:isopropanol (4:1) conteniendo 2% de hidróxido de amonio. Las muestras se evaporaron a sequedad y se derivatizaron con anhídrido acético:piridina (1:1). Las curvas fueron lineales en un rango de 0.2 a 100ng/mL.

Ram P. Kapil ⁽²⁶⁾ y colaboradores desarrollaron un método para la cuantificación de oxicodona utilizando cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (NPD). Se prepararon curvas de calibración en el rango de concentraciones de 1.79 a 17.93 ng/mL con puntos control intermedios de 3.59, 7.17, 10.76ng/mL. Se utilizó hidrocodona como estándar interno, solución de sosa 0.5M para alcalinizar



y como disolvente de extracción isopropanol:tolueno (1:99). Las muestras se evaporaron a sequedad en baño de agua a 40°C bajo corriente de nitrógeno. Se reconstituyeron, con 20 µL de tolueno conteniendo 1% de isopropanol y se inyectaron 2 µL al cromatógrafo de gases.

Michael Dawson ⁽²⁷⁾ y colaboradores desarrollaron un método rápido y sensible para cuantificar oxycodona en plasma, mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas-masas tipo cuadrupolo (LC-MS-MS). La técnica a seguir fue la siguiente: A 1mL de la muestra se le añaden 10 µL de solución de estándar interno (6.7ng de clorhidrato de naloxona) y se alcaliniza a pH=9 con 200 µL de solución amortiguadora de carbonatos. Se adicionan 2mL de disolvente de extracción (2% de alcohol isoamílico en cloruro de n-butilo) y se agita en vortex durante 10 minutos. Se centrifuga a 2000rpm durante 5 minutos. La mezcla se congela a -80°C durante 20minutos y se decanta la fase orgánica, la cual se evapora a sequedad. Las muestras se reconstituyen en 100 µL de fase móvil (15% metanol-85% agua con 0.1% de ácido acético) y se inyectan 10 µL al cromatógrafo. El rango de concentraciones es de 1 a 100ng/mL.



2.2 Normatividad mexicana para estudios de intercambiabilidad

En México existe una norma en la que se establecen los criterios y lineamientos para la validación de métodos analíticos 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**⁽²⁸⁾.

De acuerdo a 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.

2.3 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 de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998⁽²⁸⁾ y a la guía de la FDA⁽²⁹⁾

2.3.1 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⁽²⁸⁾.



2.3.2 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 radioinmunoanálisis (RIA) que deben estar dentro del 20%

2.3.3 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

2.3.3.1 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% ⁽²⁹⁾.

2.3.3.2 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% ⁽²⁹⁾.



2.3.4 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.

2.3.5 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 ⁽²⁸⁾. 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 ⁽²⁹⁾.

2.3.6 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. ⁽²⁹⁾

2.3.7 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. Las pruebas a realizar son las siguientes⁽²⁸⁾:

- 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.
- 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.
- Otros: evaluar otros factores a los cuales pueden estar sometidas las muestras hasta su análisis.
- 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.



2.4 Fundamentos de espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una de las más poderosas herramientas analíticas disponibles para los científicos en el sentido de que la técnica es capaz de proveer información acerca de:

- 1) La composición elemental de las muestras de materia.
- 2) La estructura de moléculas orgánicas y biológicas.
- 3) El análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas.
- 4) La estructura y composición de superficies sólidas.
- 5) La proporción isotópica de átomos en las muestras.

John B. Fenn, el creador de la ionización por electrospray para biomoléculas establece:⁽³⁰⁾

La espectrometría de masas es el arte de la medición de átomos y moléculas para determinar su peso molecular, tal información de masa o peso es algunas veces suficiente, frecuentemente necesaria y siempre útil en la determinación de la identidad de una especie. Para practicar este arte, debemos poner una carga sobre la molécula de interés, es decir, el analito, después medimos como las trayectorias de los iones resultantes responden en el vacío a varias combinaciones de campos eléctricos y magnéticos.

Claramente, el fundamento de tal método es la conversión de las moléculas neutras del analito a iones. Para especies simples y pequeñas, la ionización es realizada fácilmente por el encuentro en fase gaseosa entre las moléculas neutras y electrones, fotones u otros iones. En años recientes el esfuerzo de muchos investigadores ha conducido a nuevas técnicas para la producción de iones de especies grandes y complejas para ser volatilizadas sin una descomposición considerable, siempre catastrófica.

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 utilizada para identificar y monitorear moléculas importantes en fluidos biológicos. 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 ⁽³¹⁾. Un Espectrómetro de Masas es un instrumento que mide las masas de moléculas individuales que han sido convertidas en iones. Un espectrómetro de masas no mide la masa molecular directamente, pero mide la relación masa/carga de los iones formados de las moléculas. Los espectrómetros de masas tienen siete componentes mayores: un sistema de entrada, una fuente de ionización, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control y un sistema de datos. El sistema de entrada, junto con la fuente de ionización y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema.

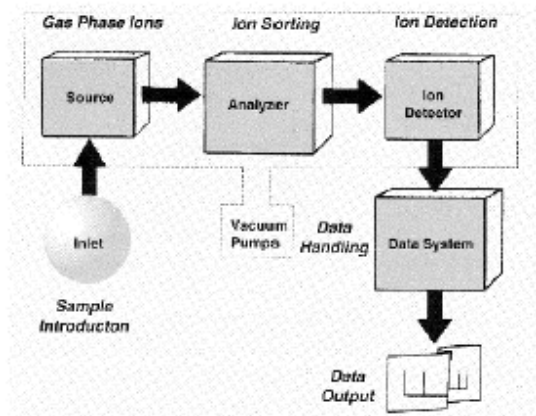


Figura 2.6 Muestra en forma esquemática las principales componentes de los espectrómetros de masas.

Los espectrómetros de masas constan de tres partes fundamentales, una fuente de ionización, un analizador y un detector.

La muestra al 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



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 ⁽³³⁾.

2.4.1 Introducción de la muestra

El método de introducción de la muestra a menudo depende del método de ionización a utilizar, así 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 gases o electroforesis capilar, donde la muestra es separada en una serie de componentes que entran al espectrómetro secuencialmente para su análisis individual ⁽³³⁾.

2.4.2 Métodos de ionización

El punto de partida para un análisis espectrométrico de masas es la formación de los iones gaseosos del analito, y la aplicación y utilidad de un método espectrométrico de masas es dictado por el proceso de ionización. La gráfica de un espectro de masas para una determinada especie molecular es muy dependiente del método usado para la formación del ión. La tabla 2.2 enlista las fuentes de ionización que se han empleado en espectrometría de masas molecular. Note que estos métodos se dividen en dos grandes categorías: fuentes en fase-gaseosa y fuentes de desorción. En las tres primeras fuentes de ionización enlistadas en la tabla 2.2⁽³²⁾, la muestra primeramente se vaporizada y después se ionizada, en las subsecuentes, la muestra en estado sólido o líquido se convierte directamente a iones gaseosos, una ventaja de las fuentes de desorción es que son aplicables a muestras inestables térmicamente y no volátiles.



En las dos últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos de ionización por desorción para muestras no volátiles o termolábiles. Como consecuencia, espectros de masas de especies bioquímicas termolábiles de pesos moleculares más grandes que 100 000Da se han reportado. Los métodos de desorción prescinden de la volatilización seguida de la ionización de las moléculas gaseosas del analito. En su lugar, energía en varias formas se introduce dentro de la muestra sólida o líquida, de tal manera, que causa la formación directa de iones gaseosos. En consecuencia los espectros se simplifican enormemente y frecuentemente consisten únicamente del ión molecular o el ión molecular protonado. En muchos casos no se conoce el mecanismo exacto de cómo los iones se forman sin fragmentar.

Tabla 2.2 Muestra los tipos de fuente de ionización más utilizados.

Tipo básico	Nombre y Acrónimo	Agente ionizante
Fase gaseosa	Impacto Electrónico (EI)	Electrones energéticos
	Ionización Química (CI)	Iones gaseosos reactivos
	Ionización de Campo (FI)	Electrodo con alto potencial
Desorción	Desorción de Campo (FD)	Electrodo con alto potencial
	Ionización por Electrospray (ESI)	Alto campo eléctrico
	Ionización por desorción láser asistida por matrix (MALDI)	Rayo láser
	Desorción de Plasma (PD)	Fragmentos de Fisión de ²⁵² Cf
	Bombardeo Rápido de Átomos (FAB)	Haz energético de átomos
	Espectrometría de masas del ión secundario (SIMS)	Haz energético de iones
	Ionización por Termo-spray (TS)	Alta temperatura

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 en el presente trabajo, es el que a continuación se describe.



2.4.2.1 Ionización por electrospray

La ionización por electrospray en espectrometría de masa (ESI/MS), se describió por primera vez en 1984, ha llegado a ser una de las más importantes técnicas para el análisis de biomoléculas, tales como polipéptidos, proteínas y oligonucleótidos, con pesos moleculares de 100 000Da o más. Además, este método está comenzando a encontrar aplicaciones para la caracterización de especies inorgánicas y polímeros sintéticos.

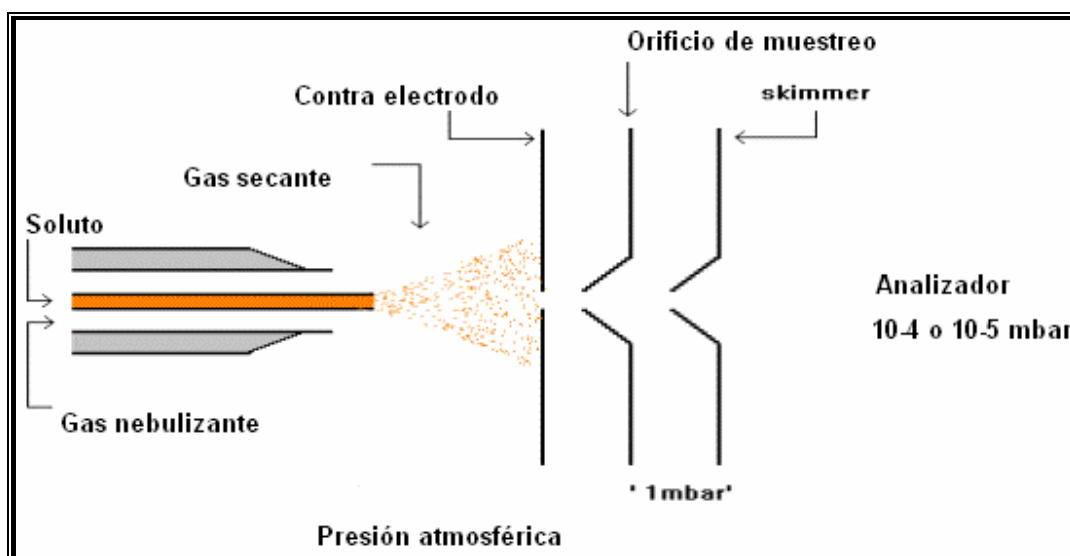


Figura 2.7 Esquema general de una ionización por electrospray

La ionización por electrospray toma lugar bajo presión y temperatura atmosférica, en un aparato como se muestra en la figura 2.7. Una solución de la muestra es bombeada a través de una aguja capilar de acero inoxidable, a una velocidad de varios microlitros por minuto. La aguja se mantiene a varios kilovolts con respecto a un electrodo cilíndrico que rodea la aguja. El spray cargado resultante de finas gotas, pasa después a través de un capilar desolvatador, donde la evaporación del disolvente y la fijación de la carga para las moléculas del analito toman lugar. Como consecuencia de la evaporación del disolvente, su densidad de carga llega a ser muy grande y se lleva a cabo la desorción de los iones dentro del ambiente gaseoso.



La solución debe proveer conductividad eléctrica que puede obtenerse por el uso de analitos iónicos o aditivos iónicos tales como soluciones amortiguadoras o por algún grado de disociación electrolítica del disolvente. El líquido comienza a salir de la aguja, incrementa su carga y asume una forma cónica, llamada cono de Taylor, en honor a G.I. Taylor quien describió este fenómeno en 1964 (Figura 2.8). El líquido asume esta forma cuando incrementa su carga ya que una forma cilíndrica puede retener mas carga que una esfera. En la punta del cono, el líquido cambia de forma a una línea fina, que se vuelve inestable ya que es forzado a retener más y más carga, y finalmente llega a un punto crítico donde no puede soportar mas carga eléctrica y la solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas (de menos de 10 mm de diámetro) altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta. Debido a que las gotas están altamente cargadas con la misma carga eléctrica se repelen fuertemente, las gotas vuelan y se dispersan cubriendo un área cada vez mayor y se van reduciendo de tamaño ya que las moléculas de disolvente se evaporan en su superficie, y la distancia entre las moléculas cargadas disminuye dramáticamente. Si la gota no encuentra donde disipar su carga, las cargas eléctricas llegan a un estado crítico y la gota explota violentamente (Figura 2.9). Este proceso fue originalmente observado por el físico John Zelany en 1914⁽³⁴⁾.

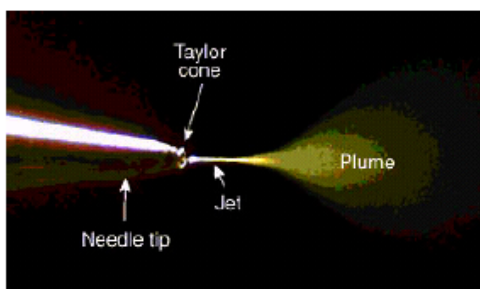


Figura 2.8 Cono de Taylor

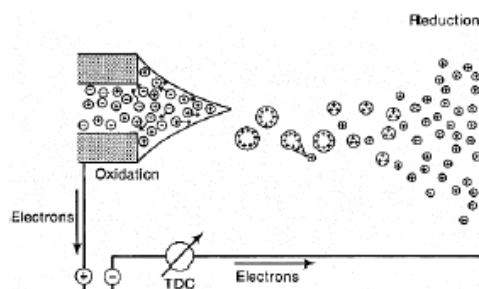


Figura 2.9 Reducción de tamaño de gota en ESI

Aún no existe una explicación 100% aceptada de lo que le sucede a las gotas, pero algunas de las teorías son:

1. Modelo de Residuo Cargado (*charged residue model*) de Dole. Las gotas sufren repentinamente explosiones coulombicas produciendo gotas más pequeñas y



más pequeñas que finalmente contendrán solo una molécula cargada y quizá algunas moléculas de disolvente.

2. Modelo de Evaporación Iónica (*ion evaporation model*) de Iribarne y Thomson. Establece que ocurre la expulsión de moléculas cargadas para reducir la densidad de carga de la superficie.

3. La gota original sobrevive después de haber expulsado algunas microgotas cargadas.

De cualquier forma, el proceso termina con moléculas cargadas que todavía pueden llevar moléculas de disolvente. El proceso de evaporación y rompimiento de gotas se repite hasta que el tamaño y carga de las gotas desorba moléculas protonadas dentro de la fase gaseosa, donde pueden ser dirigidas en el espectrómetro de masas por medio de campos eléctricos apropiados (Figura 2.10). El proceso de evaporación puede ser suplementado con un flujo de gas (típicamente nitrógeno) y calor.

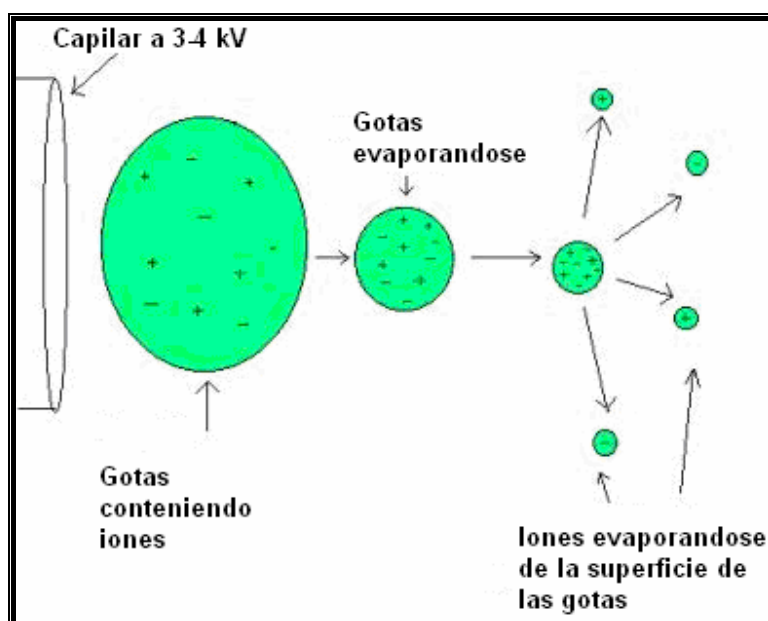


Figura 2.10 Proceso de ionización por electrospray.

Una característica de *ESI* es que debido a las condiciones ácidas usadas para producir las gotas cargadas positivamente se tienden a protonar todos los sitios



básicos en las moléculas de analito. Una segunda característica de *ESI* es la eficiencia del proceso de ionización y, como resultado, la sensibilidad de los experimentos basados en esta forma de ionización, la eficiencia en la protonación de estos sitios básicos en ambientes ácidos parece contribuir a la sensibilidad. Una tercera característica es su compatibilidad con los disolventes de HPLC de fase reversa (*reverse-phase high-performance liquid chromatography*), ya que las mezclas agua/disolvente tienen excelentes propiedades compatibles con *ESI*.

Una característica interesante y útil del proceso de electrospray es que presenta una pequeña fragmentación de biomoléculas grandes y termolábiles, además, la formación de iones multicargados de manera que sus valores de m/z , son bastante pequeños para hacerlos detectables con un instrumento de cuadrupolo con un rango de $1500m/z$ o menos. Una importante característica de la ionización por electrospray es su acoplamiento a un equipo de HPLC que introduce la muestra directamente.

2.4.2.2 Disolventes para electrospray

Muchos disolventes pueden ser usados en *ESI* y son seleccionados basándose en la solubilidad del compuesto de interés, la volatilidad de los disolventes y la capacidad del disolvente de donar un protón. Típicamente, los disolventes próticos, tales como metanol, metanol:agua (50:50), acetonitrilo:agua(50:50), se usan, mientras cosolventes apróticos tales como 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en agua, al igual que el alcohol isopropílico se usan para mejorar la solubilidad de algunos compuestos. Aunque el agua al 100% se usa para *ESI*, la baja presión de vapor del agua tiene un efecto perjudicial sobre la sensibilidad, una mejor sensibilidad se obtiene cuando un disolvente orgánico volátil se adiciona. Algunos compuestos requieren del uso de cloroformo con 0.1% de ácido fórmico para facilitar la ionización. De esta manera, mientras menos sensibilidad, puede ser eficaz para otro compuesto insoluble diferente.

Las soluciones amortiguadoras como fosfato de sodio o potasio y sales presentan un problema para *ESI*, por la baja presión de vapor de las gotas, provoca una



señal reducida, debido al incremento de la tensión superficial de la gota, produciendo una reducción de la volatilidad. Consecuentemente, se deben utilizar otras soluciones tales como el acetato de amonio.

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, se utiliza la detección en modo ión positivo. Y si por el contrario la muestra tiene grupos que fácilmente pierden un protón se emplea la detección en modo ión negativo. ⁽³³⁾

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 ⁽³³⁾.

2.4.3 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:

2.4.3.1 Sector magnético

Este tipo de instrumentos separa los iones, en un campo magnético, de acuerdo al momentum y a la carga del ión. Los valores m/z se determinan mediante la ecuación $m/z = r^2 B^2 e / 2V$ y solo un ión 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 ⁽³⁵⁾.

2.4.3.2 Analizador TOF (Time-Of-Flight)

En estos instrumentos todos los iones formados se aceleran por pulsos de potenciales hacia un tubo evacuante. Se mide tiempo que tardan en llegar al detector, el cual está en función de su valor m/z ⁽³¹⁾.



2.4.3.3 Analizador ICR (Ion Ciclotron Resonance)

Este utiliza un magneto superconductor para atrapar los iones de una muestra en una pequeña celda. Los iones se mantienen en la trampa por una combinación de campos magnéticos estáticos y 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. ⁽³¹⁾

2.4.3.4 Cuadrupolo

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 ⁽³⁵⁾

Los analizadores de masas cuadrupolos han sido utilizados desde los años 1950 y son aun los más comunes analizadores de masas en existencia en la actualidad. Los analizadores de masas cuadrupolos han encontrado nueva utilidad en su capacidad de contactar con ESI y APCI.

Los cuadrupolos ofrecen tres grandes ventajas:

- Toleran relativamente altas presiones.
- Tienen un significativo rango de masas con una capacidad de análisis hasta una m/z de 4000, lo cual es útil porque la ionización por electrospray de proteínas u otras biomoléculas, comúnmente produce distribución de carga de m/z de 1000 a 3500.
- Espectrómetros de masas con cuadrupolos son instrumentos relativamente de bajo costo.

Considerando las características complementarias entre ESI y los cuadrupolos, no es sorprendente que los primeros instrumentos de electrospray comercialmente exitosos estuvieran acoplados con analizadores de masa cuadrupolo.



Este consta de 4 barras colocadas una frente a la otra como se muestra en la figura 2.11, a medida que los iones viajan hacia el cuadrupolo, 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 cuadrupolo 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 ⁽³⁵⁾

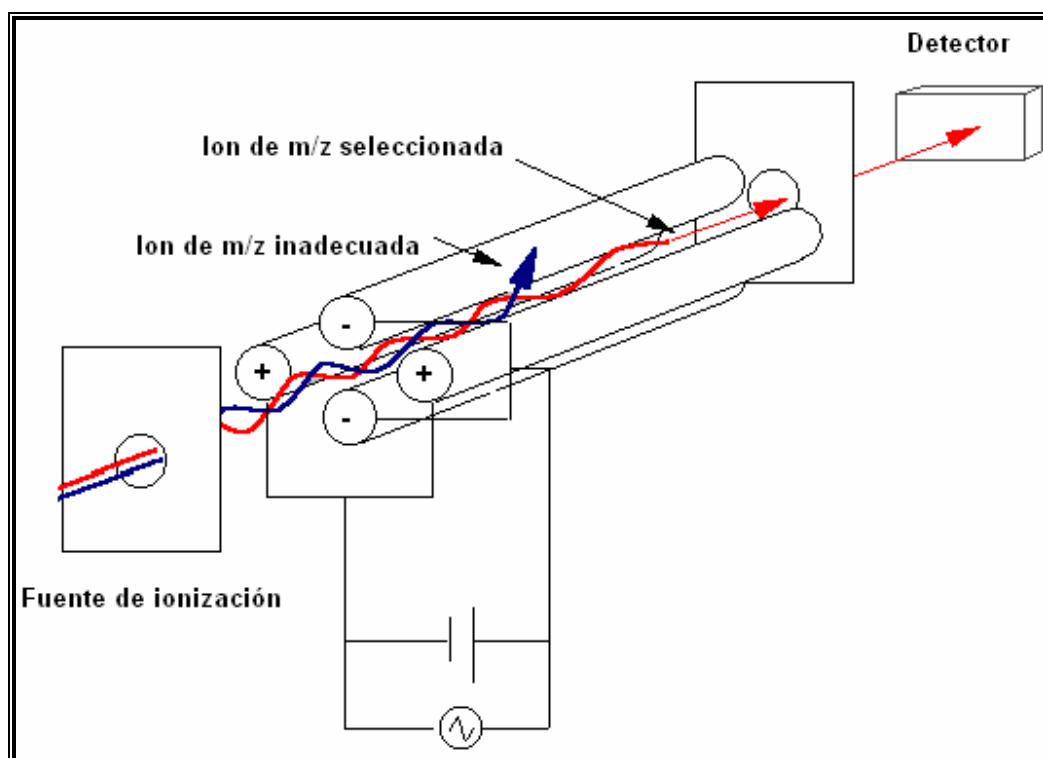


Figura 2.11 Analizador de masas del tipo Cuadrupolo.

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

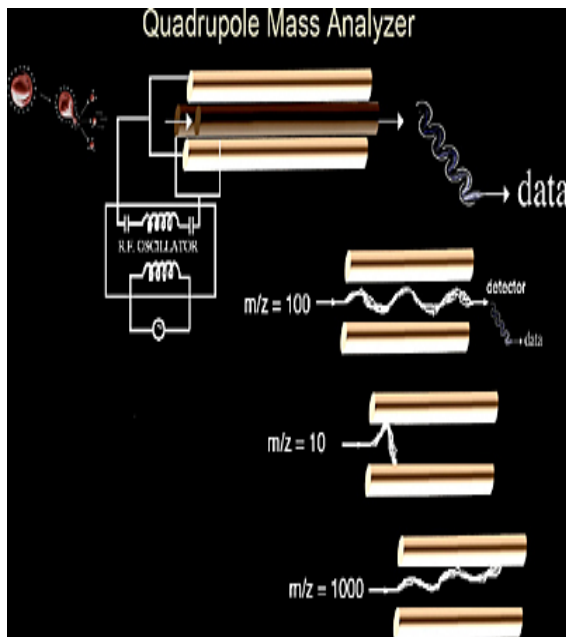


direcciona a los iones al plano vertical. El campo del cuadrupolo continua alternándose a medida que los iones viajan a través del analizador de masas, esto hace que los iones sufran un conjunto de movimientos complejos, que producen una onda tridimensional. ⁽³⁵⁾

El campo del cuadrupolo transmite los iones seleccionados por que la amplitud de esta onda tridimensional depende del valor de m/z del ión, 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 una 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 colisionarán 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 ión con un m/z mayor a este límite se transmite por el cuadrupolo. Un voltaje de DC también se aplica 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. ⁽³⁵⁾

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. A los cuadrupolos se les llama filtros de masas debido a su similaridad 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. ⁽³⁵⁾

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 mas accesible para los laboratorios que los utilizan. ⁽³⁵⁾



La figura 2.12 muestra un diagrama esquemático de un arreglo de las barras de un cuadrupolo y una conexión eléctrica aun generador RF y un potencial DC es también superimpuesto sobre las barras. Una sección de un analizador de masas cuadrupolo tomado como si analizara masas para 100, 10 y 1000 respectivamente. Es importante notar que ambos campos DC y RF son los mismos en cada uno de los tres casos y únicamente iones con $m/z = 100$ atraviesan la longitud total de el cuadrupolo y reaccionan con el detector, los otros iones son filtrados hacia fuera.

Los analizadores de masas cuadrupolo son conectados en paralelo a un generador de radiofrecuencia y un potencial DC. En un específico campo RF, únicamente iones de una específica m/z puede pasar a través de los cuadrupolos como se muestra en la figura 2.12^(36,37) donde únicamente se detecta el ión de $m/z = 100$. En los tres casos de la figura 2.12 los campos RF y DC son los mismos. Por lo tanto, por escaneo del campo RF un amplio rango de m/z (típicamente de 100 a 4000) puede realizarse en aproximadamente un segundo.

2.4.4 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.⁽³⁵⁾ Básicamente y en palabras sencillas el proceso de detección es el monitoreo de la corriente del ión, su amplificación y su transmisión a un sistema de datos en donde



se registra como un espectro de masas. Los valores m/z se grafican 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.⁽³³⁾

2.4.5 Espectrometría de masas en tandem

Otra unión importante a esta técnica involucra el acoplamiento del espectrómetro de masas a un segundo. En este método, el primer espectrómetro sirve para aislar los iones moleculares de varios componentes de la mezcla. Estos iones se introducen después uno a la vez dentro de un segundo espectrómetro de masas, donde se fragmentan para dar una serie de espectros de masas, uno para cada ión molecular producido en el primer espectrómetro, esta técnica es llamada Tandem mass spectrometry abreviada como MS-MS.

El primer espectrómetro en un instrumento Tandem ordinariamente se equipa de una fuente de ionización suave, así que su producción es mayoritariamente de iones moleculares o iones moleculares protonados. Estos iones después pasan dentro de la fuente de ionización del segundo espectrómetro. La fuente más frecuente de ionización de este segundo espectrómetro consiste en un campo-cámara de colisión libre a través de la cual el helio es bombeado. Colisiones entre el ión padre acelerado y átomos de helio causa otra fragmentación a la anterior para dar numerosos iones hijos. El espectro de estos iones hijos se escanean después por el segundo espectrómetro.

Actualmente, el espectrómetro de masas tandem más usado ampliamente tiene la configuración QQQ, mostrada en la figura 2.13. La muestra se introduce dentro de la fuente de ionización, después los iones se aceleran dentro del primer campo y pasan al segundo cuadrupolo, el cual es una cámara de colisión donde ocurre otra fragmentación y como resultado los iones hijos pasan dentro del cuadrupolo tres donde se escanean. El orden para diseñar un análisis de masas tandem, con un instrumento cuadrupolo, es necesario poner tres cuadrupolos en serie. Cada cuadrupolo tiene una función separada: el primer cuadrupolo Q1 se usa para



escanear a través de un prefijado rango de m/z y seleccionar un ión de interés. El segundo cuadrupolo Q2, también conocido como la celda de colisión, concentra y transmite los iones mientras introducen un gas colisionante (argón o helio) dentro de la trayectoria de vuelo de el ion seleccionado. El tercer Cuadrupolo Q3 sirve para analizar los fragmentos de iones generados en la celda de colisión.

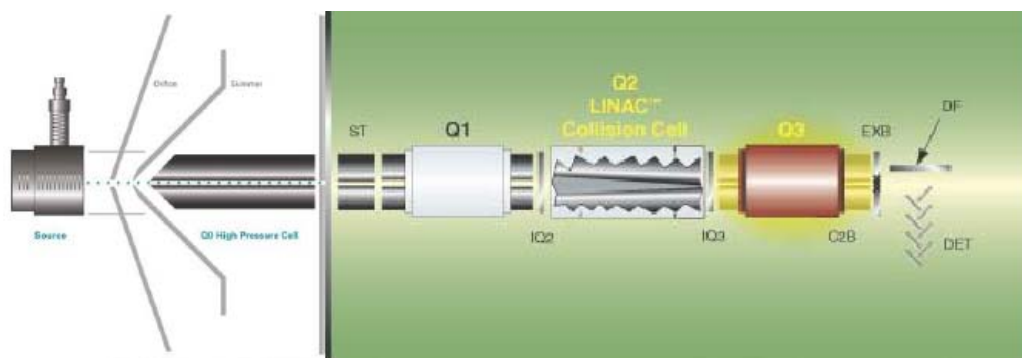


Figura 2.13 Muestra el arreglo de un sistema triple cuadrupolo.

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 se transmiten a través del primer analizador y los fragmentos específicos que surgen de estos iones y que se miden por el segundo analizador, se seleccionan 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. ⁽³³⁾

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

2.4.6 Determinación cuantitativa de especies moleculares.

La espectrometría de masas ha sido ampliamente aplicada para la determinación cuantitativa de una o más componentes de un complejo sistema orgánico, los cuales encontramos en la industria petrolera, farmacéutica y en el estudio de problemas ambientales. Actualmente, tales análisis se desarrollan usualmente por



el paso de la muestra a través de un cromatógrafo o una columna capilar electroforética y dentro del espectrómetro. Con el espectrómetro se fija el valor m/z conveniente, el ión actual se registra después como una función del tiempo. Esta técnica se llama monitoreo selectivo de iones. En otros casos, admite tres o cuatro valores m/z los cuales se monitorean en forma cíclica por una rápida desviación de un pico a otro. La grafica de los datos consiste en una serie de picos cada uno apareciendo en un tiempo que es característico de uno o de varios componentes de la mezcla, que los iones producen, de la selección de valor o valores m/z . Generalmente las áreas bajo la curva de los picos son directamente proporcionales a la concentración del componente y esto sirve como un parámetro analítico. En este tipo de procedimiento, los espectros de masas simples funcionan como un detector selectivo sofisticado para un análisis cromatografico cuantitativo y en la actualidad son el método de elección para la cuantificación de fármacos en fluídos biológicos, particularmente cuando estos se encuentran en concentraciones bajas en plasma ⁽³²⁾.



PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR OXICODONA EN PLASMA

3.1 Reactivos, material y equipo

3.1.1 Reactivos

Agua HPLC

Formiato de amonio RA J.T. Baker

Hidróxido de sodio RA J.T. Baker

Éter anhidro RA J.T. Baker

Hexano HPLC

Plasma humano, con etiqueta de sangre segura y con resultado negativo a las pruebas de VIH, hepatitis B y VDRL.

3.1.2 Sustancias de referencia

Clorhidrato de oxicodona, Psicofarma, estándar secundario. Lote: 0C25/2004

Tartrato de metoprolol, Farmadem, estándar secundario. Lote: SS-15

3.1.3 Materiales

Tubos de ensayo de 16x100 mm con tapón de rosca

Tubos de centrifuga de 16x100mm sin rosca

Pipetas Pasteur

Bulbos para Pipeta Pasteur

Micropipetas Brand

Puntas para micropipetas Brand

Repipeteador Brand

Puntas para repipeteador Brand

Vasos de precipitado de 100 y 250 mL Kimax

Matraces volumétricos de 10, 500 y 1000 mL Kimax

Probetas de 100, 500 y 1000 mL Kimax



Placas de 96 pozos de 500 μ L (wellplates) Agilent (exclusivo para líquidos-masas-masas).

Cubiertas de silicón para placas de 96 pozos Agilent (exclusivo para líquidos-masas-masas).

Sistema de filtración

Membrana de filtración Millipore de 0.45 μ m tipo HA y diámetro de 45 mm

3.1.4 Aparatos

Agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II

Centrífuga refrigerada Hettich

Cromatógrafo de Líquidos Agilent 1200 acoplado a un Espectrómetro de Masas-Masas API 3200

Balanza analítica Denver Instrument

Bomba de vacío

Campana de extracción

Evaporador de nitrógeno

3.2 Preparación de soluciones

3.2.1 Solución de hidróxido de sodio 1M

Depositar en un matraz volumétrico de 100mL, 4g de hidróxido de sodio, llevar al aforo con agua y mezclar.

3.2.2 Solución de formiato de amonio 0.7mM

Adicionar 44.1mg de formiato de amonio a un matraz volumétrico de 1000mL, disolver y llevar a volumen con agua y mezclar. Filtrar a través de membrana de 0.45 micras.

3.2.3 Solución diluyente agua-acetonitrilo (50:50v/v)

Mezclar agua HPLC y acetonitrilo HPLC en proporción 50:50 de acuerdo a la cantidad a utilizar y depositarlo en un frasco ámbar y mezclar.



3.2.4 Solución de extracción

Mezclar éter HPLC y hexano HPLC en proporción 60:40.

3.2.5 Fase móvil: Acetonitrilo/Formiato de amonio 0.7mM en proporción (43:57v/v)

Transferir en un frasco de vidrio, 1000mL de acetonitrilo y filtrar a través de membrana de 0.45micras.

Transferir a un frasco de vidrio, 1000mL la solución de formiato de amonio 0.7mM y filtrar a través de membrana de 0.45micras.

Programar el equipo para que realice la mezcla (43:57v/v).

3.2.6 Plasma humano

El plasma que se utilizó para la preparación de las curvas patrón y los puntos control, 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 Oxidona

3.3.1 Estándar interno de metoprolol (250ng/mL)

Pesar con exactitud 25.5mg de tartrato de metoprolol, equivalentes a 10 mg de metoprolol, y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar el aforo con agua:metanol (50:50v/v) y mezclar. Esta solución contiene 1mg/mL de metoprolol.

Transferir 100 μ L de la solución de anterior a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 10 μ g/mL de metoprolol.

De esta última solución transferir 250 μ L a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 250 ng/mL de metoprolol.



3.3.2 Estándar interno de metoprolol (1250ng/mL)

Transferir 125 μ L de la solución de 1mg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 12.5 μ g/mL de metoprolol.

De esta última solución transferir 1000 μ L a un matraz volumétrico de 10mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 1250ng/mL de metoprolol.

3.3.3 Soluciones patrón de Oxidodona

Pesar con exactitud 11.7 mg de clorhidrato de oxidodona, equivalentes a 10 mg de oxidodona, y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con agua:metanol (50:50v/v) y mezclar. Esta solución contiene 1000 μ g/mL de oxidodona. Solución A.

Transferir 100 μ L de la solución de 1000 μ g/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 10 μ g/mL de oxidodona. Solución B.

Transferir 1000 μ L de la solución de 10 μ g/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 1 μ g/mL de oxidodona. Solución C.

Transferir 1000 μ L de la solución 1 μ g/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución diluyente y mezclar. Esta solución contiene 0.1 μ g/mL de oxidodona. Solución D.

3.3.4 Solución de adecuabilidad

Mezclar 150 μ L de una solución de 100ng/mL de oxidodona con 125 μ L de una solución de metoprolol de 10 000ng/mL en un matraz aforado de 10mL y aforar con solución diluyente. Esta solución contiene 1.5ng/mL de oxidodona y 125ng/mL de metoprolol.



3.3.5 Soluciones stock de oxycodona en solución diluyente

En la tabla 3.1 se presentan las soluciones stock de oxycodona, las cuales se prepararon como se describe a continuación:

A partir de la solución B de oxycodona (10 μ g/mL), se prepararon las soluciones de concentración 400 a 1200ng/mL(1-4). De la solución C de oxycodona (1 μ g/mL), se prepararon las soluciones de concentración 100 y 200ng/mL(5,6). De la solución D de oxycodona (0.1 μ g/mL), se prepararon las soluciones de concentración 5 a 20 ng/mL (7,8,9). A partir de la solución B de oxycodona (10 μ g/mL) se prepararon las soluciones de concentración 500 y 1000ng/mL (10,11). De la solución D de oxycodona (0.1 μ g/mL), se prepararon la solución de concentración de 15ng/mL (12).

Tabla 3.1 Soluciones stock de oxycodona en solución diluyente.

Concentración inicial de oxycodona (μ g/mL)	Alícuota de la solución de oxycodona (μ L)	Volumen del diluyente (μ L)	Volumen final (mL)	Numero de dilución resultante en solución diluyente	Concentración final de oxycodona (ng/mL)
10	120	880	1	1	1200
10	80	920	1	2	800
10	60	940	1	3	600
10	40	960	1	4	400
1	200	800	1	5	200
1	100	900	1	6	100
1	200	800	1	7	20
0.1	100	900	1	8	10
0.1	50	950	1	9	5
PUNTOS CONTROL					
10	100	900	1	10	1000
10	50	950	1	11	500
0.1	150	850	1	12	15



3.3.6 Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma

A partir de las soluciones stock 1-12 de oxycodona (tabla 3.1), se prepararon los puntos de la curva de calibración en plasma, a concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60 ng/mL de oxycodona y los puntos control de 0.75 (bajo-MCB) ng/mL, 25 (medio-MCM) y 50 (alto-MCA) ng/mL de oxycodona. La curva de calibración y puntos control se prepararon de acuerdo a la metodología descrita en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Metodología utilizada para preparar los puntos de la curva de calibración y los puntos control en plasma humano.

Tomar alícuota de la solución numero	Concentración inicial de oxycodona ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota de la solución de oxycodona (μL)	Volumen de plasma humano (μL)	Volumen final (mL)	Concentración final de oxycodona (ng/mL)
1	1200	50	950	1	60
2	800	50	950	1	40
3	600	50	950	1	30
4	400	50	950	1	20
5	200	50	950	1	10
6	100	50	950	1	5
7	20	50	950	1	1
8	10	50	950	1	0.5
9	5	50	950	1	0.25
PUNTOS CONTROL					
10	1000	50	950	1	50
11	500	50	950	1	25
12	15	50	950	1	0.75



3.3.7 Curva de calibración y puntos control en solución diluyente

A partir de las soluciones stock 1-12 de oxicodona (tabla 3.1), se prepararon los puntos de la curva de calibración en solución diluyente, a concentraciones de 0.5, 1, 2, 10, 20, 40, 60, 80 y 120ng/mL de oxicodona y los puntos control de 1.5(bajo-MCB), 50(medio-MCM) y 100(alto-MCA)ng/mL de oxicodona. A cada una de las soluciones anteriores se le adiciono 100 μ L de metoprolol con una concentración de 1250ng/mL (estándar interno). La curva de calibración y puntos control se prepararon de acuerdo a la metodología descrita en la tabla 3.3.

La tabla 3.3 Metodología utilizada para preparar los puntos de la curva de calibración y los puntos control en solución diluyente.

Tomar alícuota de la solución numero	Concentración inicial de oxicodona (μ g/mL)	Alícuota de la solución de oxicodona (μ L)	Volumen del diluyente (μ L)	Volumen de estándar interno de metoprolol a 1250ng/mL (μ L)	Volumen final (mL)	Concentración final de oxicodona (ng/mL)
1	1200	100	800	100	1	120
2	800	100	800	100	1	80
3	600	100	800	100	1	60
4	400	100	800	100	1	40
5	200	100	800	100	1	20
6	100	100	800	100	1	10
7	20	100	800	100	1	2
8	10	100	800	100	1	1
9	5	100	800	100	1	0.5
PUNTOS CONTROL						
10	1000	100	800	100	1	100
11	500	100	800	100	1	50
12	15	100	800	100	1	1.5



La concentración final de oxycodona en cada punto de la curva y los puntos control en solución diluyente fue del doble de la utilizada en la curva de calibración en plasma.

3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de oxycodona en plasma humano

3.4.1 Ionización

Se realizó la ionización de oxycodona, metoprolol y propanolol, hasta obtener la transición iónica reportada en los artículos consultados, además se determinaron las siguientes condiciones para una mayor intensidad de la respuesta en espectrometría de masas, mostrados en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Muestra las condiciones en las que operara el espectrómetro de masas para identificar la oxycodona y el metoprolol.

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	DP	FP	CE	CXP
Oxycodona	316.211	298.253	53	5	30	5
Metoprolol	268.234	116.200	46	8	29	2
Fuente de ionización	Turbo spray en modo positivo (ES ⁺)					
Tipo de monitoreo	Multiple Reaction Monitoring (MRM)					

3.4.2 Fase móvil

Para determinar la fase móvil se probaron diferentes combinaciones utilizando para ello acetonitrilo-acido formico-acetato de amonio, los dos últimos en agua, además, de diferentes temperaturas de columna y velocidad de flujo, hasta satisfacer las siguientes condiciones:

- 1) La señal de los analitos fuera superior a la señal de ruido.
- 2) El tiempo de retención de la oxycodona y los candidatos a estándar interno no se encontrara dentro del rango de tiempo muerto de la columna.
- 3) El tiempo de retención de los analitos no fueran mayor a 3 minutos.



Las condiciones cromatograficas obtenidas fueron las siguientes:

Fase móvil: acetonitrilo:formiato de amonio 0.7mM en agua (43:57v/v)

Velocidad de Flujo: 1200 μ L/min

Columna cromatografica: ACE, C8 5 μ m (150 x 4.6mm)

Precolumna: Phenomex C18 de 4 x 3mm

Volumen de Inyección: 20 μ L

Tiempo de corrida: 3minutos

Temperatura de horno de columna: 40°C

Temperatura de automuestreador: 5°C

3.4.3 Selección de disolvente de extracción y estándar interno

Con respecto al método de extracción se evaluaron diferentes proporciones de disolventes orgánicos, las que se muestran en la tabla 3.5 y el tiempo de agitación se fijo en 1minuto.

Tabla 3.5 Muestra las diferentes proporciones de solventes orgánicos utilizados para seleccionar el más adecuado para la extracción.

SOLVENTE EXTRACCION
ETER:HEXANO 60:40
ETER:ACETATO DE ETILO 60:40
TOLUENO:ISOPROPANOL 90:10
ETER:DICLOROMETANO 90:10

Para seleccionar el propanolol ó el metropolol como el estándar interno se determinó el coeficiente de variación de 50 muestras con la mezcla de extracción Eter:Hexano (60:40).



3.4.4 Método de Extracción de Fluido Biológico

El procedimiento final para la extracción de oxicodona en plasma humano fue el siguiente:

- I. Transferir a un tubo de vidrio de 16 x 100mm con tapón de rosca, una alícuota de 400 μ L de muestra en plasma, proveniente de los puntos de la curva de calibración y puntos control en plasma.
- II. Adicionar 100 μ L de solución de estándar interno de metoprolol a 250 ng/mL
- III. Adicionar 100 μ L de solución de hidróxido de sodio 1M
- IV. Agitar por 10 segundos en vortex
- V. Añadir 4 mL de la mezcla de éter-hexano (60:40)
- VI. Agitar por un minuto en vortex
- VII. Centrifugar a 4000rpm durante 5 minutos a 0°C.
- VIII. Congelar a -70°C durante 30minutos.
- IX. Decantar el sobrenadante orgánico a un tubo de ensayo de 16 x 100mm limpio
- X. Evaporar a 45°C bajo corriente de Nitrógeno
- XI. Reconstituir el residuo con 200 μ L de la solución diluyente (agua:acetonitrilo 50:50v/v)
- XII. Inyectar 20 μ L al sistema LC/MS/MS

3.5 Justificación de utilizar concentraciones de oxicodona en solución diluyente al doble que las de concentración en plasma

Al calcular la cantidad de oxicodona tomada en los 400 μ L de muestra para la concentración de 60ng/mL de oxicodona en plasma tendremos:

$$0.40\text{mL}(60\text{ng/mL}) = 24\text{ng de oxicodona}$$

Al reconstituirlo con 200 μ L de solución diluyente tenemos la concentración de:

$$(24\text{ng})/0.20\text{mL} = 120\text{ng/mL de oxicodona}$$



Para el metoprolol:

$$0.10\text{mL}(250\text{ng/mL}) = 25\text{ng de metoprolol}$$

y al reconstituirlo tenemos:

$$(25\text{ng})/0.20\text{mL} = 125\text{ng/mL de metoprolol.}$$

Estas concentraciones son iguales a las de la solución diluyente de 120ng/mL de oxycodona y 125ng/mL de metoprolol.

La finalidad de concentrar nuestras muestras reconstituyendo con la mitad del volumen inicial nos permite:

*Doblar la señal-respuesta obtenida para oxycodona y así evitar problemas en el límite de cuantificación por la señal de ruido.

*No alterar la concentración de oxycodona en plasma ya que no se altera la concentración inicial.

*Inyectar un volumen pequeño de muestra al sistema LC/MS/MS

*Comparación equiparable entre la curva de la solución diluyente y la curva en plasma, para diferentes pruebas de nuestra validación.

3.6 Validación del método analítico para la cuantificación de Oxycodona 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(A,B,C,D,E,F).

Muestra blanco de la mezcla del plasma de los seis donadores (pool).

Muestra blanco de la mezcla del plasma de los seis donadores (pool) adicionada de metoprolol a concentración de 250 ng/mL.



Muestra blanco de la mezcla del plasma de los seis donadores adicionada de oxicodona a la concentración de 0.25 ng/mL y metoprolol a 250 ng/mL.

Muestra blanco de sangre-hemolizada.

Muestra blanco de plasma- heparinizado.

Muestra blanco de plasma-EDTA.

Muestra blanco de sangre-hemolizada adicionada de oxicodona a 0.25ng/mL y metoprolol a 250ng/mL

A cada una de las muestras se les aplico el método de extracción de fluido biológico y se inyectaron 20 μ L al cromatógrafo.

Criterio de aceptación: No deberá presentarse interferencia en el tiempo de retención de Oxicodona (analito de interés), ni en el de Metoprolol (estándar interno). En caso de que se presente alguna señal en el tiempo de retención de la Oxicodona ésta debe ser menor al 20 % de la respuesta de una concentración de 0.25 ng/mL. Para el estándar interno la interferencia no debe ser mayor que el 5% de su respuesta con respecto a la concentración de 250 ng/mL.

3.6.2 Supresión iónica

La supresión de la señal (supresión iónica) en el espectrómetro de masas puede ser causada por contaminantes (por ejemplo sales, proteínas) presentes en la fase móvil o debida a procedimientos de extracción no específicos. Por lo anterior, se debe determinar el efecto del método de preparación de la muestra para la matriz que se está analizando, sobre la variabilidad de la respuesta de ionización.

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 Oxicodona y metoprolol a una concentración de 50 μ g/mL a una velocidad de 50 μ L/min.

Se aplicó el método de extracción de fluido biológico 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 Oxidodona y Metoprolol.

3.6.3 Recobro absoluto

Se prepararon por triplicado puntos control de oxidodona en plasma y puntos control de oxidodona en solución diluyente. Los puntos control en plasma se procesaron empleando el método de extracción de fluido biológico y se inyectaron al cromatógrafo tanto los puntos control en plasma y los puntos control en solución diluyente.

Para cada una de las determinaciones (muestras en solución diluyente 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:

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

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.

3.6.4 Linealidad

Para determinar la linealidad del método, se prepararon tres curvas de calibración de oxidodona en plasma. Las muestras se procesaron utilizando el método de extracción de fluido biológico.

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 correlación (r) 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 porcentaje 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 porcentaje de desviación absoluta menor o igual al 20%.

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 oxicodona en plasma y una curva de calibración en plasma preparada el día del análisis. Las muestras (puntos control y curva de calibración) se procesaron empleando el método de extracción de fluido biológico.

Los valores de respuesta de los puntos control (0.75, 25 y 50 ng/mL) se interpolaron en la curva de calibración en plasma 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, tres diferentes analistas prepararon cada uno por triplicado en tres días o corridas diferentes, puntos control en plasma y una curva de calibración de oxicodona en plasma. Las muestras (puntos control y curva de calibración) se analizaron utilizando el método indicado en la sección 3.4.4.

Los valores de respuesta de los puntos control en plasma se interpolaron en la curva de calibración en plasma preparada el día del análisis y se calculó 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 reproducible 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 porcentaje 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 porcentaje de desviación absoluta es menor o igual que el 15%.

3.8 Límite de cuantificación

Se prepararon por sextuplicado, muestras de plasma conteniendo Oxicodona a una concentración de 0.25ng/mL (Concentración mas baja de la curva de



calibración en plasma) y una curva de calibración en plasma. Se aplicó el método de extracción de fluido biológico tanto a los puntos control y curva de calibración.

Los valores de respuesta de cada una de las réplicas se interpolaron en la curva de calibración en plasma 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 Efecto de dilución.

Se prepararon seis puntos control alto en plasma al doble de la concentración (100ng/mL) para ser diluidos 1:2 con plasma, obteniendo al final una concentración de 50ng/mL y seis puntos control alto con la concentración normal (50ng/mL), y una curva de calibración en plasma. A todos ellos se les aplicó el método de extracción. Los valores de respuesta de cada una de las réplicas se interpolaron en la curva de calibración en plasma y se calculó la concentración recuperada. Se compararon los resultados de las muestras diluidas 1:2 con los resultados de la concentración más alta.

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

3.10 Estabilidad

Por medio de las pruebas de estabilidad se determinaron las condiciones a las cuales las muestras de oxicodona permanecen estables durante su almacenamiento o proceso.

3.10.1 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon por triplicado puntos control de oxicodona en plasma, lo cuales se almacenaron a -70°C por 313 días. Al término de este período, las muestras se descongelaron, se preparó otra serie por triplicado de puntos control en plasma y una curva de calibración en plasma. Se aplicó el método de extracción a ambas



series y a la curva de calibración. Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

La concentración promedio recuperada de los puntos control en plasma, preparada el día del análisis, se comparó con la concentración promedio recuperada a los 313 días de almacenamiento en congelación y se determinó el % de desviación absoluta mediante la fórmula:

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

[Concentración recuperada inicial] = concentración recuperada obtenida de los puntos control procesados el día del análisis

[Concentración recuperada final] = concentración recuperada obtenida después de los 313 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.

3.10.2 Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación

Se preparó por triplicado una serie de puntos control de oxicodona en plasma y se almacenaron en congelación a -70°C por 24 horas. Transcurrido este período de tiempo, se descongeló la serie y se volvió a congelar, lo cual constituyó un ciclo de congelación–descongelación. Esta serie se sometió al procedimiento anterior 5 veces más, al término de ese tiempo se descongeló, se preparó por triplicado otra serie de puntos control en plasma y una curva de calibración en plasma, se aplicó el método de extracción a ambas series y a la curva de calibración. Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

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 absoluta 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 cinco ciclos de congelación-descongelación

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

3.10.3 Estabilidad a temperatura ambiente (corto plazo)

Se prepararon por triplicado una serie de puntos control de oxicodona en plasma y se mantuvieron a temperatura ambiente por 113 horas. Se preparó por triplicado otra serie de puntos control en plasma y una curva de calibración en plasma y se aplicó el método de extracción a ambas series y a la curva de calibración. Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

Se tabularon las concentraciones recuperadas y se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Para el cálculo de la desviación absoluta se utilizó el valor promedio de la concentración recuperada a cada nivel de concentración, mediante 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 procesados el día del análisis

[Concentración recuperada final] = concentración recuperada de los puntos control mantenidos a temperatura ambiente por 113 horas

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

3.10.4 Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon por triplicado dos series de puntos control de oxicodona en plasma y una curva de calibración en plasma, se aplicó el método de extracción de fluido biológico a las dos series y a la curva de calibración, a una de las series se inyectó al cromatógrafo inmediatamente junto con la curva de calibración en plasma (0 horas). La otra serie se mantuvo en el automuestreador a 5°C durante 22 horas y transcurrido este tiempo se inyectaron al cromatógrafo.

Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

Se calculó la concentración recuperada de ambas series, interpolando los valores de respuesta en la curva de calibración en plasma de oxicodona. Se calculó el porcentaje de desviación absoluta utilizando el valor promedio de la concentración recuperada a cada nivel de concentración, empleando la siguiente ecuación:

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

[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 22 horas en el automuestreador

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



3.10.5 Estabilidad de la muestra reinyectada

Se prepararon por triplicado una serie de puntos control de oxicodona en plasma y una curva de calibración en plasma, se les aplicó el método de extracción. La serie se inyectó al cromatógrafo inmediatamente junto con la curva de calibración (0 horas). Los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

La misma serie se mantuvo en el automuestreador a 5°C durante 17 horas y transcurrido este tiempo se reinyectaron al cromatógrafo.

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

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

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

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

[Concentración recuperada final] = concentración promedio recuperada de los mismos puntos control que permanecieron durante 17 horas en el automuestreador

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

3.10.6 Estabilidad de la muestra evaporada

Se prepararon por triplicado una serie de puntos control de oxicodona en plasma, se aplicó el método de extracción y se evaporaron. Las muestras se sellaron y mantuvieron en el ultracongelador a -70 °C por 25 horas. Trascurrido el tiempo se procedió a sacar la serie y se esperó a que las muestras llegaran a temperatura



ambiente para reconstituirlas.

Se preparó por triplicado otra serie de puntos control en plasma y una curva de calibración en plasma, se aplicó el método de extracción a la segunda serie y a la curva de calibración, se inyectaron las dos series y la curva de calibración en plasma y los valores de respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se calculó la concentración recuperada.

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

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

[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 25 horas en el ultracongelador evaporados

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



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Espectros de ionización de la oxycodona y metoprolol

La figura 4.1 muestra el espectro de ionización obtenido mediante la ionización por electro spray para oxycodona, se puede observar el ión precursor con valor de 316.2m/z y el ión producto con valor de 298.4m/z.

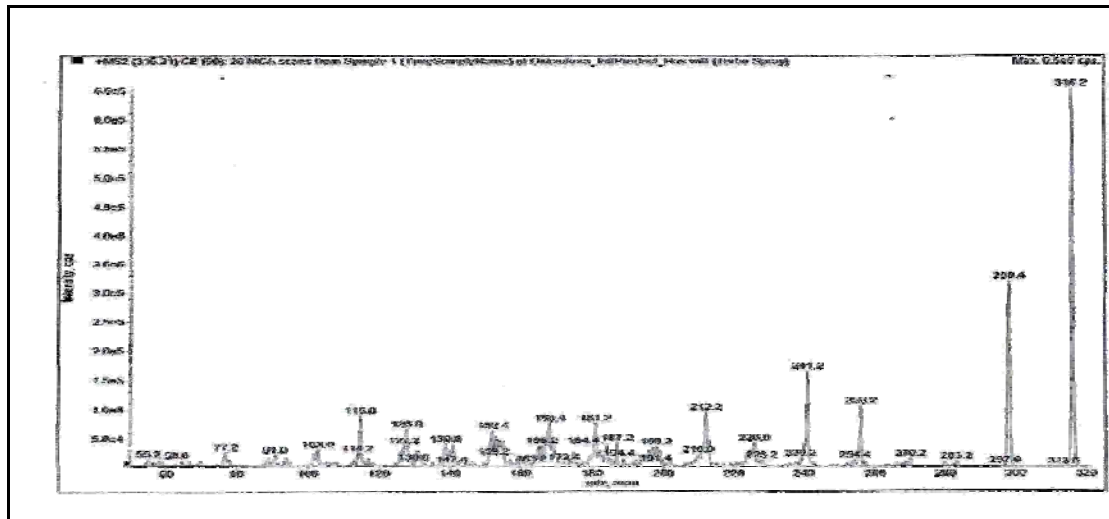


Figura 4.1 Muestra el espectro de ionización para oxycodona.

La figura 4.2 muestra el espectro de ionización obtenido mediante la ionización por electro spray para metoprolol, se puede observar el ión precursor con valor de 268.2m/z y el ión producto con valor de 116.2m/z.

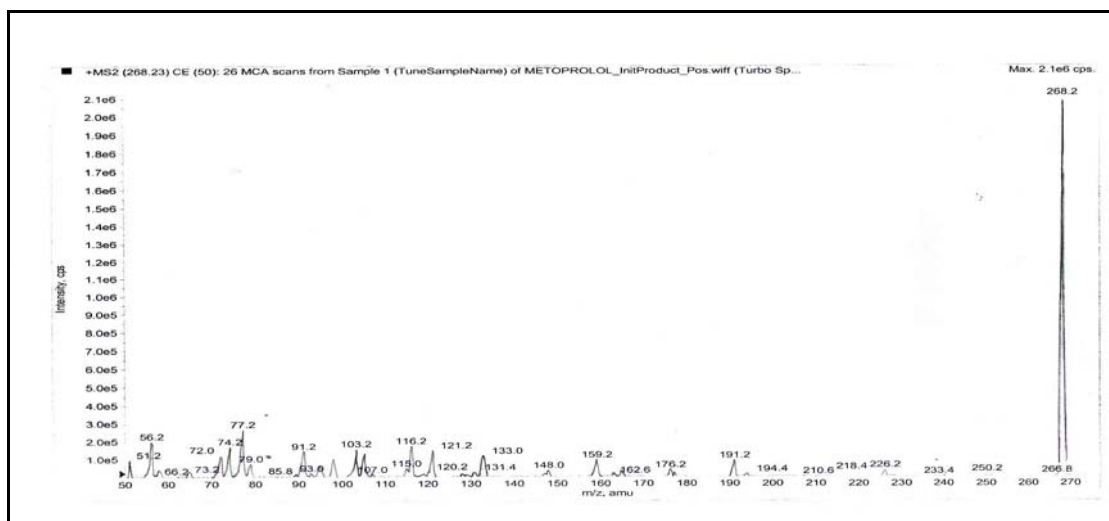


Figura 4.2 Muestra el espectro de ionización para metoprolol.



4.2 Selección de disolvente de extracción y estándar interno

Para cada mezcla de disolventes orgánicos (disolvente de extracción) se analizaron 18 muestras en las cuales se cuantificaron oxicodona, propanolol y metoprolol. En la tabla 4.1 se observa el porcentaje de coeficiente de variación obtenido y donde puede observarse que la mezcla ETER:HEXANO 60:40 presenta el menor porcentaje de coeficiente de variación para nuestro analito a cuantificar la oxicodona.

Tabla 4.1 Muestra diferentes combinaciones de disolventes orgánicos probados y el coeficiente de variación para cada analito.

COMPUESTO/ DISOLVENTE EXTRACCION	OXICODONA (%C.V.)	PROPANOLOL (%C.V.)	METOPROLOL (%C.V.)	DICTAMEN
ETER:HEXANO 60:40	9.72312756	4.88140135	1.86625441	RECOMENDADO
ETER:ACETATO DE ETILO 60:40	14.6449344	3.74867486	3.35725544	NO RECOMENDADO
TOLUENO:ISOPROPANOL 90:10	20.3382296	8.17885633	7.11881412	NO RECOMENDADO
ETER:DICLOROMETANO 90:10	19.5758497	4.93980787	3.29613787	NO RECOMENDADO

Por lo anterior se seleccionó la mezcla ETER:HEXANO 60:40 como nuestro disolvente de extracción. Con la mezcla seleccionada se procesaron 50 muestras con la finalidad de seleccionar el estándar interno de entre el propanolol y metoprolol, de los cuales, el que presentará un menor por ciento de coeficiente de variación sería el más adecuado. La tabla 4.2 muestra el porcentaje de coeficiente de variación obtenido.

Tabla 4.2 Muestra el coeficiente de variación de la cuantificación de los candidatos a estándar interno.

COMPUESTO	%C.V.	DICTAMEN
Propanolol	9.16	NO RECOMENDADO
Metoprolol	8.47	RECOMENDADO



4.3 Tiempos de retención de oxidodona y metoprolol

La figura 4.3 muestra los tiempos de retención de la oxidodona y el metoprolol en plasma, el cual es de 2.31 y 2.64 minutos respectivamente.

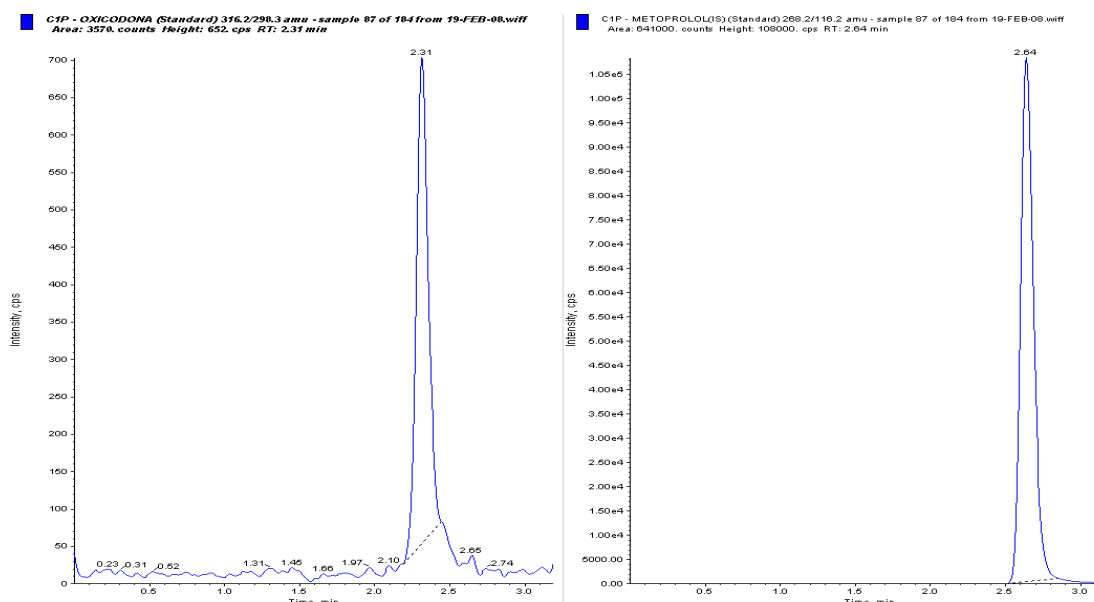


Figura 4.3 Cromatograma que muestra el tiempo de retención de la oxidodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

4.4 Selectividad

La figura 4.4 muestra el cromatograma del plasma de un voluntario en el cual se puede observar que no existe interferencia en el tiempo de retención de la oxidodona, pero sin embargo se encontró una señal de 160cps en el tiempo de retención del metoprolol. Dado que la señal de respuesta para el metoprolol a una concentración de 250ng/mL fue de 100 000cps, lo que representa el 100% y para la muestra del voluntario el 0.16% mucho menor al 5% que marca el criterio de aceptación. Este patrón se observa en los blancos de plasma. Todas las muestras que se sometieron a la prueba de selectividad cumplieron con el criterio de aceptación. En las figuras 4.4 a 4.11 se muestran diferentes cromatogramas de varias muestras sometidas a la prueba de selectividad.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

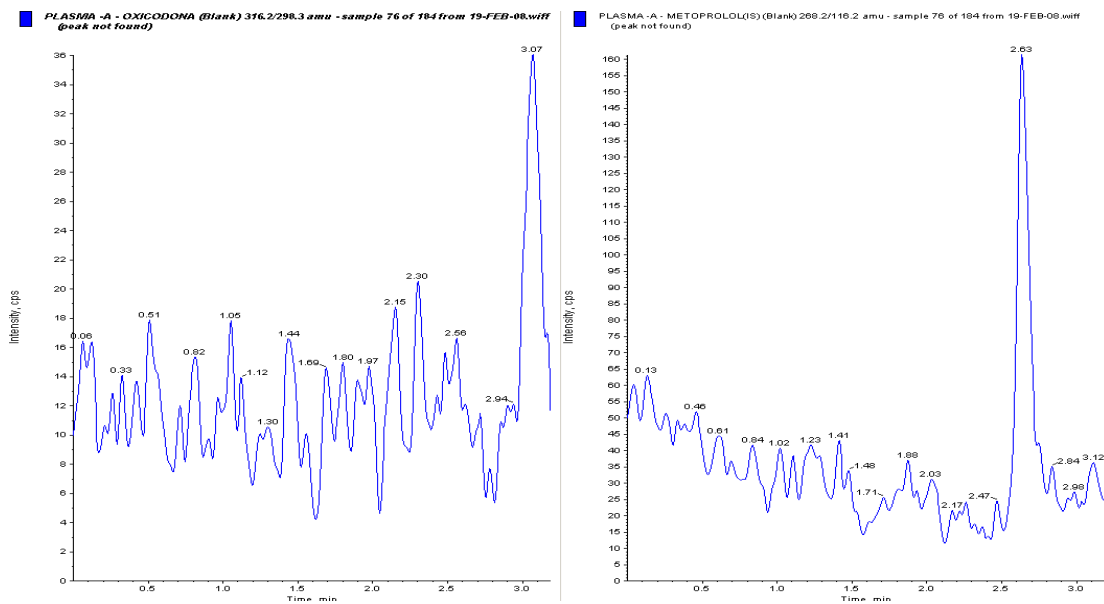


Figura 4.4 Cromatograma de la muestra blanco de un voluntario, oxicodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

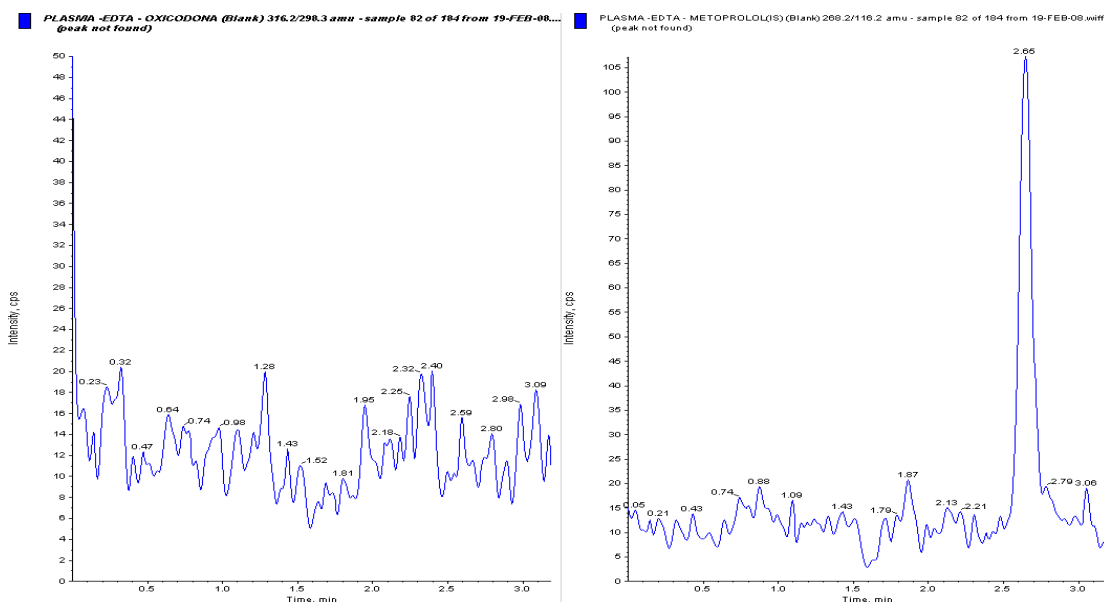


Figura 4.5 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-EDTA, oxicodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

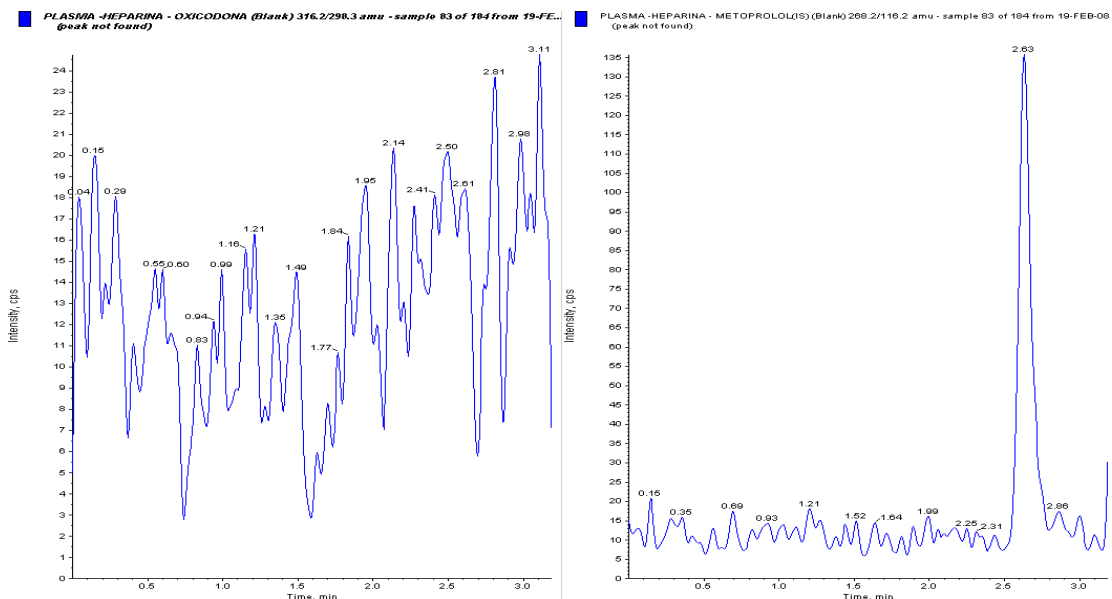


Figura 4.6 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-heparina, oxicodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

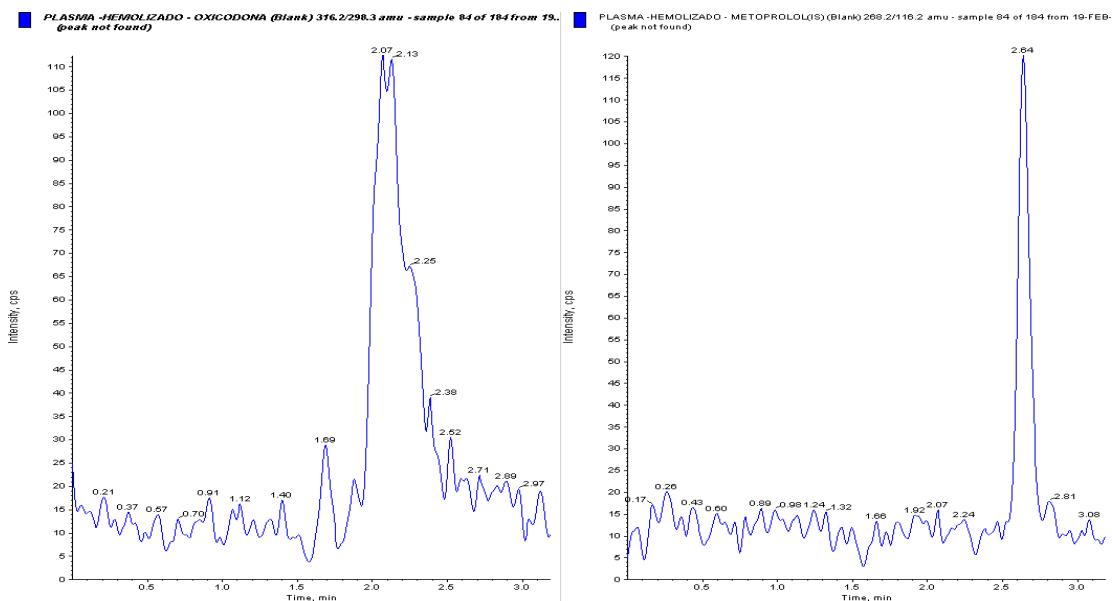


Figura 4.7 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-hemolizado, oxicodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

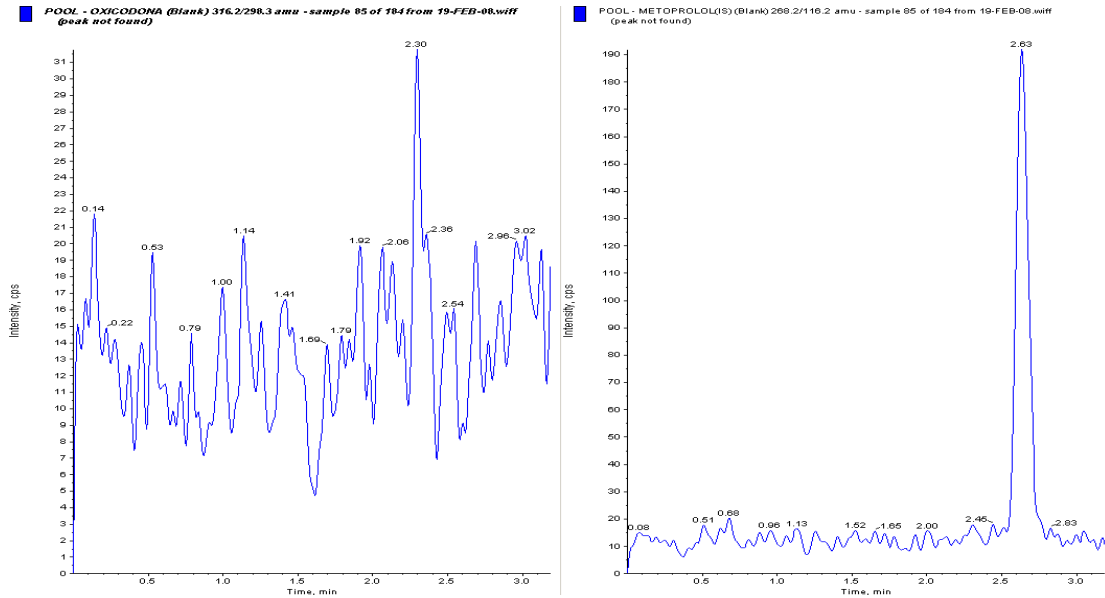


Figura 4.8 Cromatograma de la muestra blanco del pool de plasma, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

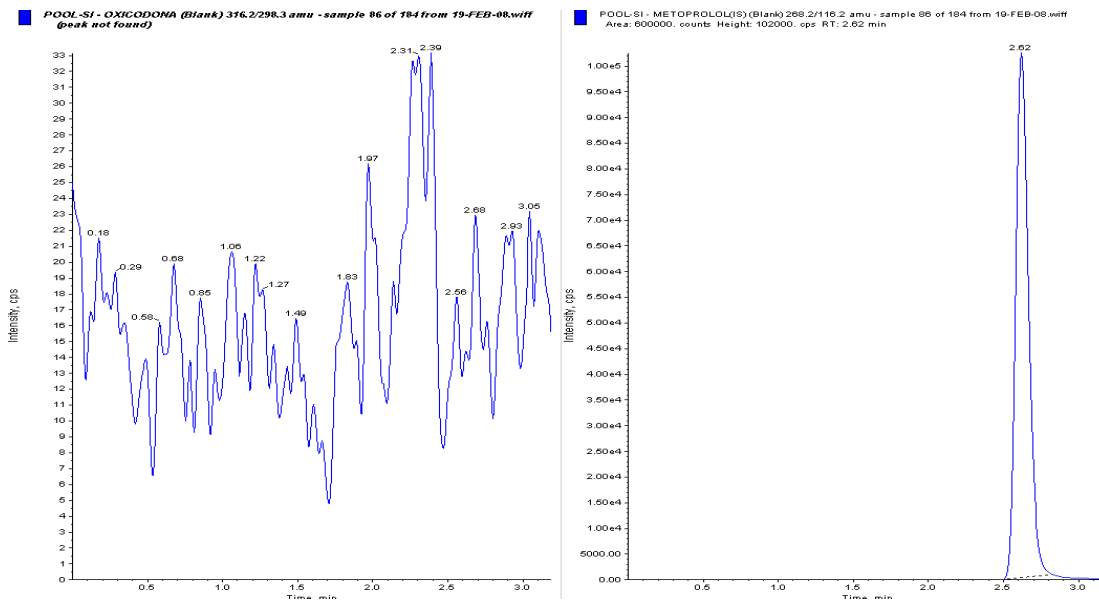


Figura 4.9 Cromatograma de la muestra blanco de plasma-estándar interno, oxycodona (izquierda) y el metoprolol (derecha).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

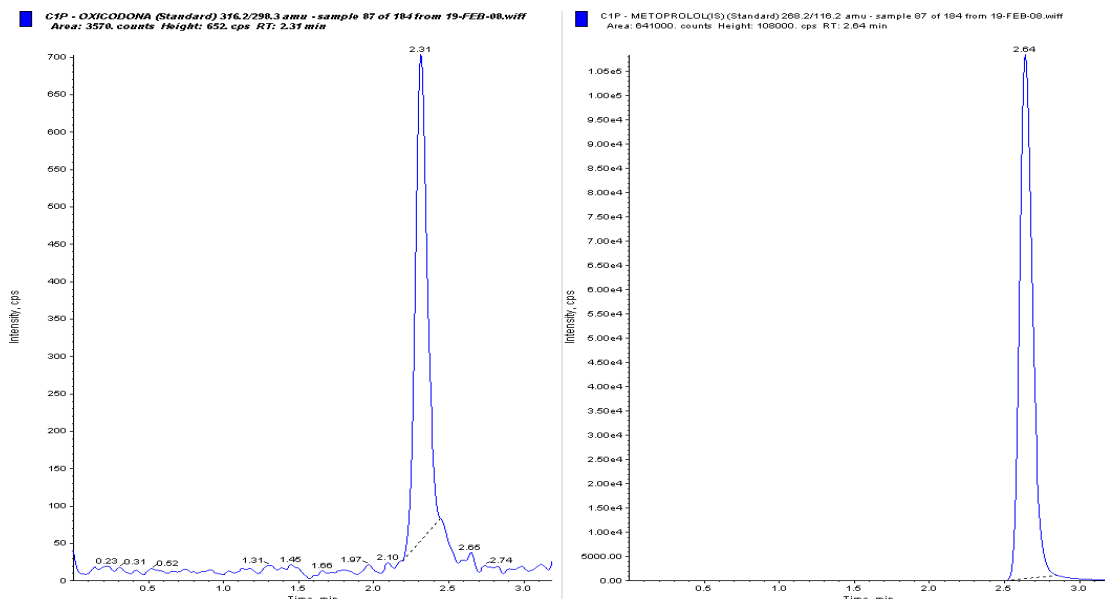


Figura 4.10 Cromatograma de la muestra blanco del pool adicionada de oxycodona a la concentración de 0.25 ng/mL (izquierda) y metoprolol a 250 ng/mL (derecha).

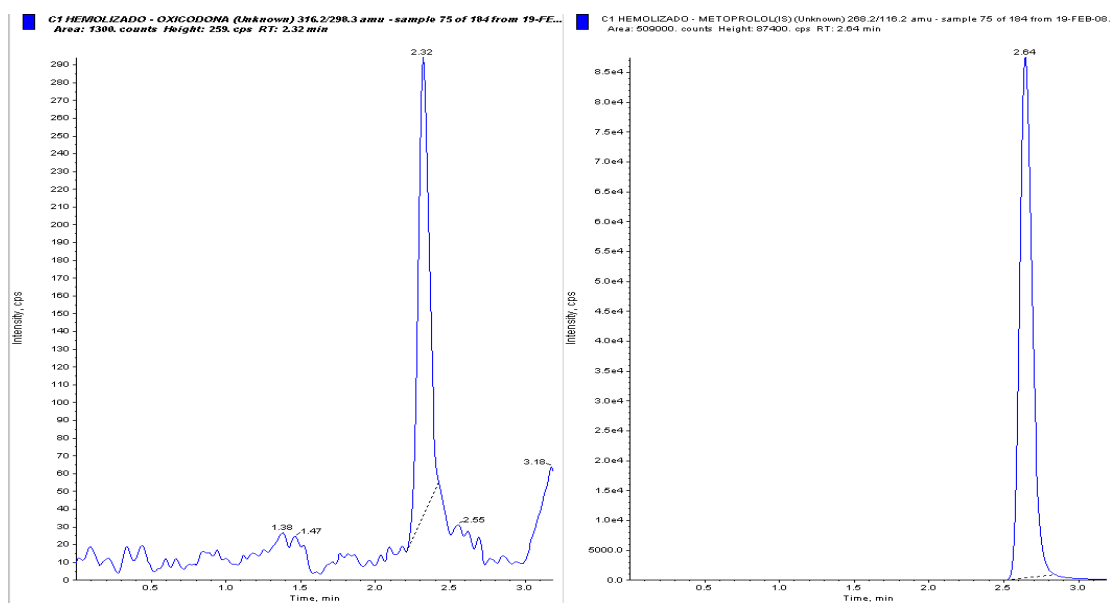


Figura 4.11 Cromatograma de la muestra blanco de plasma hemolizado adicionada de oxycodona a la concentración de 0.25 ng/mL (izquierda) y metoprolol a 250 ng/mL (derecha).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.5 Supresión Iónica

La figura 4.12 presenta el cromatograma del blanco de la prueba de supresión iónica para Oxicodona y Metoprolol. 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.

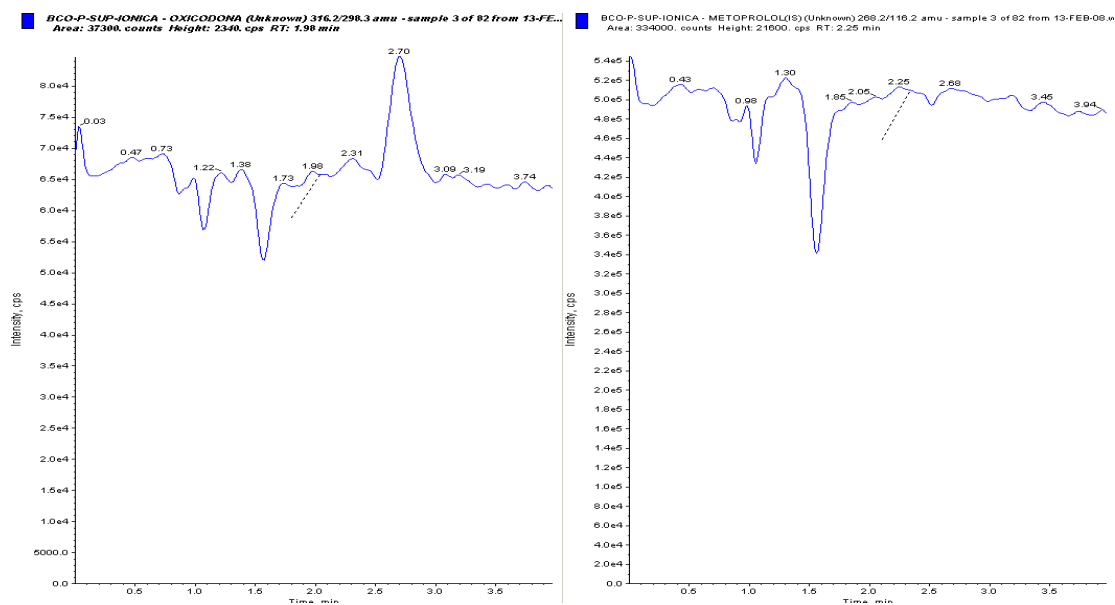


Figura 4.12 Cromatograma del blanco de la prueba de supresión iónica.

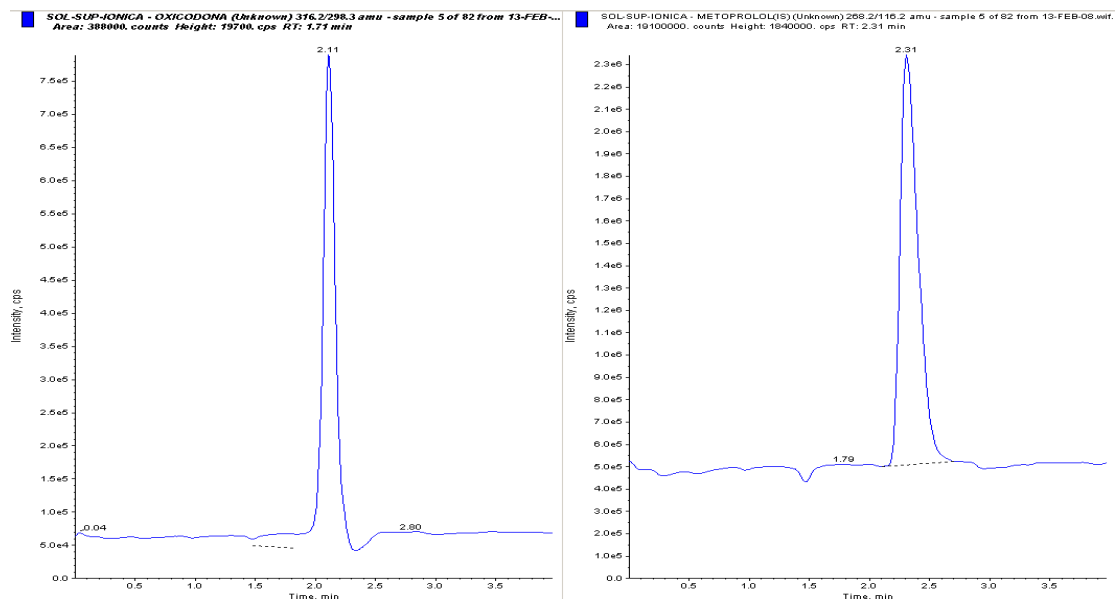


Figura 4.13 Cromatograma de oxicodona y el estándar interno de la prueba de supresión iónica.



4.6 Recobro

En la tabla 4.3 se muestran los resultados del porcentaje de recobro obtenidos para los puntos control de concentración de 0.75, 25 y 50 ng/mL de Oxycodona. Como se observa, el valor promedio fue del 82.3% y el coeficiente de variación para cada punto control fue menor al 15%, lo que indica que el recobro es reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado. En el caso del estándar interno el valor de recobro presentó un valor de recobro muy similar al promedio de la oxycodona.

Tabla 4.3 Por ciento de recobro de oxycodona y estandar interno.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	ÁREAS EN SOLUCIÓN DILUYENTE	ÁREAS EN PLASMA	% DE RECOBRO
MUESTRAS CONTROL BAJO			
0.75	20000	15800	84.722
0.75	19500	16400	
0.75	18100	16600	
PROMEDIO	19200	16267	
%C.V.	5.130	2.559	
MUESTRAS CONTROL MEDIO			
25	593000	508000	82.306
25	625000	511000	
25	647000	516000	
PROMEDIO	621666.66	511666.66	
%C.V.	4.368	0.790	
MUESTRAS CONTROL ALTO			
50	1280000	1020000	79.973
50	1170000	987000	
50	1190000	904000	
PROMEDIO	1213333	970333	
%C.V.	4.829	6.160	
RECOBRO ABSOLUTO PROMEDIO		82.333	
%C.V.		2.885	
ESTANDAR INTERNO			
250	1250000	1020000	81.934
250	1240000	1030000	
250	1130000	916000	
PROMEDIO	1206667	988667	
%C.V.	5.518	6.385	



4.7 Linealidad

En la tabla 4.4 se presentan los valores de respuesta contra concentración, la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, de cada una de las curvas de calibración en plasma. Los valores de coeficiente de correlación para cada una de las curvas fueron superiores a 0.98, lo que indica que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

Tabla 4.4 Curvas de calibración en plasma para determinar la linealidad

PUNTO No.	CONCENTRACION NOMINAL	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3
		AREA ANALITO/AREA ESTANDAR INTERNO	AREA ANALITO/AREA ESTANDAR INTERNO	AREA ANALITO/AREA ESTANDAR INTERNO
C1	0.25	0.003	0.003	0.003
C2	0.5	0.007	0.007	0.006
C3	1	0.013	0.013	0.013
C4	5	0.067	0.069	0.063
C5	10	0.139	0.135	0.139
C6	20	0.262	0.255	0.252
C7	30	0.413	0.383	0.382
C8	40	0.520	0.529	0.515
C9	60	0.737	0.758	0.738
	m	0.01254062	0.01274327	0.01243767
	b	0.00776135	0.00300661	0.00411322
	r	0.99846113	0.99963488	0.99951959

En la tabla 4.5 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. La figura 4.12 muestra la relación de concentración recuperada vs concentración adicionada para todos los datos de las tres curvas (global).



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 4.5 Linealidad del método analítico para la cuantificación de oxicodona en plasma (global).

CURVA	CONCENTRACION NOMINAL O ADICIONADA								
	0.25	0.5	1	5	10	20	30	40	60
	CONCENTRACION RECUPERADA								
1	0.227	0.489	0.975	5.147	10.633	20.181	31.713	40.013	56.681
2	0.241	0.512	0.976	5.320	10.479	19.753	29.677	41.023	58.817
3	0.241	0.484	1.000	4.995	10.969	19.956	30.289	40.699	58.399
PROM	0.236	0.495	0.984	5.154	10.694	19.963	30.560	40.578	57.966
DS	0.008	0.0149	0.014	0.163	0.251	0.214	1.045	0.516	1.132
%CV	3.420	3.016	1.439	3.155	2.343	1.072	3.418	1.271	1.953
%D.ABS	5.467	1	1.633	3.080	6.937	0.183	1.866	1.446	3.391

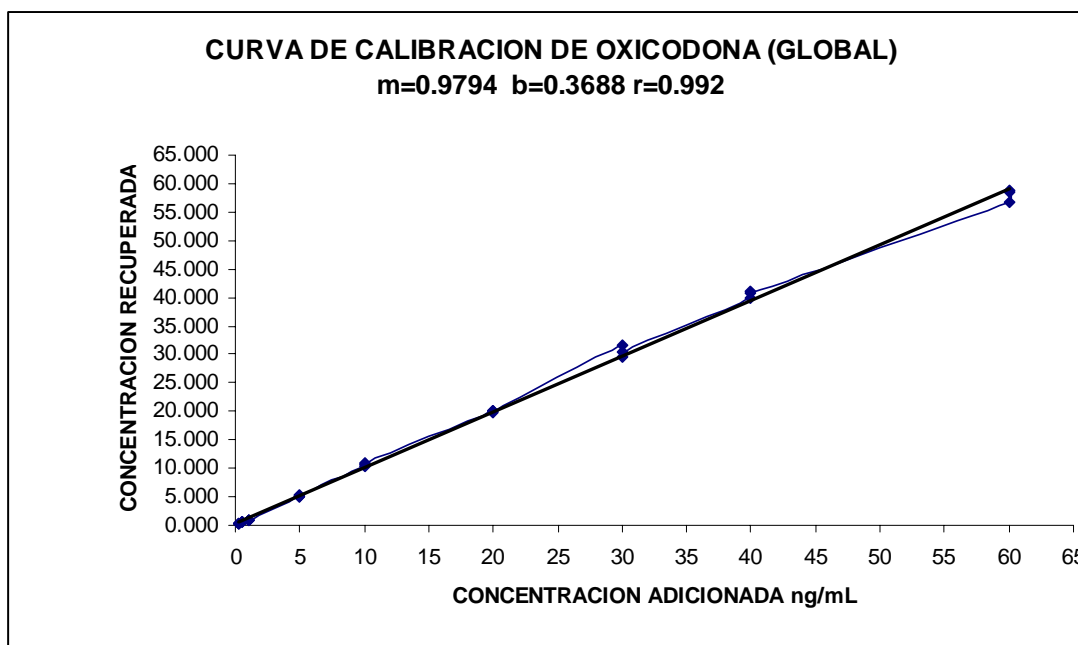


Figura 4.14. Linealidad del método analítico para la cuantificación de oxicodona en plasma



4.8 Precisión

En la tabla 4.6 se presentan los resultados de repetibilidad y en la tabla 4.7 la reproducibilidad en tres días diferentes de trabajo mientras que en la tabla 4.8 se presentan los valores de reproducibilidad entre tres analistas. En ellas se puede observar que los coeficientes de variación, para cada nivel de concentración, no exceden el 15% lo que indica que existe poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el método repetidas veces, por lo tanto el método es preciso.

Tabla 4.6 Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de oxycodona.

MUESTRA	CONCENTRACION RECUPERADA		
	MCB	MCM	MCA
1	0.756	23.876	47.759
2	0.723	24.639	48.997
3	0.769	24.618	50.826
4	0.748	23.875	53.832
5	0.818	24.210	50.600
PROMEDIO	0.763	24.244	50.403
DESVIACION ESTANDAR	0.035	0.377	2.288
%COEFICIENTE DE VARIACION	4.605	1.555	4.540
CONCENTRACION ADICIONADA ng/mL	0.75	25	50

Tabla 4.7 Reproducibilidad del método analítico en tres días diferentes para un analista

DIA	REPLICA	CONCENTRACION RECUPERADA		
		MCB	MCM	MCA
1	1	0.756	23.876	47.759
	2	0.723	24.639	48.997
	3	0.769	24.618	50.826
2	1	0.743	25.988	48.078
	2	0.856	25.212	46.101
	3	0.851	26.189	52.720
3	1	0.795	24.417	49.594
	2	0.766	21.825	48.183
	3	0.790	22.656	51.992
PROMEDIO		0.783	24.380	49.361
DESVIACION ESTANDAR		0.045	1.433	2.144
%COEFICIENTE DE VARIACION		5.809	5.878	4.343
CONCENTRACION ADICIONADA ng/mL		0.75	25	50



Tabla 4.8 Reproducibilidad del método analítico entre tres analistas diferentes.

ANALISTA	DIA	REPLICA	CONCENTRACION RECUPERADA		
			MCB	MCM	MCA
1	1	1	0.787	21.446	52.078
		2	0.761	25.533	45.163
		3	0.692	25.604	49.85
	2	1	0.741	25.754	50.969
		2	0.687	25.054	52.441
		3	0.740	24.020	51.604
	3	1	0.791	27.940	55.391
		2	0.766	27.738	57.037
		3	0.789	27.543	54.329
2	1	1	0.725	27.295	51.427
		2	0.729	26.101	51.264
		3	0.696	26.947	51.079
	2	1	0.673	27.339	49.085
		2	0.716	25.636	48.257
		3	0.712	25.091	48.301
	3	1	0.678	22.161	44.859
		2	0.688	27.480	47.822
		3	0.822	21.369	49.507
3	1	1	0.756	23.876	47.759
		2	0.723	24.639	48.997
		3	0.769	24.618	50.826
	2	1	0.743	25.988	48.078
		2	0.856	25.212	46.101
		3	0.851	26.189	52.720
	3	1	0.795	24.417	49.594
		2	0.766	21.825	48.183
		3	0.790	22.656	51.992
PROMEDIO			0.750	25.166	50.175
DESVIACION ESTANDAR			0.050	1.962	2.890
%COEFICIENTE DE VARIACION			6.704	7.798	5.759
CONCENTRACION ADICIONADA ng/mL			0.75	25	50



4.9 Exactitud

En las tablas 4.9, 4.10 y 4.11 se presentan los valores de porcentaje de desviación absoluta de los puntos control derivados de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. Dado que todos los valores fueron menores al 15 %, se concluye que el método es exacto.

Tabla 4.9. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona en plasma.

MUESTRA	% DESVIACION ABSOLUTA		
	MCB	MCM	MCA
1	0.800	4.496	4.482
2	3.600	1.444	2.006
3	2.533	1.528	1.652
4	0.267	4.500	7.664
5	9.067	3.160	1.200
PROMEDIO	3.253	3.026	3.401

Tabla 4.10. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona en diferentes días.

DIA	REPLICA	% DESVIACION ABSOLUTA		
		MCB	MCM	MCA
1	1	0.8	4.49	4.48
	2	3.6	1.44	2.00
	3	2.53	1.52	1.65
2	1	0.93	3.95	3.84
	2	14.13	0.84	7.79
	3	13.46	4.75	5.44
3	1	6	2.33	0.81
	2	2.13	12.7	3.63
	3	5.33	9.37	3.98
PROMEDIO		5.43	4.60	3.73



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 4.11. Exactitud del método analítico para la cuantificación de oxycodona entre tres diferentes analistas.

ANALISTA	DIA	REPLICA	% DESVIACION ABSOLUTA		
			MCB	MCM	MCA
1	1	1	4.933	14.216	4.156
		2	1.466	2.132	9.674
		3	7.733	2.416	0.300
	2	1	1.2	3.016	1.938
		2	8.4	0.216	4.882
		3	1.333	3.92	3.208
	3	1	5.466	11.76	10.782
		2	2.133	10.952	14.074
		3	5.2	10.172	8.658
2	1	1	3.333	9.18	2.854
		2	2.8	4.404	2.528
		3	7.2	7.788	2.158
	2	1	10.266	9.356	1.830
		2	4.533	2.544	3.486
		3	5.066	0.364	3.398
	3	1	9.6	11.356	10.282
		2	8.266	9.92	4.356
		3	9.6	14.524	0.986
3	1	1	0.8	4.496	4.482
		2	3.6	1.444	2.006
		3	2.533	1.528	1.652
	2	1	0.933	3.952	3.844
		2	14.133	0.848	7.798
		3	13.466	4.756	5.440
	3	1	6	2.332	0.812
		2	2.133	12.7	3.634
		3	5.333	9.376	3.984
PROMEDIO			5.462	6.284	4.563

4.10 Limite cuantificación

La tabla 4.12 muestra los valores de concentración recuperada de cada una de las cinco 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 (Desviación absoluta). Así mismo el coeficiente de variación de las cinco determinaciones no fue mayor al 20%. Por lo anterior se consideró que el límite de cuantificación de oxycodona es la concentración de 0.25 ng/mL.



Tabla 4.12 Limite de cuantificación.

REPLICA	CONCENTRACION RECUPERADA	% DESVIACION ABSOLUTA
1	0.276	10.400
2	0.265	6.000
3	0.267	6.800
4	0.271	8.400
5	0.253	1.200
PROMEDIO	0.266	6.560 Promedio % Desviación Absoluta
DESVIACION ESTANDAR	0.009	
%COEFICIENTE DE VARIACION	3.225	

4.11 Efecto de dilución

En la tabla 4.13 se muestran los resultados de concentración recuperada del control alto y del control alto diluido, en ella se puede observar que el coeficiente de variación fue bajo y la desviación absoluta fue cercana al 2%. Los datos indican que al diluir la muestra los resultados serán confiables, el % de desviación absoluta cumple con el criterio de aceptación para esta prueba.

Tabla 4.13 Efecto de dilución del control alto

REPLICA	CONCENTRACION RECUPERADA CONTROL ALTO	CONCENTRACION RECUPERADA CONTROL ALTO DILUIDO
1	42.588	48.372
2	51.89	52.415
3	56.921	53.345
4	54.915	51.67
5	50.069	50.901
6	48.804	55.471
PROMEDIO	50.865	52.029
DESVIACION ESTANDAR	5.050	2.388
%COEFICIENTE DE VARIACION	9.929	4.589
% DESVIACION ABSOLUTA		2.289



4.12 Estabilidad

En la tabla 4.14 se muestran los resultados de estabilidad de oxycodona 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 313 días sin que sufran degradación.

Los resultados de estabilidad de en ciclos de congelación-descongelación, (tabla 4.15) se encontró que las muestras pueden someterse a 5 ciclos de congelación descongelación sin que sufran degradación.

En la tabla 4.16 se presentan los resultados de estabilidad a temperatura ambiente. Al analizar los resultados se encontró que la oxycodona es muy estable en plasma por lo que las muestras pueden mantenerse durante 113 h en la mesa de trabajo, sin que sufran degradación.

De los resultados de estabilidad de la muestra procesada que se presentan en la tabla 4.17 se puede observar que éstas pueden mantenerse en el automuestreador durante un período de 22 horas, ello permitirá analizar un gran número de muestras en una misma corrida analítica.

De los resultados de estabilidad de la muestra reinyectada (tabla 4.18), se demuestra que es válido reinyectar las muestras cuando algún evento fortuito interrumpa el análisis.

La estabilidad de la muestra evaporada permite determinar si es válido mantener las muestras en el ultracongelador a -70°C , en el caso de que se requiera interrumpir el análisis. Los resultados de la tabla 4.19 demuestran que las muestras son estables durante 25 horas.



Tabla 4.14 Estabilidad de la muestra a largo plazo 313 días.

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.698	13.928	50.278
2	0.700	14.155	47.998
3	0.706	14.063	49.414
Promedio	0.701	14.049	49.230
DESV.EST	0.004	0.114	1.151
%CV	0.594	0.813	2.338
Concentración recuperada final después 313 Días			
1	0.668	13.363	47.996
2	0.689	12.948	47.359
3	0.729	13.602	48.621
Promedio	0.695	13.304	47.992
DESV.EST	0.031	0.331	0.631
%CV	4.457	2.487	1.315
%Desv.Abs.	0.856	5.298	2.515

Tabla 4.15 Estabilidad en cinco ciclos de congelación-descongelación.

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.795	24.417	49.594
2	0.766	21.825	48.183
3	0.790	22.656	51.992
Promedio	0.784	22.966	49.923
DESV EST	0.016	1.324	1.926
%CV	1.978	5.763	3.857
Concentración recuperada final después de cinco ciclos de congelación-descongelación			
1	0.753	26.263	47.541
2	0.743	26.494	50.044
3	0.74	25.509	51.165
Promedio	0.745	26.089	49.583
DESV EST	0.007	0.515	1.855
%CV	0.913	1.975	3.742
%Desv. Abs.	4.892	13.597	0.680

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Tabla 4.16 Estabilidad a temperatura ambiente 113 horas.

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.791	27.940	55.391
2	0.766	27.738	57.037
3	0.789	27.543	54.329
Promedio	0.782	27.740	55.586
DESV.EST	0.014	0.199	1.364
%CV	1.777	0.716	2.455
Concentración recuperada final después 113 horas			
1	0.684	26.516	55.343
2	0.722	26.170	51.506
3	0.712	26.515	52.012
Promedio	0.706	26.400	52.954
DESV.EST	0.020	0.199	2.085
%CV	2.790	0.756	3.937
%Desv.Abs.	9.719	4.831	4.735

Tabla 4.17 Estabilidad de la muestra procesada 22horas.

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.788	21.468	52.133
2	0.761	25.560	45.210
3	0.692	25.631	49.903
Promedio	0.747	24.220	49.082
DESV.EST	0.050	2.383	3.534
%CV	6.628	9.840	7.200
Concentración recuperada final después 22 horas			
1	0.745	27.049	52.064
2	0.690	26.249	56.970
3	0.669	25.316	56.219
Promedio	0.701	26.205	55.084
DESV.EST	0.039	0.867	2.643
%CV	5.596	3.310	4.797
%Desv.Abs.	6.113	8.196	12.229



Tabla 4.18 Estabilidad de la muestra reinyectada 17 horas

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.788	21.468	52.133
2	0.761	25.560	45.210
3	0.692	25.631	49.903
Promedio	0.747	24.220	49.082
DESV.EST	0.050	2.383	3.534
%CV	6.628	9.840	7.200
Concentración recuperada final después 17 horas			
1	0.781	26.128	49.740
2	0.717	25.583	44.350
3	0.674	23.994	47.367
Promedio	0.724	25.235	47.152
DESV.EST	0.054	1.109	2.701
%CV	7.437	4.394	5.729
%Desv.Abs.	3.079	4.192	3.932

Tabla 4.19 Estabilidad de la muestra evaporada 25 horas

Concentración recuperada inicial			
Replica	MCB	MCM	MCA
Concentración adicionada	0.75	25	50
1	0.678	22.161	44.859
2	0.688	27.480	47.822
3	0.822	21.369	49.507
Promedio	0.729	23.670	47.396
DESV.EST	0.080	3.323	2.353
%CV	11.025	14.040	4.965
Concentración recuperada final después 25 horas			
1	0.730	23.590	50.554
2	0.669	23.445	45.916
3	0.719	23.781	46.293
Promedio	0.706	23.605	47.588
DESV.EST	0.033	0.169	2.576
%CV	4.605	0.714	5.413
%Desv.Abs.	3.199	0.273	0.404

CONCLUSIONES



Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas-masas para la cuantificación de Oxycodona en plasma. Para ello se utilizó un volumen de 400 μ L de plasma, una columna Phenomenex Gemini C₁₈ y Acetonitrilo:Formiato de amonio 0.7mM como fase móvil (43:57)

El método desarrollado fue:

- Rápido ya que requiere un tiempo de corrida es de 3 minutos, por lo que pueden analizarse un gran número de muestras por día.
- Lineal, preciso, exacto y selectivo en el rango de concentraciones de 0.25-60 ng/mL.
- Con un recobro promedio del 82% de la muestra inicial.
- Sensible, con un límite de cuantificación de 0.25 ng/mL.
- Los analitos en plasma son estables, a -70 ° C por un período de 313 días, por 113 horas a temperatura ambiente, sometiéndola a 5 ciclos de congelación-descongelación, por 22 horas después de procesadas.

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

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Moffat C. Anthony, Osselton M. David, Widdop Brian, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004, Pharmaceuticals Press, 2004.
2. Oxidona clorhidrato, Tabletas USP, Monografía de Producto, Mallinckrodt, Revisión 122805.
3. Katzung, Beltram G. Farmacología Básica y Clínica 5a Edición. Manual Moderno. México 1994.
4. Benzinger DP, Kaiko Rf, Mohitto CB, et al. Differential effects of food on the bioavailability of controlled-release oxycodone tablets and immediate-release oxycodone solution. J Pharmac Sciences 1996; 85: 407-10.
5. Kaiko RF, Benziger DP, Fitzmartin RD, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of controlled release oxycodone. Clin Pharmacol Ther 1996; 59: 52-61.
6. Lalovic Bojan, Kharasch Evan, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral oxycodone in healthy human subjects: Role of circulating active metabolites. Clin Pharmacol Ther 2006;79:461-79.
7. Jannetto PJ, Wong SH, Gock SB, et al. Pharmacogenomics as molecular autopsy for postmortem forensic toxicology: genotyping cytochrome P450 2D6 for oxycodone cases. J Anal Toxicol 2002; 26: 438-47.
8. Cairns R. The use of oxycodone in cancer-related pain: a literature review. Int J Palliat Nurs 2001; 7: 522-7.
9. Levy MH. Advancement of opioide analgesia with controlled-release oxycodone. Eur J Pain 2001; 5 (Supl. A): 113-6.
10. Leow KP, Wright AWE, Cramond T, et al. Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. Ther Drug Monit 1993; 15: 440-7.
11. Oxycontin® (Clorhidrato de oxidona). Monografía de producto. Mundipharma, 2004. p. 35.



12. Mandema JW, Kaiko RF, Oshlack B, et al. Characterization and validation of a pharmacokinetic model controlled-release oxycodone. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42: 747-56.
13. Curtis GB, Johnson GH, Clark P, et al. Relative potency of controlled-release oxycodone and controlled-release morphine in a postoperative pain model. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 425-9.
14. Ross FB, Smith MT. The intrinsic antinociceptive effects of oxycodone appear to be kappa opioid receptor mediated. *Pain* 1997; 73: 151-7.
15. Saarialho-Kere U, Mattila MJ, Seppälä T. Psychomotor, respiratory and neuroendocrinological effects of a μ -opioid receptor agonist (Oxycodone) in healthy volunteers. *Pharmacol Toxicol* 1989; 65: 252-7.
16. Shad SH, Hardy J. Oxycodone: a review of the literature. *Eur J Palliative Care* 2001; 8: 93-6.
17. Ripamonti C, Duke Dikerson E. Strategies for the treatment of cancer pain in the new millennium. *Drugs* 2001; 61: 955-77.
18. Davis MP, Varga J, Dickerson D, et al. Normal-release and controlled-release oxycodone: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and controversy. *Support Care Cancer* 2003; 11: 84-92.
19. Ross FB, Wallis SC, Smith MT. Co-administration of sub-antinociceptive doses of oxycodone and morphine produces marked antinociceptive synergy with reduced CNS side-effects in rats. *Pain* 2000; 84: 421-8.
20. Lauretti GR, Oliveira GM, Pereira NL. Comparison of sustained-release morphine with sustained-release oxycodone in advanced cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 89: 2027-30.
21. Martindale: The Complete Drug Reference, 34^a Edición, The Pharmaceutical Press, 2005, pp.82,83.
22. Ley General de Salud.
23. Curtis GB, Johnson GH, Clark P, et al. Relative potency of controlled-release oxycodone and controlled-release morphine in a postoperative pain model. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 425-9.



24. Inturrisi ChE. Clinical pharmacology of opioids for pain. Clin J Pain 2002; 18: S3-S13.
25. Schneir AB, Vadeboncoeur TF, Offerman SR, et al. Massive OxyContin ingestion refractory to naloxone therapy. Ann Emerg Med 2002; 40: 425-8.
26. Kapil Ram P., Padovani Patricia K., et al. Nanogram level quantitation of oxycodone in human plasma by capillary gas chromatography using nitrogen-phosphorus selective detection. Journal of Chromatography, 577 (1992) 283-287.
27. Michael Dawson, Bronwyn Fryirs, Tamsin Kelly, Jim Keegan, and Laurence E. Mather. A Rapid and Sensitive High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Triple Quadrupole Mass Spectrometry Method for the Quantitation of Oxycodone in Human Plasma. Journal of Chromatographic Science, Vol. 40, January 2002
28. 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.
29. FDA. Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM, mayo 2001.
30. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. Mass Spectrometry Reviews. **1990**, 9, 37.
31. Mass Spectrometry Glossary of Terms
www.specstrocopynow.com
32. Skoog, Douglas A. Principles of Instrumental Análisis, 5ª Edición, 1998, Brooks/Cole Thomson Learning.
33. An Introduction to Mass Spectrometry
<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>



BIBLIOGRAFÍA

34. Plascencia Villa, G., 2003, Maestría En Ciencias Bioquímicas; Curso De Métodos; Espectrometría De Masas, Instituto de Biotecnologías; Universidad Autónoma Nacional de Mexico, Mexico D.F., (en línea) Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf
35. An Introduction to Mass Spectrometry
<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>
36. Busch K.L., Glish G.L., McLuckey S.A. Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem. John Wiley & Sons, 1989.
37. Scripps Center for Mass Spectrometry
<http://masspec.scripps.edu/services/map.php>
38. <http://www.asofarma.com.gt/oxycontin.htm>