



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

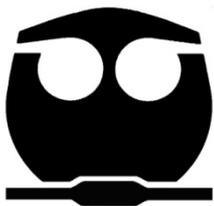
**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA  
LA CUANTIFICACIÓN DE ERDOSTEINA Y  
METABOLITO M1 EN PLASMA HUMANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

LILIANA ELIZABETH RONCES FRUTOS



FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Helgi Helene Jung Cook

**VOCAL:** Profesor: Inés Fuentes Noriega

**SECRETARIO:** Profesor: María Isabel Ruiz Olmedo

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Myriam Cortés Fuentes

**2° SUPLENTE:** Profesor: Liz Jannet Medina Reyes

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CENTRO A. F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS (CAFET)**

---

**ASESOR DEL TEMA:**

**MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO**

---

**SUSTENTANTE:**

**LILIANA ELIZABETH RONCES FRUTOS**

---

---

*A mis seres amados:*

*José*

*Ana María*

*Alejandra*

*Salvador Ángel*

*Tengo una grande y determinada determinación,*

*de no parar hasta llegar,*

*venga lo que viniere,*

*suceda lo que sucediere,*

*trabaje lo que trabajare,*

*murmure quien murmurare,*

*siquiera me muera en el camino,*

*siquiera se hunda el mundo...*

*Teresa de Ávila.*

---

---

## **GRACIAS...**

A Dios, por haberme permitido alcanzar mis metas, por darme la capacidad y la fortaleza para seguir adelante, por poner en mi camino a personas maravillosas que me aman y por darme la humildad de admitir que, sin su ayuda, no sería lo que ahora soy...

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional, por la paciencia y dedicación con que sembraron las bases que me sustentan, por la confianza y libertad para trazar mi propio camino y por todas y cada una de las veces que han estado ahí para mí...

A mi hermana, por su apoyo y amor, por ser mi confidente, cómplice y consejera, por todos los momentos juntas, por hacerme ver el lado positivo de las cosas y arrancarme una sonrisa hasta en los momentos más difíciles... Y por saber lo que quiero decir sin tener que decirlo...

A mi Ángel personal, por la paciencia, apoyo y confianza, por las palabras de aliento en el momento oportuno, por todos estos años a mi lado, por los obstáculos que vencimos y que nos permitieron aprender y crecer juntos... Y por descubrir junto conmigo que el Amor es más fuerte que la distancia...

A Isabel Ruiz, por todas las oportunidades brindadas, por los consejos y el apoyo para la realización de este trabajo, por la confianza depositada en mí y sobre todo por la amistad cosechada durante este tiempo...

Al Centro A. F. de Estudios Tecnológicos (CAFET), especialmente a Myriam Cortés, por permitirme realizar este trabajo. A toda la gente que colaboró conmigo y que contribuyó a mi crecimiento profesional y personal: Carlos, Luis, Miguel, Mary, Guille, y a todos aquellos que no alcancé a mencionar. Mi más sincero agradecimiento...

A los miembros del jurado por brindar un poco de su tiempo a la revisión de este trabajo y por las correcciones y aclaraciones hechas para este...

---

---

A mis amigos y compañeros, por compartir conmigo este y muchos otros momentos importantes. A Marcela, Ricardo, Gerardo, Servin, Mijussa, Aldo, Toño y Erika por cultivar la amistad a pesar de nuestra falta de tiempo. A Narda, Angelica, Areli, Luz, Diana, Luna y especialmente a Viri, por hacer mi estancia en la facultad más llevadera...

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por abrirme las puertas hacia el conocimiento y darme todos los medios para poder realizar mi formación profesional. Me siento orgullosa de poder ser parte de esta Universidad...

*Por mi raza hablará el espíritu.*

---

[ ÍNDICE ]

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
3. GENERALIDADES	
3.1 Monografía de Erdosteina y Metabolito M1.....	7
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas .....	7
3.1.2 Farmacocinética.....	8
3.1.3 Farmacodinamia .....	9
3.1.4 Usos terapéuticos y dosis .....	10
3.1.5 Reacciones adversas .....	10
3.2 Métodos analíticos para cuantificar Erdosteina .....	11
3.3 Estudios de Erdosteina.....	12
3.4 Normatividad mexicana para estudios de Intercambiabilidad .....	12
3.5 Validación de métodos bioanalíticos .....	13
3.5.1 Características y parámetros de validación .....	13
3.6 Fundamento de Espectrometría de Masas .....	18
3.6.1 Instrumentación en Espectrometría de Masas .....	19
3.6.1.1 Introducción de la muestra .....	19
3.6.1.2 Métodos de ionización .....	19
3.6.1.2.1 Ionización por Electrospray .....	20
3.6.1.3 Analizadores de masas .....	22
3.6.1.4 Detectores .....	24
3.6.2 Espectrometría de Masas/Masas .....	24
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Reactivos, material y equipo .....	27
4.2 Preparación de soluciones de trabajo .....	28
4.3 Preparación de las soluciones estándar, adecuación del sistema, curva de calibración y puntos control de Erdosteina y Metabolito M1 .....	29
4.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificar de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano .....	32
4.4.1 Espectros de masas .....	32
4.4.2 Condiciones cromatográficas .....	33

## ÍNDICE

---

4.4.3	Método de extracción de fluido biológico .....	33
4.5	Validación del método analítico para la cuantificación Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano.....	34
4.5.1	Rango .....	34
4.5.2	Recuperación absoluta .....	34
4.5.2.1	Recuperación de blancos de plasma y muestras adicionadas .....	35
4.5.3	Linealidad .....	36
4.5.4	Precisión .....	36
4.5.4.1	Repetibilidad .....	36
4.5.4.2	Reproducibilidad .....	37
4.5.5	Exactitud .....	37
4.5.6	Estabilidad .....	38
4.5.6.1	Estabilidad a largo plazo .....	38
4.5.6.2	Estabilidad en la mesa de trabajo .....	38
4.5.6.3	Estabilidad de la muestra procesada .....	39
4.5.6.4	Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación .....	40
4.5.7	Límite de cuantificación .....	40
4.5.8	Límite de detección .....	41
4.5.9	Selectividad .....	41
4.5.9.1	Compuestos endógenos de la matriz biológica .....	41
4.5.9.2	Fármacos de uso común .....	41
4.5.10	Tolerancia .....	42
4.5.10.1	Tolerancia a plasma hemolizado y lipídico .....	42
4.5.11	Acarreamiento .....	42
4.6	Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos ....	43
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	
5.1	Espectros de masas .....	45
5.2	Tiempos de retención .....	47
5.3	Adecuación del sistema.....	47
5.4	Validación del método analítico .....	48
5.4.1	Recuperación absoluta .....	48
5.4.1.1	Recuperación de blancos de plasma y muestras adicionadas .....	48
5.4.2	Linealidad .....	51
5.4.3	Precisión .....	54

## ÍNDICE

---

5.4.4	Exactitud.....	57
5.4.5	Estabilidad.....	58
5.4.5.1	Estabilidad a largo plazo .....	58
5.4.5.2	Estabilidad en la mesa de trabajo .....	59
5.4.5.3	Estabilidad de la muestra procesada .....	60
5.4.5.4	Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación .....	61
5.4.6	Límite de cuantificación .....	62
5.4.7	Límite de detección .....	64
5.4.8	Selectividad .....	64
5.4.8.1	Compuestos endógenos de la matriz biológica .....	64
5.4.8.2	Fármacos de uso común .....	66
5.4.9	Tolerancia .....	67
5.4.9.1	Tolerancia a plasma hemolizado y lipídico .....	67
5.4.10	Acarreamiento .....	69
5.5	Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos .....	70
6.	CONCLUSIONES .....	75
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	77

## ÍNDICE

---

### LISTA DE TABLAS

### PÁGINA

Tabla 1. Esquema de preparados, dosis y vías de administración.....	10
Tabla 2. Métodos para la cuantificación de Erdosteina.....	11
Tabla 3. Concentraciones parciales de la curva de calibración y los puntos control.....	31
Tabla 4. Concentraciones finales de la curva de calibración y puntos control.....	32
Tabla 5. Gradiente de elución durante la inyección.....	34
Tabla 6. Coeficientes de variación de la adecuación del sistema durante los 6 días de validación.....	47
Tabla 7. Recuperación absoluta. Áreas de Erdosteina en muestras acuosas y Plasmáticas.....	49
Tabla 8. Porcentaje de recuperación absoluta de Erdosteina.....	49
Tabla 9. Recuperación absoluta. Áreas del Metabolito M1 en las muestras acuosas y plasmáticas.....	50
Tabla 10. Porcentaje de recuperación absoluta del Metabolito M1.....	50
Tabla 11. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas y plasmáticas de Tartrato de metoprolol y porcentaje de recuperación.....	51
Tabla 12. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de las curvas de Erdosteina generadas durante la evaluación de la linealidad del método y porcentaje de diferencia respecto a la concentración nominal.....	52
Tabla 13. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de las curvas de Metabolito M1 generadas durante la evaluación de la linealidad del método y porcentaje de diferencia respecto a la concentración nominal.....	52
Tabla 14. Linealidad. Ordenada al origen, pendiente y coeficientes de determinación de las curvas de Erdosteina.....	53
Tabla 15. Linealidad. Ordenada al origen, pendiente y coeficientes de determinación de las curvas del Metabolito M1.....	53
Tabla 16. Resultados de Precisión para Erdosteina.....	55
Tabla 17. Resultados globales de Precisión para Erdosteina.....	56
Tabla 18. Resultados de Precisión para el Metabolito M1.....	56
Tabla 19. Resultados globales de Precisión para el Metabolito M1.....	57
Tabla 20. Resultados de Exactitud para Erdosteina.....	57
Tabla 21. Resultados de Exactitud para el Metabolito M1.....	58

## ÍNDICE

---

Tabla 22. Estabilidad a largo plazo (Erdosteina). Almacenamiento durante 91 días a -70° C.....	59
Tabla 23. Estabilidad a largo plazo (Metabolito M1). Almacenamiento durante 91 días a -70° C.....	59
Tabla 24. Estabilidad en la mesa de trabajo. Resultados para Erdosteina.....	60
Tabla 25. Estabilidad en la mesa de trabajo. Resultados para el Metabolito M1.....	60
Tabla 26. Estabilidad de la muestra procesada. Resultados para Erdosteina.....	61
Tabla 27. Estabilidad de la muestra procesada. Resultados para el Metabolito M1.....	61
Tabla 28. Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación. Resultados para Erdosteina.....	62
Tabla 29. Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación. Resultados para el Metabolito M1.....	62
Tabla 30. Límite de cuantificación. Resultados para Erdosteina.....	63
Tabla 31. Límite de cuantificación. Resultados para el Metabolito M1.....	63
Tabla 32. Tolerancia de Erdosteina en muestras de plasma lipídico.....	68
Tabla 33. Tolerancia de Erdosteina en muestras de plasma hemolizado.....	68
Tabla 34. Tolerancia del Metabolito M1 en muestras de plasma lipídico.....	69
Tabla 35. Tolerancia del Metabolito M1 en muestras de plasma hemolizado.....	59
Tabla 36. Concentraciones cuantificadas de Erdosteina en plasma después de la administración de una dosis oral única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.....	71
Tabla 37. Concentraciones cuantificadas del Metabolito M1 en plasma después de la administración de una dosis oral única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.....	71
Tabla 38. Concentraciones promedio de Erdosteina y Metabolito M1.....	72
Tabla 39. Parámetros farmacocinéticos de Erdosteina.....	73
Tabla 40. Parámetros farmacocinéticos del Metabolito M1.....	74

**LISTA DE FIGURAS****PÁGINA**

Figura 1. Estructura química de Erdosteina.....	7
Figura 2. Estructura química del Metabolito M1.....	8
Figura 3. Vía metabólica propuesta para Erdosteina.....	9
Figura 4. Espectro de masa típico.....	18
Figura 5. Componentes de un equipo de espectrometría de masas.....	19
Figura 6. Esquema general de una ionización por ESI.....	21
Figura 7. Diagrama de un espectrómetro de masa cuadrupolar.....	23
Figura 8. Diagrama de un espectrómetro MS/MS.....	25
Figura 9. Espectro de masas de Erdosteina.....	45
Figura 10. Espectro de masas del Metabolito M1.....	46
Figura 11. Espectro de masas de Tartrato de metoprolol.....	46
Figura 12. Cromatogramas típicos de Erdosteina y Metabolito M1.....	47
Figura 13. Linealidad. Curva de calibración de Erdosteina en un rango de 50.0 ng/mL a 3000.0 ng/mL.....	53
Figura 14. Linealidad. Curva de calibración del Metabolito M1 en un rango de 200.0 ng/mL a 15000.0 ng/mL.....	54
Figura 15. Cromatogramas representativos de la determinación del límite de detección..	64
Figura 16. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.....	65
Figura 17. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.....	65
Figura 18. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.....	65
Figura 19. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Cafeína.....	66
Figura 20. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Ácido Salicílico.....	66
Figura 21. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Acetaminofén.....	67
Figura 22. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Naproxeno Sódico.....	67
Figura 23. Cromatograma correspondiente a la inyección de una fase móvil.....	70

## ÍNDICE

---

Figura 24. Concentración plasmática promedio de Erdosteina vs tiempo ( $\pm$ ee) después de la administración de una dosis única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.....	72
Figura 25. Concentración plasmática promedio de Metabolito M1 vs tiempo ( $\pm$ ee) después de la administración de una dosis única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.....	73

# [ INTRODUCCIÓN ]

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), es un proceso que se caracteriza por una limitación permanente del flujo aéreo causada por inflamación, obstrucción y cambios estructurales de las vías aéreas así como del parénquima pulmonar en forma de enfisema <sup>(1)</sup>. La EPOC es un problema de salud pública debido a su alta prevalencia y condición progresiva, al deterioro significativo de la calidad de vida y gran impacto económico en las personas y los sistemas de salud <sup>(2)</sup>. Esta enfermedad ocupa el cuarto lugar en cuanto a mortalidad a nivel mundial, después de las enfermedades cardíacas, cáncer y accidentes vasculares encefálicos, mientras que en México se ubica en el quinto lugar <sup>(3)</sup>.

El cuadro clínico consiste en exacerbaciones seguidas de sofocaciones, tos, aumento en la producción de esputo y cambio de color del mismo <sup>(4)</sup>. El tratamiento básico implica el uso de antibióticos y esteroides, aunque frecuentemente se utilizan fármacos que disminuyan la frecuencia y duración de las exacerbaciones.

La Erdosteina, un derivado sintético de la metionina, ha demostrado ser efectiva y segura en el tratamiento de padecimientos de vías respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Fue desarrollado como agente mucolítico para facilitar la fluidificación del moco y el esputo, coadyuvando con ello a mejorar la ventilación pulmonar <sup>(5)</sup>. Uno de los metabolitos derivados de Erdosteina, el metabolito M1, ha mostrado gran importancia farmacológica debido a que posee actividad antibacterial, una función antioxidante sobre los radicales libres de oxígeno y una función protectora de la  $\alpha$ -1-antitripsina, contribuyendo así al tratamiento de las enfermedades respiratorias <sup>(6, 7, 8)</sup>. Además, la administración conjunta de Erdosteina con Amoxicilina en pacientes con exacerbación infecciosa aguda genera una mayor concentración de este antibiótico en el esputo, llevando a una rápida y pronunciada reducción de los síntomas <sup>(9)</sup>.

Las cualidades terapéuticas de Erdosteina han aumentado su uso en este tipo de padecimientos, por lo que es importante determinar la biodisponibilidad y bioequivalencia de los productos comerciales conteniendo este fármaco.

---

La normatividad propuesta en nuestro país para estudios de bioequivalencia hace referencia a la necesidad de validar los métodos analíticos que serán empleados en este tipo de estudios.

Lo anterior, aunado a la importancia de la Erdosteina y su metabolito M1 en la práctica clínica, constituyen la razón por la cual se llevó a cabo el presente trabajo.

[OBJETIVOS]

**OBJETIVOS**

Dado que el Centro A. F. de Estudios Tecnológicos (CAFET) no contaba con un método analítico validado que asegure la cuantificación de los niveles de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma, se llevó a cabo el presente proyecto cuyos objetivos fueron los siguientes:

- Validar, de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, un método analítico para la cuantificación de Erdosteina y su Metabolito M1 en plasma humano utilizando para ello cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector Masas/Masas.
- Aplicar el método analítico a la cuantificación de las muestras plasmáticas de un estudio piloto después de la administración oral de Erdosteina a una dosis única de 300 mg.

GENERALIDADES

## GENERALIDADES

### 3.1 Monografía de Erdosteina y Metabolito M1

#### 3.1.1 Propiedades fisicoquímicas

- **Erdosteina**

Fórmula molecular:  $C_8H_{11}NO_4S_2$

Peso molecular: 249.307 g/mol

Nombres químicos:

- [N-(carboximetiltioacetil)-homocisteina tiolactona]
- $\pm 1S$ -(2-[N-3-(2-oxotetrahydro tienil)] acetamido) ácido tioglicólico
- 2-[2-oxo-2-[(2-oxotiolan-3-il) amino] etil] ácido sulfanilacético
- [2-oxo-2[(tetrahydro-2-oxo-3- tienil) amino] etil] ácido tioacético

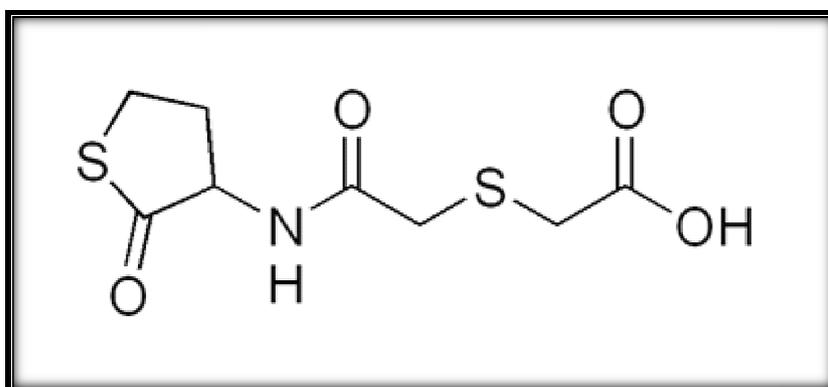


Figura 1. Estructura química de Erdosteina.

Descripción: Polvo blanco microcristalino

Solubilidad: Ligeramente soluble en etanol, metanol, acetona y agua

- **Metabolito M1**

Fórmula molecular:  $C_8H_{13}NO_5S_2$

Peso molecular: 267.326 g/mol

Nombre químico:

- N-tiodiglicolil-homocisteína

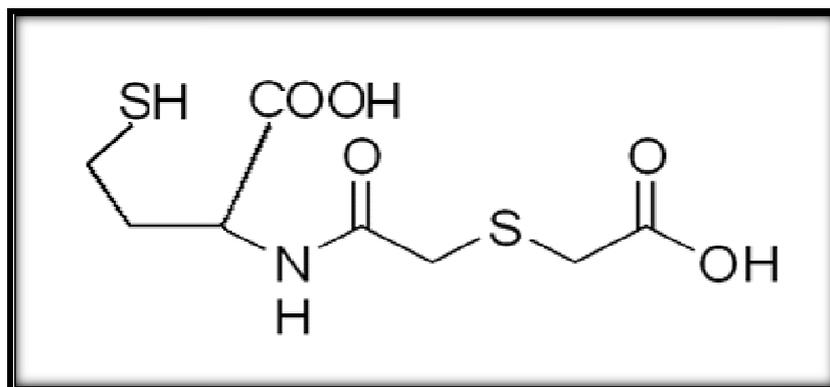


Figura 2. Estructura química del Metabolito M1.

Descripción: Polvo blanco microcristalino

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, metanol y etanol

### 3.1.2 Farmacocinética

Después de una administración oral de 900 mg de Erdosteina, esta se absorbe rápidamente alcanzando la concentración máxima en 1.2 horas con un valor de 1200 ng/mL <sup>(5)</sup>. Los estudios sobre distribución demuestran que la Erdosteina se encuentra presente en el líquido del lavado broncoalveolar y que la administración conjunta con alimentos disminuye ligeramente el tiempo en el que se alcanzan las concentraciones plasmáticas máximas, sin afectar la magnitud de las mismas ni el área bajo la curva <sup>(10)</sup>.

La Erdosteina contiene dos grupos tiólicos bloqueados que le permiten una excelente tolerabilidad gástrica <sup>(10)</sup>. Una vez que cruza la barrera gástrica sufre metabolismo del primer paso, desdoblándose en cuando menos tres metabolitos con grupos tiólicos libres. Los metabolitos resultantes del metabolismo de la Erdosteina son N-tioglicolil-homocisteína (Metabolito 1), N-acetilhomocisteína (Metabolito 2) y homocisteína (Metabolito 3) <sup>(11)</sup>, los cuales alcanzan su concentración máxima en 1.5, 3.6 y 3.7 horas respectivamente, con valores que oscilan entre 2700 y 7300 ng/mL aproximadamente. La concentración máxima reportada para el Metabolito M1 es de 3200 ng/mL <sup>(5)</sup>.

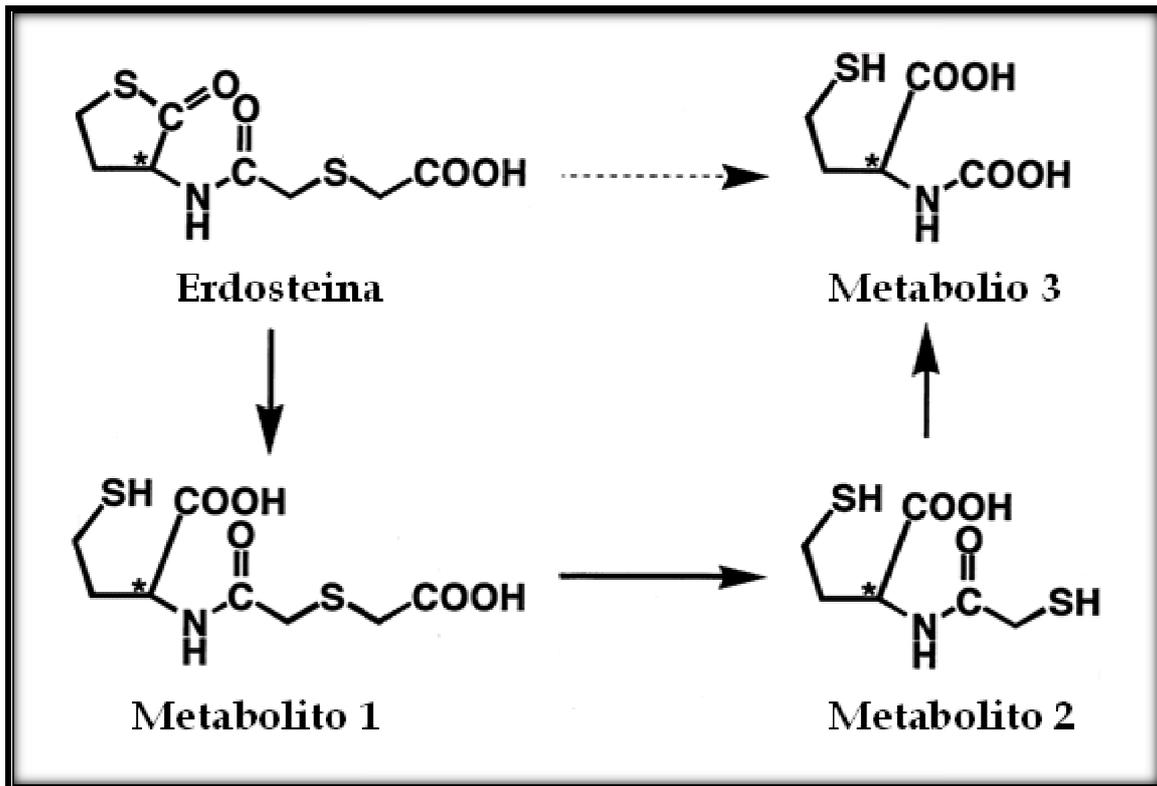


Figura 3. Vía metabólica propuesta para Erdosteina.

La vida media de eliminación de Erdosteina es de 1.4 horas en promedio, en tanto que la del Metabolito M1 es de 1.6 horas. La excreción de ambos es principalmente por vía renal, por lo que hay aumento de sulfatos inorgánicos urinarios durante la administración.<sup>(10)</sup>

No se han documentado cambios en la farmacocinética de Erdosteina o sus metabolitos debido a la edad, padecimientos bronquiales crónicos o insuficiencia renal<sup>(10)</sup>.

### 3.1.3 Farmacodinamia

Después del metabolismo, los dos grupos sulfhidrilo rompen los puentes disulfuro que mantienen unidas a las fibras de glicoproteínas constituyentes del moco produciendo la lisis del mismo, lo cual hace que las secreciones bronquiales se vuelvan más fluidas y se lleve a cabo en forma adecuada el transporte ciliar del moco, facilitando su expectoración<sup>(5)</sup>.

Asimismo, diversos estudios han probado que el Metabolito M1 ejerce una actividad antibacteriana al disminuir la adhesión de bacterias a las mucosas respiratorias <sup>(6)</sup>, junto con una actividad antioxidante y antiinflamatoria ya que interfiere en la generación de especies reactivas de oxígeno por neutrófilos y protege la función de la  $\alpha$ -1-antitripsina, sobre todo en el caso de fumadores activos <sup>(7, 8)</sup>.

### 3.1.4 Usos terapéuticos y dosis

La Erdosteina está indicada en el tratamiento de enfermedades de las vías aéreas que presenten secreciones espesas, difíciles de expectorar tales como bronquitis crónica estable y EPOC, en las infecciones agudas y crónicas (rinitis, sinusitis, faringitis, laringitis, traqueítis), al igual que para la prevención del deterioro de la función respiratoria consecuencia de la enfermedad bronquial y en la profilaxis de las complicaciones respiratorias posquirúrgicas <sup>(12)</sup>.

Las dosis recomendadas y la vía de administración se presentan en la *tabla 1*. Se sugiere una dosis máxima de 900 mg/día por no más de una semana.

*Tabla 1. Esquema de preparados, dosis y vías de administración.*

Presentación	Dosis	Vía de administración
Cápsulas 300 mg	1 cápsula dos veces al día	Oral
Suspensión 3.5 %	Adultos: 10mL dos veces al día Niños: 5-7.5mL dos veces al día	Oral
Tabletas 300 mg	1 tableta dos veces al día	Oral

### 3.1.5 Reacciones adversas

Generalmente, este fármaco ha mostrado ser bien tolerado presentándose esporádicos efectos adversos después de su uso. Los más comunes son los trastornos gastrointestinales, alteración del gusto, reacciones mucocutáneas y molestias generales tales como cefalea, vértigo, somnolencia y decaimiento, todos ellos de carácter leve a

moderado. Sin embargo, no se recomienda el uso en pacientes con úlcera gastroduodenal, insuficiencia hepática o insuficiencia renal severa, así como en embarazo y lactancia <sup>(4)</sup>.

### 3.2 Métodos analíticos para cuantificar Erdosteina

A pesar de que desde antes de 1990 se han realizado investigaciones sobre la Erdosteina y las diferentes propiedades de sus metabolitos, no se cuenta con muchos estudios dirigidos a su cuantificación. En la *tabla 2* se muestran los métodos analíticos reportados hasta el momento para su cuantificación.

*Tabla 2. Métodos para la cuantificación de Erdosteina.*

Técnica	Matriz biológica	Método de extracción	Condiciones cromatográficas	Referencia
HPLC/ UV	Plasma de rata	Extracción de fase sólida: Bond Elut	Columna: Ultron VX-ODS (150 x 4.6 mm) 5 $\mu$ m Fase móvil: Acetonitrilo en agua (50:50) con 0.1% TFA Flujo: 1.0 mL/min Vol. Inyección: 10 $\mu$ L $\lambda$ : 560 nm	11
HPLC/MS	Plasma humano	Liq-liq: precipitación con distintos solventes. SPE: C18	Columna: Merck RP-SElect B (125 x 3 mm) 5 $\mu$ m Fase móvil: ácido fórmico 0.1 % en agua y ácido fórmico 0.1% en agua:metanol (10:90) Flujo: 0.7 mL/min Vol. Inyección:50 $\mu$ L	13
LC/MS/MS	Plasma humano	Extracción en fase sólida: Oasis HLB 96 pozos	Columna: Capeel, Pak C18 (150 x 2 mm) 5 $\mu$ m Ionización: electrospray ESI <sup>+</sup> Fase móvil: acetato de amonio: acetonitrilo (80:20) 1mM Flujo: 0.3 mL/min Vol. Inyección: 20 $\mu$ L	14
HPLC	Plasma humano	Precipitación con distintos solventes	Columna: Supelcosil LC 18 DB (250 x 4.6 mm) 3 $\mu$ m Fase móvil: Gradiente de Buffers (fosfato de potasio 0.1M pH=2.1 y fosfato de potasio: acetonitrilo (1:1) 0.05M ph=2.1) Flujo: 1 mL/min Vol. Inyección: 20 $\mu$ L	15

### 3.3 Estudios de Erdosteina

Savu S. y colaboradores <sup>(13)</sup> llevaron a cabo un estudio farmacocinético en el que participaron 12 pacientes de ambos sexos (6 hombres y 6 mujeres) con bronquitis crónica a los que se les administró una dosis de 300 mg de Erdosteina cada 12 horas durante 7 días. Se tomaron muestras sanguíneas el primer y el último día de tratamiento a los tiempos 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 y 10.0 horas. La  $C_{m\acute{a}x}$  de Erdosteina fue de  $0.85 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$  y el  $T_{m\acute{a}x}$  fue de 1.0 h, mientras que la  $C_{m\acute{a}x}$  del Metabolito M1 fue de  $7.30 \pm 1.38 \mu\text{g/mL}$  con un  $T_{m\acute{a}x}$  de 3.0 h. No se reportó ningún efecto de género.

Por otro lado, Kim H. y colaboradores <sup>(14)</sup> llevaron un estudio de farmacocinética comparativa en el cual se administró una dosis oral triple de 300 mg de Erdosteina a 24 voluntarios sanos. Las muestras sanguíneas se tomaron a los tiempos 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 6.0 y 7.0 horas. El medicamento de referencia mostró una  $C_{m\acute{a}x}$  de  $2220.0 \pm 632.0 \text{ ng/mL}$ ,  $T_{m\acute{a}x}$  de  $1.15 \pm 0.47 \text{ h}$  y  $ABC_{0-\infty}$  de  $4334.0 \pm 1227.0 \text{ ng.h/mL}$ . Por su parte, la  $C_{m\acute{a}x}$  para el medicamento de prueba fue de  $2210.0 \pm 639.0 \text{ ng/mL}$ , el  $T_{m\acute{a}x}$  fue de  $1.23 \pm 0.52 \text{ h}$  y el  $ABC_{0-\infty}$  fue de  $4209.0 \pm 1148.0 \text{ ng.h/mL}$ . No se encontró diferencia significativa entre ambas formulaciones.

Yuan I.S. y colaboradores <sup>(16)</sup> llevaron a cabo un estudio de bioequivalencia en el que participaron 24 voluntarios sanos de sexo masculino a los que se les administró una dosis oral triple de 300 mg de Erdosteina. Los valores calculados para el medicamento de referencia fueron una  $C_{m\acute{a}x}$  de  $2.67 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$  y  $ABC_t$  de  $5.41 \pm 1.55 \mu\text{g.h/mL}$ . El medicamento de prueba mostró una  $C_{m\acute{a}x}$  de  $2.59 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$  y  $ABC_t$  de  $5.05 \pm 1.30 \mu\text{g.h/mL}$ . Se determinó que las formulaciones evaluadas eran bioequivalentes.

### 3.4 Normatividad mexicana para estudios de Intercambiabilidad

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSAI-1998 <sup>(17)</sup>, **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**, señala en el punto nueve los criterios y lineamientos para la validación de métodos en fluidos biológicos y para el análisis químico de las muestras que serán empleadas en una prueba de Bioequivalencia.

La norma menciona que es necesario establecer, previo a la validación, una estrategia que debe incluir los criterios de aceptación o rechazo para cada parámetro y las medidas correctivas en caso de fallas. En este caso, los criterios de aceptación para la validación se establecieron de acuerdo a lo señalado en la Norma Oficial Mexicana y en los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) creados en el Centro A. F. de Estudios Tecnológicos (CAFET).

Los parámetros que se incluyeron en la validación del método analítico fueron: rango, recuperación absoluta, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, especificidad, tolerancia y acarreamiento.

### **3.5 Validación de métodos bioanalíticos**

La validación de un método bioanalítico es un procedimiento encaminado a demostrar que el método usado para cuantificar un analito en una matriz biológica es seguro y reproducible y cumple con el propósito para el que fue diseñado: cuantificar el analito con un grado de exactitud y precisión apropiados <sup>(18)</sup>. En esta definición deben ser recalcados dos aspectos: el primero es que todas las decisiones y acciones tomadas durante la validación deben ser documentadas a fin de poder probar que las conclusiones finales son correctas; generalmente debe contarse con razones estadísticas para aprobar o rechazar el método, mismas que deben encontrarse por escrito. El segundo aspecto a considerar es que el alcance de la validación debe limitarse a los aspectos requeridos para asegurar la correcta aplicación del método, es decir, sólo deben ser validados los parámetros analíticos de importancia <sup>(19)</sup>.

La validación de métodos bioanalíticos utilizados para la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos juega un papel importante en la evaluación e interpretación de los datos generados durante los estudios de Biodisponibilidad, Bioequivalencia, Farmacocinética y Toxicocinética <sup>(20)</sup>.

#### **3.5.1 Características y parámetros de validación**

Los parámetros evaluados durante la validación así como la forma en que estos deben llevarse a cabo se describen a continuación:

**Rango**

El rango es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto por analizar, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal <sup>(17)</sup>.

**Recuperación absoluta**

Se entiende por recuperación absoluta a la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Para evaluar la recuperación absoluta se debe analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas (baja, media y alta) del o los compuestos por analizar en la matriz biológica dentro del rango y comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta razón no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango <sup>(17)</sup>.

**Linealidad**

La 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 a cuantificar en la muestra. La linealidad del método analítico se evalúa mediante una curva de calibración, la cual se adapta a un modelo matemático que represente la relación entre la respuesta de las muestras y la concentración conocida del analito. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango <sup>(17)</sup>.

El número de muestras usadas para construir la curva de calibración está en función del rango establecido y de la naturaleza de la relación concentración-respuesta. En la mayoría de los casos, la curva la constituyen de cinco a ocho puntos, sin incluir las muestras blancas las cuales son muestras de la matriz biológica que no contienen el analito de interés <sup>(21)</sup>.

**Precisión**

La 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, y se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. La

---

repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, mientras que la reproducibilidad se refiere a la precisión bajo diferentes variaciones comunes como son diferentes días, analistas y equipos <sup>(17)</sup>.

Para la determinación de estos parámetros se debe analizar una serie de muestras de concentración conocida del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, denominadas puntos control. Estas concentraciones deben ser diferentes de las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. Generalmente, los puntos control constan de tres concentraciones distintas cuyos valores son: para el punto control bajo, aproximadamente tres veces el valor del límite de cuantificación; para el punto control medio, la media geométrica de la curva de calibración; para el punto control alto, una concentración cercana a la concentración más alta de la curva <sup>(21)</sup>.

Para evaluar la repetibilidad, la normatividad mexicana <sup>(17)</sup> indica que se debe analizar en un mismo día los puntos control por quintuplicado. Se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas, considerando al método preciso si el promedio del coeficiente de variación en cada uno de los días de análisis no excede el  $\pm 15.0\%$ .

Para la determinación de la reproducibilidad se debe calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta obtenida al analizar los puntos control por quintuplicado durante tres días. El método se considera preciso si el promedio del coeficiente de variación de los tres días de análisis no excede el  $\pm 15.0\%$ .

### **Exactitud**

La exactitud se define como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro se evalúa al comprobar que el valor promedio de las concentraciones determinadas en los datos de repetibilidad y reproducibilidad está dentro del  $\pm 15.0\%$  del valor nominal de concentración <sup>(17)</sup>.

### **Estabilidad**

La estabilidad es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características bajo condiciones específicas e intervalos de tiempo establecidos, desde el momento del muestreo hasta su análisis. La evaluación de la estabilidad nos permite

determinar 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 <sup>(17)</sup>.

Este parámetro depende de las condiciones de almacenamiento, de las características químicas del compuesto y de la matriz biológica, así como de las características físicas del contenedor <sup>(21)</sup>.

Para al evaluar la estabilidad se deben analizar muestras en la matriz biológica al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos lo siguiente:

- **Condiciones de almacenamiento:** Evaluar las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo al menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis <sup>(17)</sup>.
- **Estabilidad a corto plazo (Estabilidad en la mesa de trabajo):** Evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica al descongelar y mantener a temperatura ambiente muestras de tres concentraciones conocidas durante el tiempo máximo requerido para su preparación y su posterior análisis <sup>(17)</sup>.
- **Estabilidad de la muestra procesada (Estabilidad en el automuestreador):** Evaluar la estabilidad de las muestras después de ser procesadas y hasta el momento de su inyección, en las condiciones de temperatura y humedad a las cuales se someten. Se deberá demostrar la estabilidad del compuesto de interés y del estándar interno durante el máximo tiempo que dure el análisis <sup>(17)</sup>.
- **Ciclos de congelación-descongelación:** Evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar completamente a temperatura ambiente muestras de tres concentraciones conocidas del o los compuestos en la matriz biológica. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación <sup>(17)</sup>.

Para que el compuesto se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados deben cumplir con los criterios de exactitud y precisión ya mencionados.

### **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación es la concentración más baja del compuesto de interés que puede ser cuantificada cumpliendo con los criterios de precisión y exactitud establecidos en el método. El parámetro se determina al evaluar, al menos por quintuplicado, la concentración más baja del rango de trabajo y determinando el promedio de las concentraciones cuantificadas y el coeficiente de variación <sup>(23)</sup>. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20.0\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que  $20.0\%$  <sup>(17)</sup>.

### **Límite de Detección**

El límite de detección corresponde a la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas. Para determinar el límite de detección deben realizarse diluciones con plasma a partir del límite de cuantificación a fin de obtener la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés. Esta concentración no debe cumplir con los criterios de precisión y exactitud <sup>(17)</sup>.

### **Selectividad**

La selectividad es la habilidad de un método bioanalítico de cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra como es el caso de metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante <sup>(17)</sup>.

Para evaluar la selectividad del método se requiere analizar muestras blanco de la matriz biológica correspondiente proveniente de por lo menos seis fuentes distintas. Se considera que el método es selectivo para el compuesto de interés si no existen interferencias en la cuantificación del mismo <sup>(17)</sup>.

### Tolerancia

La tolerancia se define como la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones en sus parámetros y condiciones de trabajo como lo son cambios de pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación, etc. La tolerancia es una medida de la confiabilidad del método durante el uso normal <sup>(17)</sup>.

Las modificaciones que se consideren, deben ser las que cumplan con los criterios de exactitud y precisión antes mencionados.

### 3.6 Fundamentos de Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, basada en su relación masa/carga ( $m/z$ ), en diferentes matrices (líquidas, sólidas), después de su ionización <sup>(22)</sup>. Una vez que la muestra que contiene a la molécula de interés ha sido introducida en el espectrómetro de masas, ya sea directamente o después de algún proceso de separación, la muestra es ionizada generando iones cargados positiva y/o negativamente clasificados según su relación masa/carga ( $m/z$ ) <sup>(23)</sup>. Estos resultados se presentan en un espectro de masas, el cual es una representación gráfica de los iones separados por su valor de  $m/z$  y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra <sup>(24)</sup>.

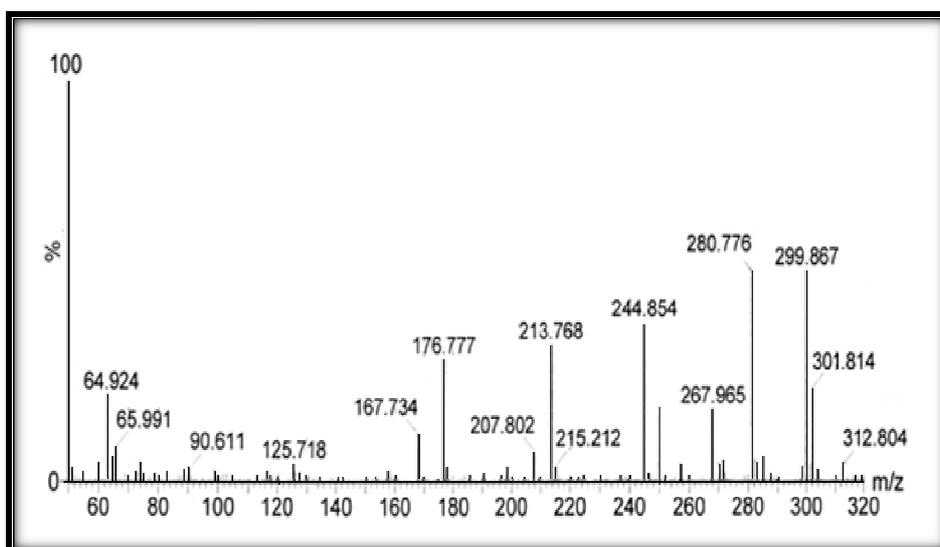


Figura 4. Espectro de masa típico.

En la última década, la espectrometría de masas ha ganado una prominente posición entre los métodos analíticos debido a su versatilidad, incomparable sensibilidad, y selectividad y a que, en combinación con técnicas de separación como la cromatografía, puede ser utilizada para identificar y monitorear moléculas en fluidos biológicos <sup>(23)</sup>.

### 3.6.1 Instrumentación en Espectroscopia de Masas

Un equipo de espectrometría de masas consta de cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos <sup>(22)</sup>.

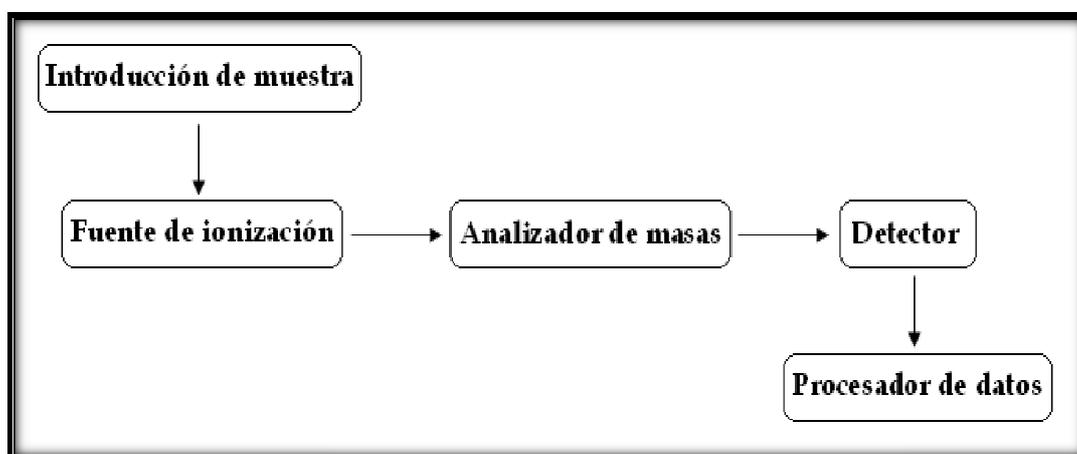


Figura 5. Componentes de un equipo de espectrometría de masas.

#### 3.6.1.1 Introducción de la muestra

La introducción de la muestra se lleva a cabo mediante un sistema de entrada, el cual permite la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. Para ello, la muestra debe estar presente en fase gaseosa (vaporización) <sup>(24)</sup>.

Se pueden encontrar diferentes tipos de sistemas de entrada como son: 1) Sistemas indirectos de entrada, 2) Entrada por sonda indirecta y 3) Sistema de entrada cromatográficos y de electroforesis capilar <sup>(25)</sup>.

#### 3.6.1.2 Métodos de ionización

La formación de iones del analito es el punto de partida de un análisis por espectrometría de masas. La función de la fuente de ionización en un equipo de MS es aplicar energía a

la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente, ya que para medir las moléculas por MS éstas deben estar “cargadas eléctricamente”<sup>(22)</sup>.

El aspecto de los espectros de masas para distintas especies moleculares depende en gran medida del método utilizado para la formación de iones. La fuente de ionización debe elegirse dependiendo de las propiedades de la molécula a analizar, tales como peso molecular, polaridad, volatilidad, etcétera<sup>(25)</sup>. Los métodos de ionización más usados son:

- Ionización química (CI)
- Ionización por impacto electrónico (EI)
- Ionización por electrospray (ESI)
- Ionización-desorción asistida por laser (MALDI)

Las fuentes de ionización más utilizadas en los ensayos bioquímicos son MALDI y ESI. Ya que este último fue utilizado en el método validado en el presente trabajo, es el que a continuación se describe.

#### **3.6.1.2.1 Ionización por Electrospray**

La ionización por Electrospray (ESI) se utiliza para el análisis de biomoléculas, proteínas, oligonucleótidos, péptidos, carbohidratos, ácidos grasos, polímeros sintéticos y fármacos<sup>(26)</sup>.

Este tipo de ionización se realiza bajo presión y temperatura atmosférica. Una solución acuosa ácida o básica (dependiendo de la muestra) diluida del analito es bombeada a través de un capilar que está situado dentro de la fuente de ionización del espectrómetro y al cual se aplica un voltaje de 3-4 kV. El líquido comienza a salir de la aguja del capilar, incrementa su carga y asume una forma cónica. Finalmente llega a un punto crítico donde no puede soportar más carga eléctrica y la solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta<sup>(27)</sup>. Este proceso es asistido por un gas nebulizante (generalmente nitrógeno) que es introducido co-axialmente alrededor del exterior del capilar, el cual ayuda a dirigir al spray que emerge del capilar hacia el espectrómetro de masas<sup>(28)</sup>.

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 solvente se evaporan en su superficie, y la distancia entre las moléculas cargadas disminuye dramáticamente <sup>(27)</sup>.

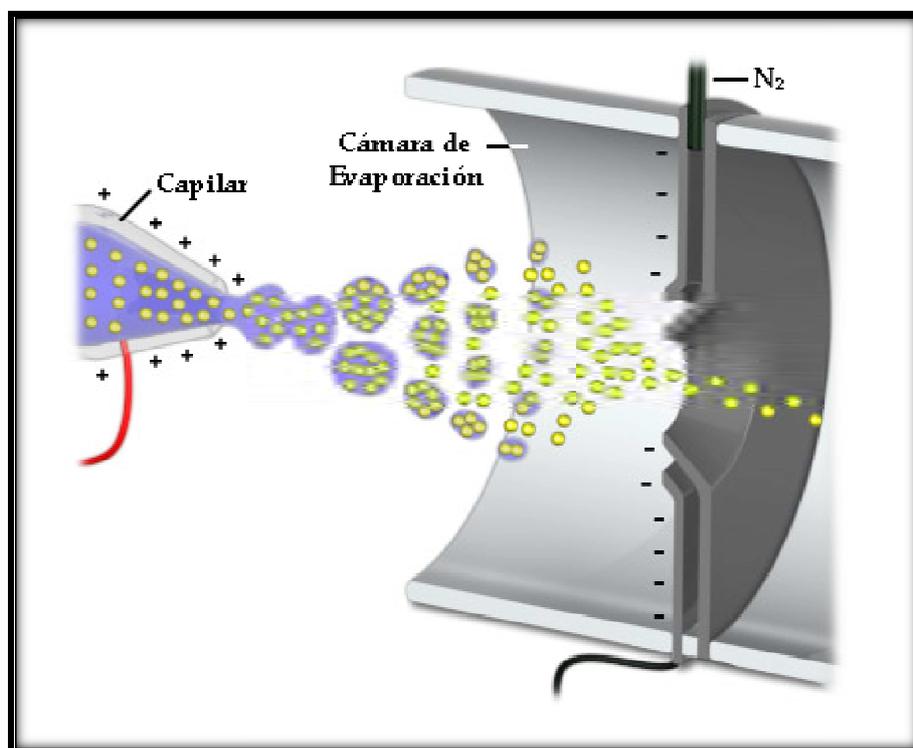


Figura 6. Esquema general de una ionización por ESI

El proceso termina con moléculas cargadas que pueden todavía llevar moléculas de solvente. 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 <sup>(27)</sup>.

Los disolventes usados en ESI se seleccionan basándose en la solubilidad del compuesto de interés, la volatilidad de los disolventes y la capacidad de este para donar un protón. Los disolventes próticos más usados son el metanol, metanol:agua (50:50), acetonitrilo:agua (50:50), mientras que algunos cosolventes apróticos, como ácido fórmico, ácido acético y ácido trifluoroacético, se emplean para mejorar la solubilidad de algunos compuestos <sup>(29)</sup>.

### 3.6.1.3 Analizadores de masas

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, que tiene como función separarlos y ordenarlos de acuerdo a su  $m/z$ . Para la separación de iones con diferente relación  $m/z$  se dispone de varios dispositivos. Lo ideal es que el analizador fuera capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa, además de permitir el paso del número suficiente para producir corrientes iónicas fáciles de medir <sup>(25)</sup>. Existen diferentes tipos de analizadores de masas, entre los que se encuentran:

- **Analizadores de sector magnético:** En este tipo de analizador los iones que llegan de la fuente de iones son acelerados a una gran velocidad, pasando a través de un sector magnético en el cual se aplica un campo magnético en una dirección perpendicular al movimiento de los iones. Su resolución se ve limitada ya que no todos los iones que llegan de la fuente de iones tienen la misma energía ni la misma velocidad <sup>(27)</sup>.
- **Analizadores de masas de tiempo de vuelo:** En estos aparatos se producen los iones positivos periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los iones producidos de esta forma son acelerados en un tubo analizador libre de campo mediante un campo eléctrico. La separación de los iones en función de la masa se produce durante su recorrido hacia el detector, situado al final del tubo <sup>(25)</sup>.
- **Analizadores de trampa de iones:** Es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden formarse y quedar confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Los espectrómetros de trampa de iones son más robustos, compactos y más económicos que los anteriores <sup>(25)</sup>.
- **Espectrómetros de masas de cuadrupolo:** Este tipo de analizador está compuesto de cuatro barras organizadas paralelamente a las que se les aplica una combinación de campos magnéticos y electrostáticos cuidadosamente seleccionados. Los iones se extraen de la fuente de iones y son acelerados dentro del espacio central formado por el cuadrupolo a lo largo del eje longitudinal hacia el detector. Sólo iones de un valor  $m/z$  específico evitarán colisionar con las barras y pasarán el filtro cuadrupolo hasta alcanzar el detector <sup>(27)</sup>.

El valor de  $m/z$  que es transmitido por el cuadrupolo está determinado por el voltaje de radiofrecuencia (RF) y por el potencial de corriente directa (DC) aplicados a las barras. 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, la RF de las barras superiores e inferiores está en un potencial positivo y las barras izquierda y derecha en un potencial negativo, de modo que los iones positivos se dirigen en el plano horizontal. Durante la segunda mitad del ciclo la polaridad de las barras se invierte cambiando el campo eléctrico, por lo que los iones se dirigen en el plano vertical. El campo del cuadrupolo continúa alternándose a medida que los iones viajan a través del analizador de masas, generando una onda tridimensional debido al movimiento de los iones <sup>(28, 29)</sup>.

Al seleccionar la RF adecuada, el cuadrupolo actúa como un filtro que rechaza los iones con valores  $m/z$  bajos ya que estos, al poseer una mayor velocidad de aceleración, presentan una onda de mayor amplitud que les ocasiona choques con los electrodos y, en consecuencia, no pueden alcanzar el detector. Por su parte, el voltaje de DC aplicado a través de las barras del analizador se combina con el potencial RF y actúa como un filtro para los iones con  $m/z$  altos <sup>(28, 29)</sup>.

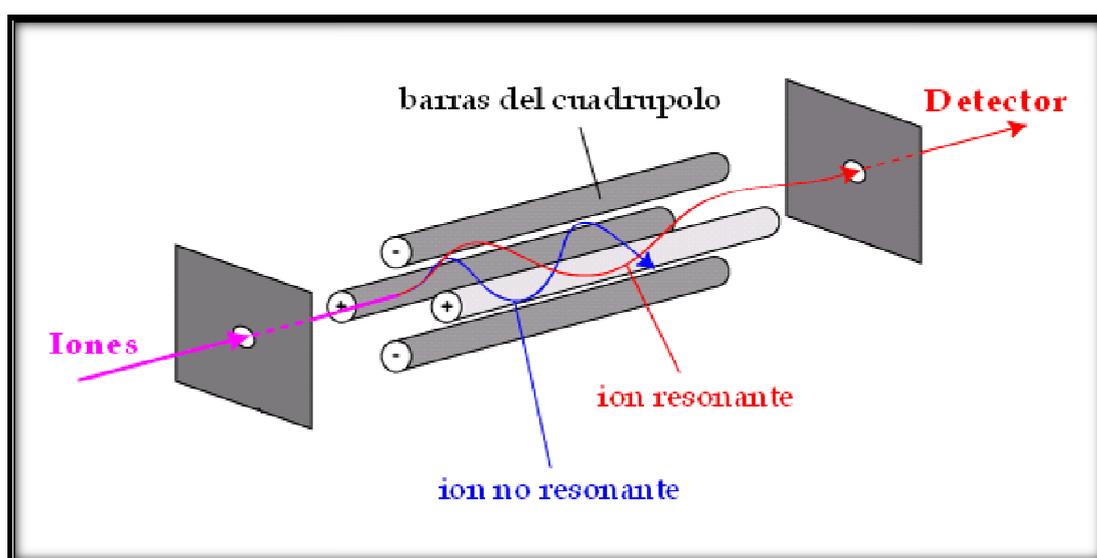


Figura 7. Diagrama de un espectrómetro de masa cuadrupolar.

#### **3.6.1.4 Detectores**

Los iones procedentes del analizador de masas llegan al detector, el cual generalmente esta constituido por un cátodo emisor que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas emite electrones. Estos electrones son acelerados hacia un dínodo que emite varios electrones más al recibir el impacto de cada electrón. Este proceso se repite varias veces hasta obtenerse una cascada de electrones que llega al colector lográndose una corriente fuertemente amplificada, por un procedimiento muy similar al que se utiliza en los tubos fotomultiplicadores <sup>(29)</sup>.

Finalmente, la señal amplificada es enviada al procesador de datos en donde esta información se registra en forma de espectro de masas.

#### **3.6.2 Espectrometría de Masas/Masas**

La espectrometría de masas MS/MS se caracteriza por el acoplamiento de dos analizadores de masas separados por una cámara de colisión, lo que permite el control de la formación tanto de iones moleculares como de fragmentos iónicos. Una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga y, posteriormente, pasa al primer analizador de masas (MS<sub>1</sub>) en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su m/z. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte (por ejemplo argón) por medio de un proceso denominado activación colisional o disociación inducida por colisión. Los fragmentos resultantes pasan por el segundo analizador de masas (MS<sub>2</sub>), en donde se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS<sub>1</sub>. Los resultados se registran en forma de espectro de masas <sup>(24, 30)</sup>.

Con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación <sup>(22)</sup>.

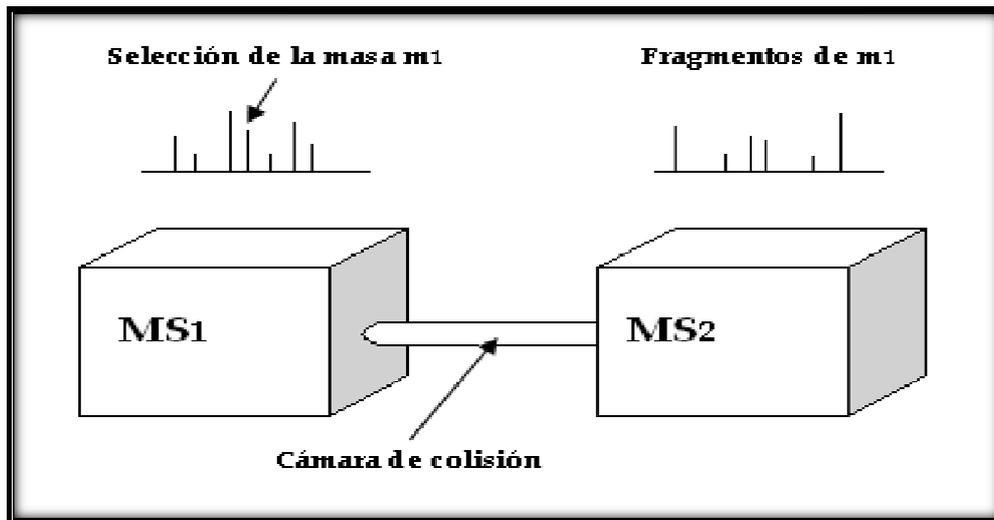


Figura 8. Diagrama de un espectrómetro MS/MS.

PARTE ]  
[ EXPERIMENTAL

---

---

## PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reactivos, material y equipo

- **Reactivos y especímenes biológicos**

Agua purificada

Metanol grado LC/MS marca Fluka

Metanol grado cromatográfico marca Fermont

Acetonitrilo grado LC/MS marca Fermont

Metilamina grado RA marca Fluka

Ditiotrietol para electroforesis marca Sigma

Ácido trifluoroacético 99% para espectroscopia UV marca Fluka

Plasma humano congelado bajo condiciones normales, lipídicas y hemolizadas, con etiqueta de sangre segura y resultado negativo a las pruebas de HIV, VHC, AgSHB, Sífilis y Chagas.

- **Sustancias de referencia**

Erdosteina (Lote AES-08-030 pureza 100.5%)

Metabolito M1 (Lote S-1283-0150A1 pureza 96.8%)

Tartrato de metoprolol (Lote: 58A-6)

Cafeína anhidra USP (Lote: J1D241)

Ácido Salicílico USP (Lote: KOF112)

Acetaminofén USP (Clave: ER613)

Naproxeno Sódico USP (Lote: I-1)

- **Materiales**

Tubos de plástico de 1.5 y 2.0 mL

Pipetas automáticas

Pipeta de descarga múltiple

Pipetas Pasteur

Puntas para micropipetas

Puntas para pipeta de descarga múltiple

Bulbos para pipetas Pasteur

Espátulas

Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 100 y 1000 mL

Microviales

Tapas y septos para microviales

Gradillas

Criocajas

- **Equipos**

Balanza analítica Mettler-Toledo

Microbalanza Mettler-Toledo

Sistema desionizador de agua Milli-Q System-Waters

Ultracongelador Harris

Horno con vacío VacuCell

Ultra microcentrífuga Hettich

Agitador Vortex-T Genie 2

Cronómetro digital Sper Scientific

Ultrasonido Branson 8510

Espectrómetro de masas Waters LC/MS/MS Quattro Premiere™ XE de cuadrupolo en tandem

Bomba binaria Waters modelo 1525 $\mu$

Automuestrador Waters modelo 29090

Computadora IBM, Software MassLynx V. 4. 1

## 4.2 Preparación de soluciones de trabajo

### ***Solución de Extracción***

Transferir 80 mL de acetonitrilo a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar una alícuota de 0.5 mL de ácido trifluoroacético concentrado y 0.2 mL de metilamina, mezclar y llevar a volumen con agua purificada.

**Fase móvil A**

En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar 500 mL de agua purificada, adicionar 0.5 mL de ácido trifluoroacético concentrado y 0.18 mL de metilamina. Aforar con agua purificada. Verter dicha dilución en el frasco correspondiente a la FM-A y sonicar durante 15 min.

**Fase móvil B**

La fase móvil B es metanol grado cromatográfico o LC/MS, verterlo al frasco correspondiente a la leyenda de FM-B. Sonicar durante 15 min.

**Solución de Inyección metanol-fase móvil A (10:90)**

Transferir 5 mL de metanol LC/MS y mezclar con 45 mL de FM-A. Reservar en un contenedor tapado hasta su uso.

**Solución 1 de lavado del inyector (lavado débil)**

Mezclar 100 partes de metanol LC/MS con 100 partes de agua purificada. Degasificar por 10 min.

**Solución 2 de lavado del inyector (lavado fuerte)**

Mezclar 100 partes de metanol LC/MS, 100 partes de acetonitrilo y 100 partes de agua purificada.

**Solución de Ditiotrietol (DTT)**

Depositar en un matraz volumétrico de 25 mL, 0.771 g de ditiotrietol, disolver y llevar a volumen con agua purificada. Concentración final 200 mM.

**4.3 Preparación de las soluciones estándar, adecuación del sistema, curva de calibración y puntos control de Erdosteina y Metabolito M1****Solución Stock de Erdosteina (SS-E)**

Pesar el equivalente a 5mg de Erdosteina previamente secada a 80°C durante 3 horas con vacío. Transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y disolver con 0.5 mL de metanol

LC/MS. Una vez disuelto, llevar a volumen con agua purificada. Sonicar por 2 minutos. Concentración final de Erdosteina de 0.5 mg/mL.

***Solución estándar de Erdosteina (SE-E)***

En un matraz volumétrico de 10 mL tomar una alícuota de 1 mL de la solución SS-E y llevarlo a volumen con agua purificada. Concentración final de Erdosteina de 50 µg/mL.

***Solución stock de Metabolito M1 (SS-M1)***

Transferir el equivalente a 5 mg de Metabolito M1 a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar a volumen con agua purificada. Concentración final para Metabolito M1 de 1 mg/mL.

***Solución estándar de Metabolito M1 (SE-M1)***

En un matraz volumétrico de 5 mL tomar una alícuota de 0.5 mL de la solución SS-M1 y llevarlo a volumen con agua purificada. Concentración final de Metabolito M1 de 100 µg/mL.

***Solución concentrada de Metoprolol (SCM)***

Transferir 10 mg de Tartrato de metoprolol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL. Disolver con 200 µL de metanol LC/MS y llevarlos a volumen. La concentración final de Tartrato de metoprolol es de 1 mg/mL.

***Soluciones diluidas de Metoprolol (SDM)***

Realizar dos diluciones consecutivas en matraces aforados comenzando con una alícuota de 100 µL de la solución SCM para llevar a un volumen de 10 mL con agua purificada. Esta solución presenta una concentración de 10 µg/mL. De la dilución anterior tomar 1 mL y llevar a 100 mL con agua purificada, obteniendo una concentración de 100 ng/mL.

***Solución de adecuación del sistema (SA)***

Transferir una alícuota de 160 µL de la solución SE-E y una alícuota de 50 µL de SS-M1 a un tubo de plástico conteniendo previamente 790 µL de agua (dilución 1). De la dilución anterior, tomar 100 µL y adicionar 1900 µL de FM-A (dilución 2). Tomar 200 µL de la dilución 2 y realizar del paso 3 al 7 del método de procesamiento de la muestra. Tomar 50 µL y diluir con 100 µL de la solución de inyección e inyectar al sistema.

**Curva de calibración y Puntos control**

A partir de las soluciones de Erdosteina y Metabolito M1 preparadas como se indica en párrafos anteriores, se realizaron los puntos de la curva de calibración siendo estos de 50, 100, 150, 250, 350, 500, 1000, 1500 y 3000 ng/mL para Erdosteina y de 200, 400, 800, 1600, 3000, 6000, 7500, 10000 y 15000 ng/mL para el Metabolito M1. También se prepararon los puntos control de 125 (bajo), 400 (medio) y 2500 (alto) ng/mL para Erdosteina y de 600 (bajo), 2500 (medio) y 12000 (alto) ng/mL para Metabolito M1.

Las *tablas 3 y 4* presentan la metodología seguida para la preparación los puntos de la curva de calibración así como los puntos control.

*Tabla 3. Concentraciones parciales de la curva de calibración y los puntos control*

<b>Curva de calibración</b>						
<b>[Erdosteina] inicial (ng/mL)</b>	<b>Alícuota de Erdosteina (<math>\mu</math>L)</b>	<b>[Metabolito M1] inicial (ng/mL)</b>	<b>Alícuota de Metabolito M1 (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volumen de H<sub>2</sub>O (<math>\mu</math>L)</b>	<b>[Erdosteina] parcial (ng/mL)</b>	<b>[Metabolito M1] parcial (ng/mL)</b>
50000	20	100000	40	940	1000	4000
50000	40	100000	80	880	2000	8000
50000	60	100000	160	780	3000	16000
50000	100	100000	320	580	5000	32000
50000	140	1000000	60	800	7000	60000
500000	20	1000000	120	860	10000	120000
500000	40	1000000	150	810	20000	150000
500000	60	1000000	200	740	30000	200000
500000	120	1000000	300	580	60000	300000
<b>Puntos control Bajo, Medio y Alto</b>						
50000	50	100000	120	830	2500	12000
50000	160	1000000	50	790	8000	50000
500000	100	1000000	240	660	50000	240000

Tabla 4. Concentraciones finales de la curva de calibración y puntos control.

Curva de calibración					
[Erdosteina] parcial (ng/mL)	[Metabolito M1] parcial (ng/mL)	Alícuota Erdosteina/ Metabolito M1 (µL)	Volumen de plasma (µL)	[Erdosteina] final (ng/mL)	[Metabolito M1] final (ng/mL)
1000	4000	100	1900	50	200
2000	8000	100	1900	100	400
3000	16000	100	1900	150	800
5000	32000	100	1900	250	1600
7000	60000	100	1900	350	3000
10000	120000	100	1900	500	6000
20000	150000	100	1900	1000	7500
30000	200000	100	1900	1500	10000
60000	300000	100	1900	3000	15000
Puntos control Bajo, Medio y Alto					
2500	12000	100	1900	125	600
8000	50000	100	1900	400	2500
50000	240000	100	1900	2500	12000

#### 4.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano

Debido a que el método analítico había sido desarrollado previamente, a continuación se resumen los puntos principales.

##### 4.4.1 Espectros de Masas

Previamente, se obtuvieron los espectros de masas de Erdosteina, Metabolito M1 y Tartrato de metoprolol obteniéndose patrones de fragmentación similares a los reportados en la literatura consultada <sup>(31, 32, 33)</sup>. Se utilizó una fuente de ionización por electrospray en modo positivo (ES<sup>+</sup>) y un tipo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM). Estas condiciones del detector permitieron una mayor intensidad de la respuesta en espectrometría de masas.

#### 4.4.2 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Columna Luna C<sub>18</sub> 2.0 x 20 mm, 3 µm.
- Guarda columna Security guard C<sub>18</sub> de 4.0 x 2.0 mm
- Temperatura del inyector: 8°C
- Temperatura de la columna: 30 ± 2°C
- Volumen de inyección: 5.0 µL
- Gradiente de elución:

Tabla 5. Gradiente de elución durante la inyección.

Tiempo	% FM-A	% FM-B	Flujo (mL/min)
0.00	5	95	0.3
2.00	60	40	
2.50	60	40	
3.50	100	0	
4.50	100	0	
5.50	5	95	
6.00	5	95	

- Respuesta medida: área relativa (analito/estándar interno)

#### 4.4.3 Método de extracción de fluido biológico

Las condiciones finales para la extracción de Erdosteina y el Metabolito M1 en plasma humano fueron las siguientes:

1. Tomar 200 µL de muestra de plasma previamente agitada.
2. Adicionar 50 µL de DTT y agitar por 1 hora en agitador horizontal.
3. Adicionar 50 µL de solución de estándar interno (Tartrato de metoprolol).
4. Agitar en vortex durante 10 segundos.
5. Adicionar 250 µL de la solución de extracción.
6. Agitar en vortex durante 2 minutos.
7. Centrifugar durante 10 minutos a 18000 rpm y 15°C.
8. Transferir 50 µL del sobrenadante a un inserto y adicionar 100 µL de solución de inyección, agitar durante 5 segundos e inyectar 5 µL al sistema.

#### **4.5 Validación del método analítico para la cuantificación de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano**

Para llevar a cabo la validación del método analítico se diseñó una corrida analítica de acuerdo a lo establecido en el PNO correspondiente. Dicha corrida analítica constó de cinco muestras de adecuación del sistema, un blanco de reactivos, un blanco de plasma, un blanco de plasma con estándar interno y una curva de calibración, los cuales eran procesados siguiendo lo señalado en el punto 4.4.3. A estas muestras les seguían las correspondientes a los experimentos realizados cada día, formando así la corrida analítica completa.

Para poder considerar válida la corrida analítica, el criterio de aceptación propuesto menciona que las muestras blanco no deben presentar señales que interfieran con los picos cromatográficos de los compuestos de interés y que la respuesta de las 5 inyecciones sucesivas de la solución de adecuación del sistema (SA) debe presentar un coeficiente de variación (% C.V.) menor o igual a 10.0%.

##### **4.5.1 Rango**

Se consideró como el rango de este método analítico a aquel intervalo de concentraciones a lo largo del cual se demostró linealidad, exactitud y precisión.

Con base en los resultados obtenidos en experimentos previos de linealidad, exactitud y precisión, se determinó que el rango de este método analítico es de 50 a 3000 ng/mL para la Erdosteina y de 200 a 15000 ng/mL para el Metabolito M1.

##### **4.5.2 Recuperación absoluta**

Para determinar si el método analítico permitía cuantificar los compuestos deseados en las muestras de plasma de manera eficiente, se evaluó el porcentaje de recuperación para cada uno de los analitos de interés (Erdosteina y Metabolito M1), así como del estándar interno (Tartrato de metoprolol).

De igual modo, se evaluó el efecto matriz debido a que algunos componentes endógenos de la matriz biológica pueden eluir junto con los compuestos de interés, causando una alteración en la ionización de la muestra (realce o supresión). Este efecto se evaluó al

comparar la respuesta del analito de interés en solución con la respuesta del analito adicionado a un blanco de plasma.

#### **4.5.2.1 Recuperación de blancos de plasma y muestras adicionadas**

Se prepararon por quintuplicado muestras de Erdosteina y de Metabolito M1 a las concentraciones de los puntos control (125, 400 y 2500 ng/mL y 600, 2500 y 12000 ng/mL respectivamente) utilizando blancos de plasma.

Adicionalmente, se prepararon soluciones acuosas con Erdosteina y Metabolito M1 a las mismas concentraciones. Estas soluciones se realizaron con el diluyente empleado en los blancos de plasma procesados, para obtener las mismas concentraciones de las muestras adicionadas después de procesar. Las muestras se prepararon por quintuplicado.

Se calculó el promedio de las respuestas, la desviación estándar y el coeficiente de variación para Erdosteina y Metabolito, así como el porcentaje de recuperación absoluta para los analitos en plasma y la respuesta promedio correspondiente en los blancos adicionados. Con estos resultados, se determinó el porcentaje de recuperación para todas las concentraciones probadas, así como el promedio global. Lo anterior se describe en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación absoluta} = \left( \frac{\text{Respuesta promedio en plasma}}{\text{Respuesta promedio en solución}} \right) \times 100$$

Para el caso del estándar interno (Tartrato de metoprolol), se obtuvo el promedio y el coeficiente de variación (% C.V.) del área de la respuesta de los blancos adicionados y en las muestras plasmáticas y se calculó el porcentaje de recuperación absoluta al comparar el área promedio en plasma con la respuesta promedio correspondiente en los blancos adicionados.

Como criterios de aceptación se estableció que el porcentaje de recuperación obtenido por nivel para Erdosteina, Metabolito M1 y Tartrato de metoprolol no debe variar en  $\pm 15.0\%$  del porcentaje de recuperación promedio de los tres niveles evaluados. Además,

los coeficientes de variación, tanto de las respuestas para cada nivel de concentración como el de la recuperación del estándar interno, deberán ser menores al 15.0%.

#### **4.5.3 Linealidad**

La linealidad del método analítico se evaluó a fin de seleccionar un modelo que describiera la relación matemática entre concentración y respuesta. Para ello, se prepararon tres curvas de calibración de manera independiente (una por día) en plasma a concentraciones de 50, 100, 150, 250, 350, 500, 1000, 1500 y 3000 ng/mL para Erdosteina y de 200, 400, 800, 1600, 3000, 6000, 7500, 10000 y 15000 ng/mL para el Metabolito M1.

Se determinó que el modelo matemático log/log era el que se ajustaba mejor a los datos obtenidos permitiendo describir la relación entre la concentración y la respuesta. Se calculó la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Las concentraciones de Erdosteina y Metabolito M1 para cada punto se calcularon al extrapolar las respuestas experimentales en la recta generada, obteniéndose el porcentaje de desviación absoluta mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desviación absoluta} = \left( \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración calculada}}{\text{Concentración nominal}} \right) \times 100$$

El criterio de aceptación para la linealidad del método señala que el coeficiente de determinación para las curvas debe ser mayor o igual a 0.98 y que, tanto el porcentaje de desviación absoluta como el coeficiente de variación obtenidos en cada nivel de concentración, deben ser menor o igual a 15.0%, a excepción del punto C1 que debe ser menor o igual al 20.0%.

#### **4.5.4 Precisión**

La evaluación de la precisión se llevó a cabo mediante la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad.

##### **4.5.4.1 Repetibilidad**

Para evaluar la repetibilidad se prepararon muestras adicionadas en plasma a concentraciones de 125, 400 y 2500 ng/mL (nivel bajo, medio y alto) para Erdosteina y

600, 2500 y 12000 ng/mL (nivel bajo, medio y alto) para el Metabolito M1, las cuales se procesaron por quintuplicado empleando el método analítico propuesto en la sección 4.4.3 y se inyectaron al cromatógrafo. Se cuantificó la concentración de las muestras al interpolar la respuesta en la curva de calibración y se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (% C.V.) para cada nivel probado.

El criterio de aceptación menciona que el método es repetible si el coeficiente de variación no excede al  $\pm 15.0\%$ .

#### **4.5.4.2 Reproducibilidad**

La determinación de la reproducibilidad del método se realizó durante tres días. Cada día se preparó una curva de calibración y muestras adicionadas en plasma a concentraciones de 125, 400 y 2500 ng/mL para Erdosteina y 600, 2500 y 12000 ng/mL para el Metabolito M1. Las muestras se procesaron por triplicado utilizando el método analítico propuesto en la sección 4.4.3 y se inyectaron al cromatógrafo.

La respuesta de los puntos control se interpolaron en la curva de calibración preparada el día de análisis y se calculó la concentración de las muestras. Para cada nivel de concentración se calculó el promedio y la desviación estándar, mientras que el coeficiente de variación se calculó por nivel y global.

Según el criterio de aceptación, el método es reproducible si el coeficiente de variación para cada nivel de concentración, así como el global, no es mayor al  $\pm 15.0\%$ .

#### **4.5.5 Exactitud**

La exactitud del método se determinó a partir de las concentraciones cuantificadas en las pruebas de precisión. Para cada nivel de concentración se calculó el promedio de las concentraciones calculadas y, a partir de este valor, se obtuvo la desviación estándar absoluta del promedio de las concentraciones respecto a la concentración nominal de las muestras de los tres días consecutivos de la prueba.

En este caso, el criterio de aceptación indica que el porcentaje de desviación estándar absoluta por concentración y global debe ser menor o igual al 15.0% respecto al valor nominal.

#### **4.5.6 Estabilidad**

La evaluación de este parámetro nos permitió demostrar la estabilidad de Erdosteina y de su Metabolito M1 en la matriz biológica durante el tiempo y condiciones de almacenamiento y procesamiento de las muestras.

##### **4.5.6.1 Estabilidad a largo plazo**

Se prepararon puntos control de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma a concentraciones de 125, 400 y 2500 ng/mL para Erdosteina y de 600, 2500 y 12000 ng/mL para el Metabolito M1. De cada uno de los puntos se tomaron tres alícuotas, las cuales se analizaron junto con una curva de calibración de acuerdo a lo descrito en el punto 4.4.3. El volumen restante se almacenó a -70° C por un periodo de 38 días. Al término de este periodo, las muestras se descongelaron y se analizaron por triplicado junto con una curva de calibración preparada el día de análisis.

A partir de las muestras descongeladas, se obtuvo la concentración para cada nivel de acuerdo al método, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. La concentración de los puntos control antes del proceso de congelación (concentración inicial) se comparó con la concentración obtenida a los 38 días de almacenamiento a -70°C (concentración final) y se determinó el porcentaje de diferencia relativa de la concentración final respecto a la concentración inicial mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Diferencia relativa} = \left( \frac{\text{Concentración calculada inicial} - \text{Concentración calculada final}}{\text{Concentración calculada inicial}} \right) \times 100$$

Según el criterio de aceptación, se considera que la muestra es estable durante el almacenamiento a largo plazo si, para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones finales no difiere en  $\pm 15.0\%$  de la concentración inicial y si el coeficiente de variación no es mayor al 15.0% en los niveles probados.

##### **4.5.6.2 Estabilidad en la mesa de trabajo**

Para evaluar la estabilidad en la mesa de trabajo se prepararon muestras plasmáticas de Erdosteina y del Metabolito M1 a los tres niveles de concentración ya mencionados, las

cuales se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Después de este periodo las muestras se descongelaron, se tomaron tres alícuotas de cada nivel de concentración, se procesaron inmediatamente según lo descrito en la sección 4.4.3 y se analizaron. El volumen restante de las muestras control se mantuvo sobre la mesa de trabajo durante 8 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se procesaron por triplicado y se analizaron.

Se obtuvo la concentración de ambas series, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación entre las réplicas, así como el porcentaje de diferencia relativa, siendo la concentración final la de las muestras que se mantuvieron a temperatura ambiente y la concentración inicial la cuantificada a partir de las muestras que se procesaron inmediatamente.

Por criterio de aceptación se establece que las muestras se consideran estables en la mesa de trabajo durante 8 horas si la concentración final no difiere en  $\pm 15.0\%$  de la concentración inicial y se cumple con los criterios de precisión y exactitud

#### **4.5.6.3 Estabilidad de la muestra procesada**

Se prepararon muestras plasmáticas a las concentraciones de 125, 400 y 2500 ng/mL de Erdosteina y 600, 2500 y 12000 ng/mL del Metabolito M1 y se procesaron por triplicado de acuerdo a lo propuesto en el punto 4.4.3. Se inyectaron al cromatógrafo inmediatamente después de ser procesadas (tiempo cero). Al terminar la corrida analítica, las muestras se mantuvieron en el automuestreador durante 48 horas y, transcurrido este tiempo, se reinyectaron.

Se obtuvo la concentración, el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada nivel evaluado, así como el porcentaje de diferencia relativa de la concentración final (muestras después de 48 horas) respecto a la concentración al tiempo cero.

Las muestras se consideran estables en el automuestreador si el promedio de las concentraciones finales no difiere en  $\pm 15.0\%$  del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero y si el coeficiente de variación no es mayor al 15.0% en los

niveles probados, esto de acuerdo a lo establecido en el criterio de aceptación correspondiente.

#### **4.5.6.4 Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación**

Se prepararon dos series de muestras plasmáticas a los tres niveles de concentración establecidos para Erdosteina y para el Metabolito M1. Una de estas series se sometió a dos ciclos de congelación–descongelación con un intervalo de 24 horas entre cada ciclo, mientras que la otra se mantuvo en congelación durante el mismo periodo de tiempo. Una vez terminados los ciclos, ambas series de muestras se procesaron por triplicado según lo descrito en 4.4.3 y analizaron.

Se obtuvo la concentración para cada muestra, el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, así como el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración de las muestras sometidas a los ciclos de congelación-descongelación (concentración final) respecto a la concentración de las muestras que se mantuvieron en congelación (concentración inicial).

El criterio de aceptación establece que las muestras se consideran estables a ciclos de congelación-descongelación si el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración final de las muestras con respecto a la concentración inicial no es mayor al  $\pm 15.0\%$  y el coeficiente de variación por nivel de concentración no es mayor al 15.0%.

#### **4.5.7 Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación se determinó, tal como se estableció en el PNO de CAFET, al analizar por sextuplicado muestras de plasma conteniendo Erdosteina y Metabolito M1 en una concentración de 50 ng/mL y 200 ng/mL respectivamente, las cuales equivalen al punto más bajo de la curva de calibración.

Se calculó la concentración de Erdosteina y Metabolito M1 al interpolar la respuesta de cada una de las réplicas en la curva de calibración. Se obtuvo el promedio, la desviación estándar (D.E) y el coeficiente de variación (% C.V.).

Para que la concentración dada pueda ser considerada como el límite de cuantificación debe cumplir con el criterio de aceptación, el cual indica que, para ambos analitos, el

coeficiente de variación y el porcentaje de diferencia de la concentración cuantificada respecto a la concentración nominal deben ser menor o igual al  $\pm 20.0\%$ ,

#### **4.5.8 Límite de detección**

El límite de detección del método analítico se determinó al realizar diluciones del límite de cuantificación con plasma en una proporción 1:1 y 1:2, las cuales se procesaron por sextuplicado.

El criterio de aceptación dice que se debe considerar como el límite de detección a la concentración mínima de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma que es detectable, aunque esta no cumpla con los criterios de precisión y exactitud.

#### **4.5.9 Selectividad**

La evaluación de la selectividad consistió en los siguientes puntos:

##### **4.5.9.1 Compuestos endógenos de la matriz biológica**

Se prepararon muestras blancos de plasma obtenidas de 6 fuentes distintas y se procesaron de acuerdo a lo propuesto en el punto 4.4.3.

El criterio de aceptación establecido para este caso consistía en la demostración de que ninguno de los blancos de plasma presentaba señal a los tiempos de retención de la Erdosteina y el Metabolito M1.

##### **4.5.9.2 Fármacos de uso común**

Se prepararon muestras adicionadas con los siguientes analitos a una concentración de 10000 ng/mL: Cafeína, Acido salicílico, Acetaminofen y Naproxeno sódico. Estas muestras se procesaron como los blancos de plasma y se inyectaron al sistema cromatográfico.

Para cumplir con el criterio de aceptación, ninguno de estos compuestos podrá presentar interferencia al tiempo de retención de los analitos de interés (Erdosteina y Metabolito M1).

#### **4.5.10 Tolerancia**

Se evaluó la tolerancia del método analítico al uso de blancos de plasma hemolizados y lipidémicos con el fin de asegurar la confiabilidad del método en caso de que una muestra presente alguna de estas características.

##### **4.5.10.1 Tolerancia a plasma hemolizado y lipidémico**

La evaluación de la tolerancia del método consistió en la preparación de dos series de puntos control de Erdosteina y del Metabolito M1 a las concentraciones de 125, 400 y 2500 ng/mL y 600, 2500 y 12000 ng/mL respectivamente. Una de las series se preparó utilizando una matriz plasmática hemolizada y la otra con una matriz plasmática lipidémica. Las muestras se analizaron por quintuplicado según el método analítico propuesto, obteniéndose la concentración para Erdosteina y el Metabolito M1 al interpolar el valor de la respuesta para cada muestra en la curva de calibración preparada el mismo día de análisis. A partir de las concentraciones cuantificadas se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, así como el porcentaje de diferencia relativa de las concentraciones cuantificadas respecto a la concentración nominal.

El criterio de aceptación para este parámetro menciona que se puede considerar que el método es tolerante a muestras hemolizadas y lipidémicas si el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15.0\%$  de la concentración nominal y si el coeficiente de variación no es mayor al 15.0% en los niveles probados.

#### **4.5.11 Acarreamiento**

La evaluación del acarreamiento es de suma importancia al emplear equipos tales como el Espectrómetro de masas, ya que nos permite determinar la existencia de residuos de analito que fueran acarreados entre corridas y que interfirieran con la cuantificación. El parámetro se evaluó el último día de la validación intercalando una fase móvil cada nueve muestras en la corrida analítica.

Se estableció, de acuerdo al PNO de CAFET, que durante la rutina de inyección las fases móviles no deben de presentar ninguna señal cromatográfica a los tiempos de retención de Erdosteina ni del Metabolito M1.

#### 4.6 Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos

Una vez terminada la validación del método bioanalítico, se llevó a cabo un estudio piloto para la cuantificación de Erdosteina y su Metabolito M1 en muestras plasmáticas. En el estudio participaron 10 voluntarios sanos de sexo masculino, a los cuales se les administró una dosis única de 300 mg de Erdosteina.

Se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 y 10.0 horas, separando el plasma por centrifugación. Las muestras fueron obtenidas en la Asociación Mexicana para la Investigación Clínica, A.C. (AMIC) donde se mantuvieron a  $-70^{\circ}$  C hasta su traslado al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, S.A. (CAFET) donde fueron almacenadas a iguales condiciones. Las muestras se descongelaron el día de análisis, se tomaron 200  $\mu$ L y se analizaron empleando el método descrito en la sección 4.4.3.

Se obtuvo la concentración cuantificada de Erdosteina y el Metabolito M1 para todos los tiempos de muestreo de cada sujeto interpolando las respuestas de las muestras en una curva de calibración preparada el mismo día de análisis. A partir de estos datos, se calcularon los parámetros farmacocinéticos para cada sujeto empleando el programa WinNonLin 4.0 (Pharsight, Mountain View, Ca USA) utilizando un ajuste de modelo independiente, obteniéndose los valores correspondientes a  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $T_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $ABC_{0-t}$  y  $ABC_{0-\infty}$ .

RESULTADOS  
y  
ANÁLISIS

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1 Espectros de masas

Las *figuras 9 y 10* muestran el espectro de masas obtenido para Erdosteina y para el Metabolito M1. En estas figuras se puede observar que el ion precursor de Erdosteina tiene un valor de 280.776 m/z y el ion fragmento un valor de 244.854 m/z. Por su parte, los valores del ion precursor y del ion fragmento del Metabolito M1 son de 298.863 m/z y 267.839 m/z respectivamente.

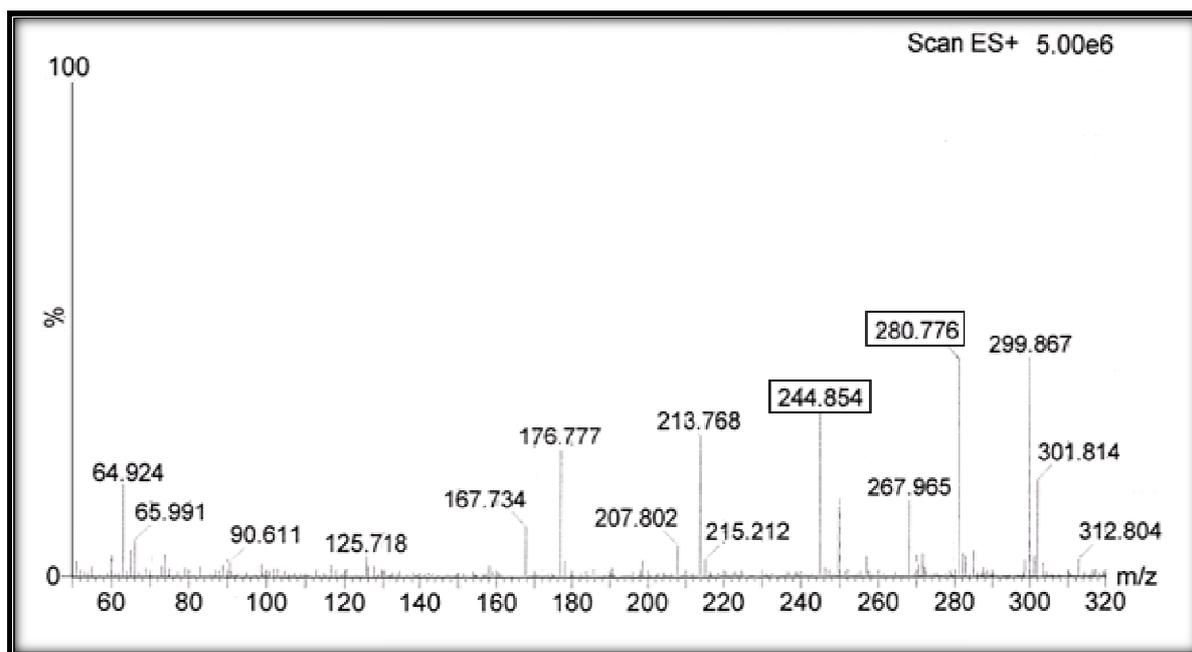


Figura 9. Espectro de masas de Erdosteina.

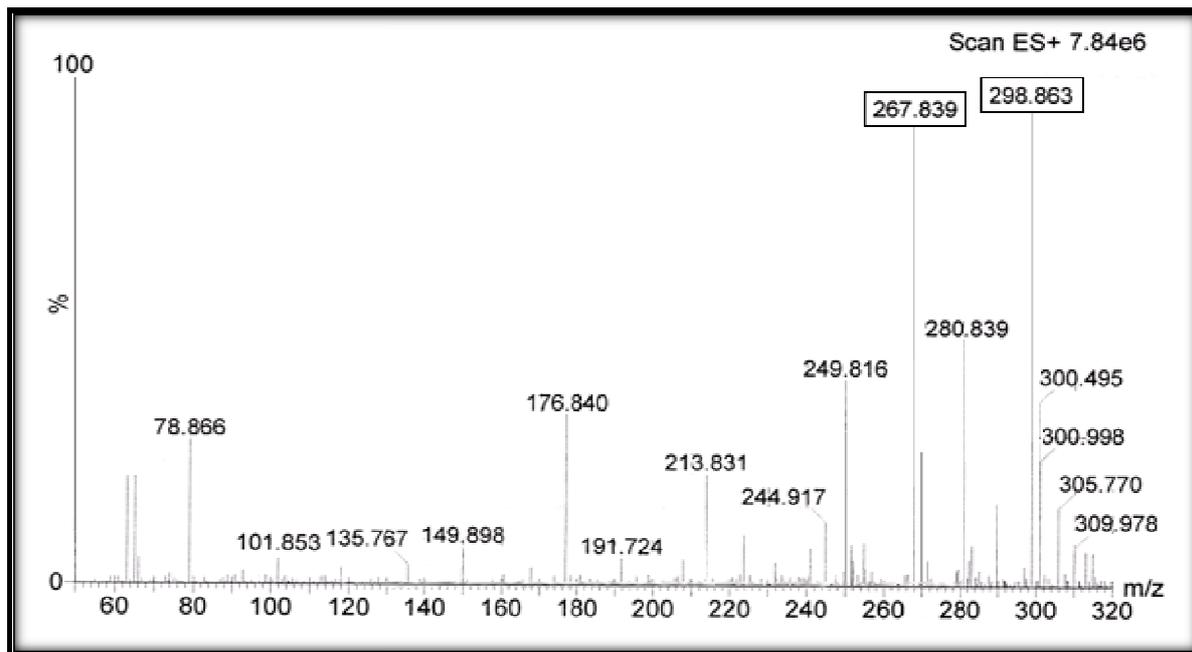


Figura 10. Espectro de masas del Metabolito M1.

La figura 11 corresponde al espectro de masas para Tartrato de metoprolol. En ella se aprecia que el ion precursor y el ion fragmento tienen un valor de 268.020 m/z y 115.902 m/z respectivamente.

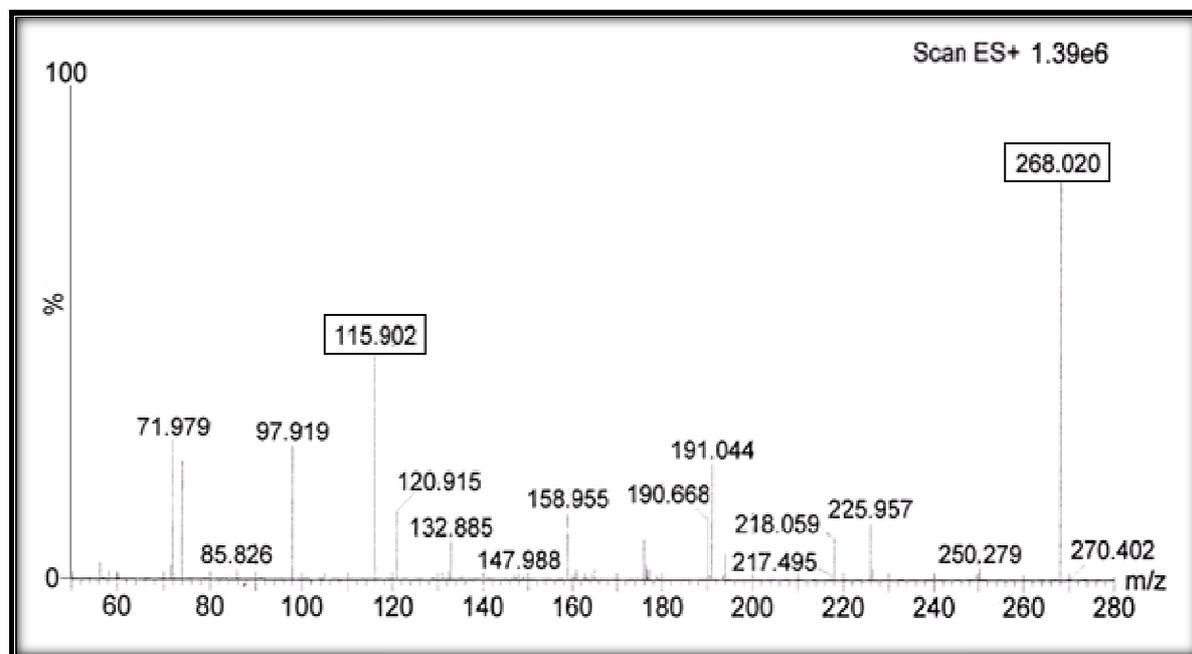
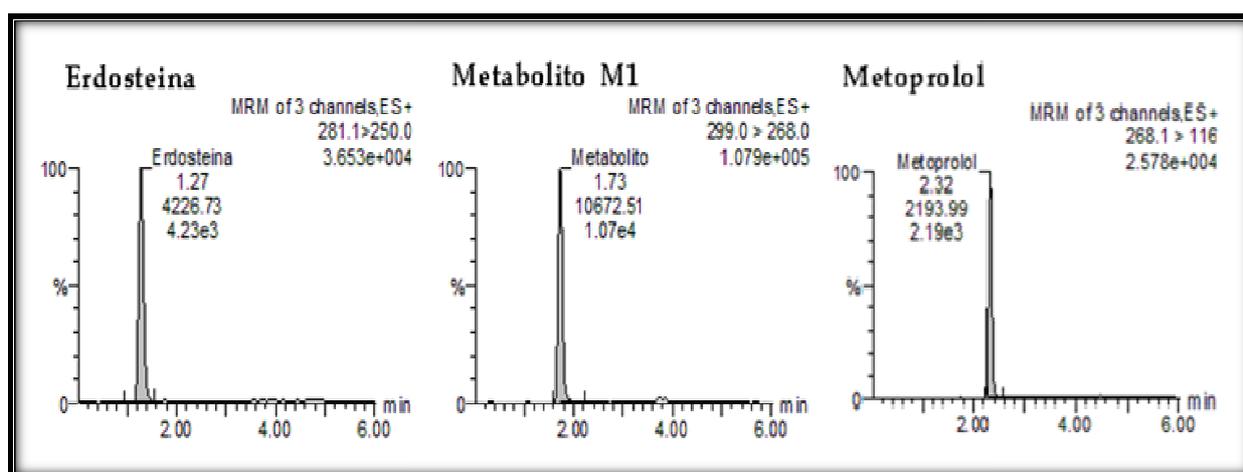


Figura 11. Espectro de masas de Tartrato de metoprolol.

### 5.2 Tiempos de retención

La *figura 12* muestra los cromatogramas representativos de Erdosteina, Metabolito M1 y Tartrato de metoprolol en plasma.

En dicha figura se puede observar que el tiempo de retención de Erdosteina es de 1.27 minutos, el del Metabolito M1 es de 1.73 minutos y el de Tartrato de metoprolol es de 2.32 minutos.



*Figura 12. Cromatogramas típicos de Erdosteina, Metabolito M1 y Tartrato de metoprolol.*

### 5.3 Adecuación del sistema

En la *tabla 6* se muestran los coeficientes de variación de la adecuación del sistema obtenidos durante los días de la validación del método. Debido a que los coeficientes de variación para la respuesta de ambos compuestos de interés no excede el 10.0 %, se deduce que se cumple con el criterio de aceptación establecido.

*Tabla 6. Coeficientes de variación de la adecuación del sistema durante los 6 días de validación.*

Día de análisis	% Coeficiente de variación de la respuesta (n=5)	
	Erdosteina	Metabolito M1
1	3.12	3.08
2	2.70	1.67
3	0.58	1.16
4	8.29	5.29
5	5.14	3.74
6	3.85	6.36

#### **5.4 Validación del método analítico**

Los resultados para cada uno de los parámetros evaluados durante la validación del método bioanalítico se muestran a continuación:

##### **5.4.1 Recuperación absoluta**

###### **5.4.1.1 Recuperación de blancos de plasma y muestras adicionadas**

Las tablas siguientes muestran los resultados obtenidos en la evaluación de recuperación absoluta. En ellas se observa que el porcentaje de recuperación promedio fue cercano al 100% y que el porcentaje de recuperación obtenido por nivel de concentración (bajo, medio y alto) para Erdosteina, Metabolito M1 y Tartrato de metoprolol no varía en  $\pm 15.0\%$  del porcentaje de recuperación promedio, es decir, la diferencia del porcentaje de recuperación entre niveles es menor al  $\pm 15.0\%$ . Además los coeficientes de variación, tanto de las respuestas para cada nivel como de la recuperación del estándar interno, son menores al 15.0%.

En las *tablas 7 y 8* se muestran las áreas de la respuesta de Erdosteina en las muestras acuosas y plasmáticas para los diferentes niveles de concentración, además de la recuperación absoluta y la diferencia del porcentaje de recuperación respecto a la recuperación absoluta promedio.

Tabla 7. Recuperación absoluta. Áreas de Erdosteina en las muestras acuosas y plasmáticas.

Nivel de concentración	Bajo	Medio	Alto
<b>Área de Erdosteina en las muestras acuosas</b>			
	3416.44	11079.79	59447.02
	3387.60	8822.15	59839.09
	3662.76	9474.01	57890.08
	3532.68	10134.29	53682.22
	3905.87	9729.58	57447.60
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	3581.07	9847.96	57661.20
<b>D.E.</b>	211.57	837.49	2442.47
<b>C.V.%</b>	5.91	8.50	4.24
<b>Área de Erdosteina en las muestras de plasma</b>			
	5802.50	12819.13	75269.20
	5686.44	15236.53	73132.80
	5798.91	14130.56	76909.08
	4137.23	11990.18	88590.45
	5208.90	15440.91	75336.02
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	5326.79	13923.46	77847.51
<b>D.E.</b>	708.43	1502.23	6153.77
<b>C.V.%</b>	13.30	10.79	7.91

Tabla 8. Porcentaje de recuperación absoluta de Erdosteina.

Nivel de concentración	Bajo	Medio	Alto
<b>% Recuperación de Erdosteina</b>	148.75	141.38	135.01
<b>Recuperación absoluta (%)</b>			
	141.71		
<b>Diferencia del % de recuperación respecto a la recuperación absoluta promedio</b>			
	4.97	-0.23	-4.73

Por su parte, las *tablas 9 y 10* contienen las respuestas del Metabolito M1 en las muestras acuosas y plasmáticas además de la recuperación absoluta para cada nivel de concentración.

Tabla 9. Recuperación absoluta. Áreas del Metabolito M1 en las muestras acuosas y plasmáticas.

Nivel de concentración	Bajo	Medio	Alto
<b>Área de Metabolito M1 en las muestras acuosas</b>			
	2549.38	12449.97	80936.59
	2550.09	10042.47	84913.38
	2579.36	9940.54	81073.25
	2587.31	11818.37	73400.56
	2542.79	11449.54	84758.04
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	2561.78	11140.18	81016.36
<b>D.E.</b>	20.08	1108.52	4668.96
<b>C.V.%</b>	0.78	9.95	5.76
<b>Área de Metabolito M1 en las muestras de plasma</b>			
	2895.57	10076.99	80270.82
	2794.14	14495.55	74695.91
	2918.90	12587.61	81378.81
	2115.29	10238.21	83872.35
	2407.83	11638.31	85266.56
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	2626.35	11807.33	81096.89
<b>D.E.</b>	351.84	1824.84	4087.29
<b>C.V.%</b>	13.40	15.46	5.04

Tabla 10. Porcentaje de recuperación absoluta del Metabolito M1.

Nivel de concentración	Bajo	Medio	Alto
<b>% Recuperación Metabolito M1</b>	102.52	105.99	100.10
Recuperación absoluta (%)			
102.87			
<b>Diferencia del % de recobro respecto a la recuperación absoluta promedio</b>			
	-0.34	3.03	-2.69

La *tabla 11* presenta las áreas de respuesta del Tartrato de metoprolol (estándar interno) en las muestras para los diferentes niveles de concentración evaluados (bajo, medio y alto).

Tabla 11. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas y plasmáticas de Tartrato de metoprolol y porcentaje de recuperación.

Nivel de concentración	Bajo	Medio	Alto
<b>Área de Tartrato de metoprolol en las muestras acuosas</b>			
	2111.72	2386.54	2465.55
	2264.18	1958.59	2419.15
	2473.49	1943.69	2213.99
	2316.51	2292.60	2058.08
	2358.49	2093.15	2278.81
<b>n</b>	15		
<b>Promedio</b>	2242.30		
<b>D.E.</b>	173.70		
<b>C.V.%</b>	7.75		
<b>Área de Tartrato de metoprolol en las muestras de plasma</b>			
	2560.46	2037.89	2354.79
	2394.41	2547.91	2271.12
	2366.32	2408.18	2376.66
	1743.23	1959.94	2433.67
	2145.65	2353.22	2451.63
<b>n</b>	15		
<b>Promedio</b>	2293.67		
<b>D.E.</b>	227.61		
<b>C.V.%</b>	9.92		
<b>% Recuperación absoluta</b>	102.29		

Tal como se observa en la *tabla 9*, el coeficiente de variación para el nivel medio de Metabolito M1 excede el 15.0 % especificado en el criterio de aceptación. En este caso, el dato se completó utilizando el factor de respuesta. El resultado final equivale al 11.49%, un valor dentro del criterio.

De este modo, los resultados anteriores cumplen con los criterios establecidos para la recuperación absoluta por lo que se establece que esta es aceptable y constante a lo largo del rango de trabajo.

#### 5.4.2 Linealidad

Los resultados de la evaluación de linealidad del método se muestran en las *tablas 12-15*, mientras que las *figuras 13 y 14* presentan las ecuaciones de la curva de uno de los días de evaluación de la linealidad al ajustadas los resultados a un modelo log/log.

Tabla 12. Linealidad.

Concentraciones de las curvas de Erdosteina generada durante la evaluación de la linealidad del método y porcentaje de diferencia respecto a la concentración nominal.

Día de análisis	Concentración nominal de Erdosteina (ng/mL)								
	50.0	100.0	150.0	250.0	350.0	500.0	1000.0	1500.0	3000.0
	Concentración cuantificada de Erdosteina (ng/mL)								
1	53.81	93.90	138.61	263.71	335.80	537.69	1015.76	1413.89	3083.17
2	48.19	103.49	144.22	222.51	365.18	565.82	1060.16	1646.93	2557.54
3	49.07	99.00	156.41	241.59	357.84	498.38	1023.83	1506.20	2924.66
<b>Promedio</b>	50.36	98.80	146.41	242.60	352.94	533.96	1033.25	1522.34	2855.12
<b>D.E.</b>	3.02	4.80	9.10	20.62	15.29	33.87	23.65	117.35	269.62
<b>% C.V.</b>	6.00	4.86	6.22	8.50	4.33	6.34	2.29	7.71	9.44
<b>% Diferencia</b>	0.71	-1.20	-2.39	-2.96	0.84	6.79	3.33	1.49	-4.83

Tabla 13. Linealidad.

Concentraciones de las curvas del Metabolito M1 generadas durante la evaluación de la linealidad del método y porcentaje de diferencia respecto a la concentración nominal.

Día de análisis	Concentración nominal de Metabolito M1 (ng/mL)								
	200.0	400.0	800.0	1600.0	3000.0	6000.0	7500.0	10000.0	15000.0
	Concentración cuantificada de Metabolito M1 (ng/mL)								
1	215.43	398.64	777.27	1556.29	2770.19	5983.52	7399.62	9473.69	17178.25
2	215.52	424.03	735.39	1342.46	2966.70	6644.46	7626.21	10466.31	14608.10
3	220.45	389.83	762.17	1397.85	3134.48	5949.60	7888.44	10491.36	14674.07
<b>Promedio</b>	217.13	404.17	758.28	1432.20	2957.13	6192.53	7638.09	10143.79	15486.81
<b>D.E.</b>	2.87	17.75	21.21	110.98	182.33	391.75	244.63	580.46	1465.20
<b>% C.V.</b>	1.32	4.39	2.80	7.75	6.17	6.33	3.20	5.72	9.46
<b>% Diferencia</b>	8.57	1.04	-5.22	-10.49	-1.43	3.21	1.84	1.44	3.25

Tabla 14. Linealidad. Ordenada al origen, pendiente y coeficientes de determinación de las curvas de Erdosteina.

Día de análisis	Ordenada	Pendiente	r <sup>2</sup>
1	-1.489	0.924	0.998
2	-1.527	0.905	0.995
3	-1.465	0.817	1.000

Tabla 15. Linealidad. Ordenada al origen, pendiente y coeficientes de determinación de las curvas del Metabolito M1.

Día de análisis	Ordenada	Pendiente	r <sup>2</sup>
1	-2.741	1.073	0.998
2	-3.065	1.120	0.997
3	-3.001	1.076	0.998

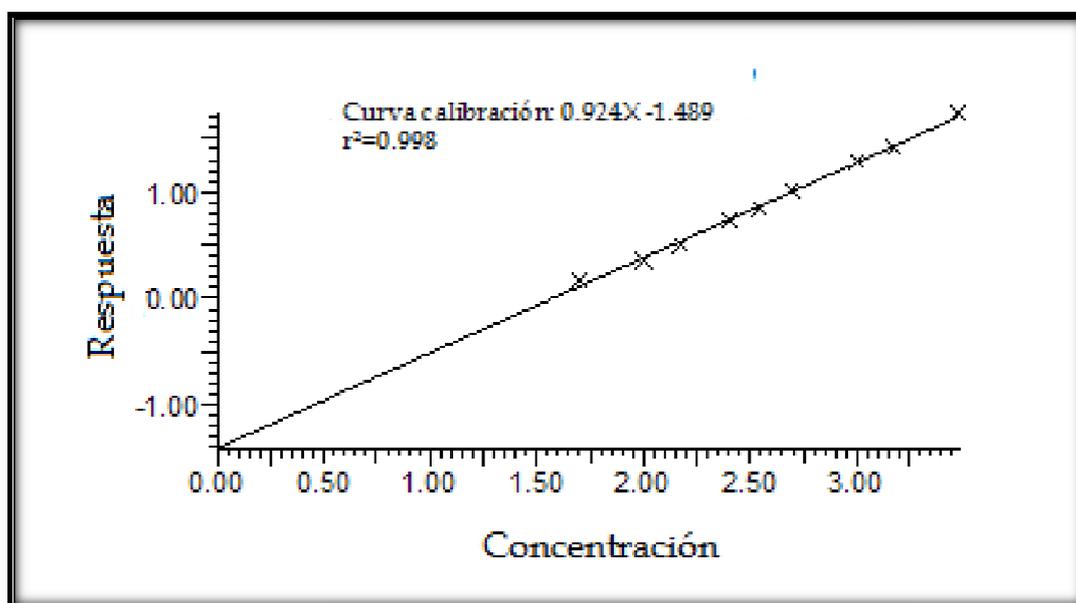


Figura 13. Linealidad. Curva de calibración de Erdosteina en un rango de 50.0 ng/mL a 3000.0 ng/mL.

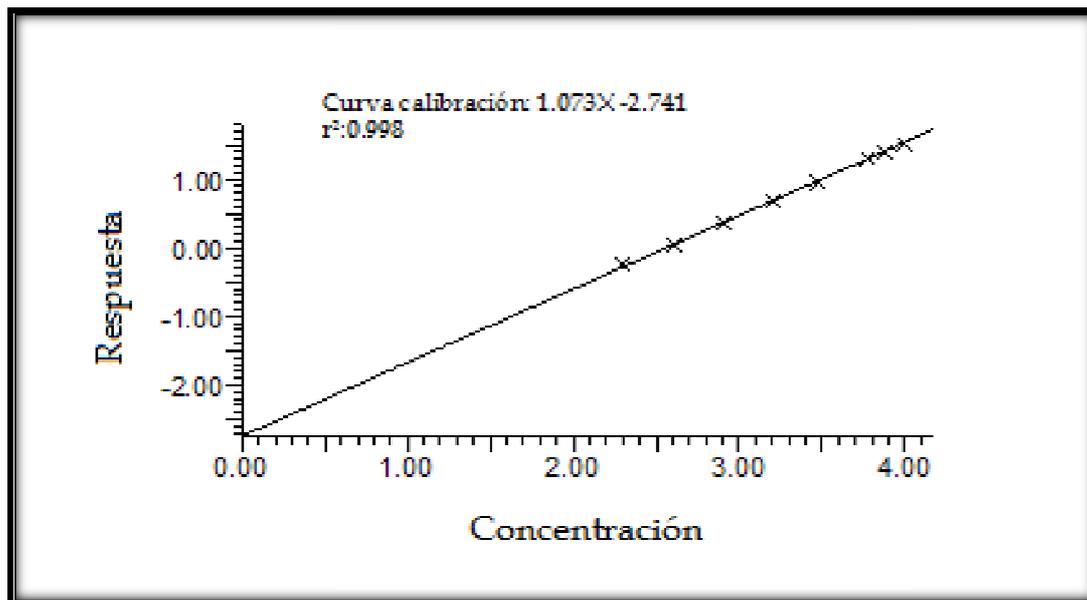


Figura 14. Linealidad. Curva de calibración del Metabolito M1 en un rango de 200.0 ng/mL a 15000.0 ng/mL

Para ambos analitos, el coeficiente de determinación para las curvas es mayor a 0.98 (*tablas 14 y 15*). En cuanto al porcentaje de diferencia relativa entre el valor cuantificado y el valor nominal, en las *tablas 12 y 13* se puede observar que el promedio de los días de análisis difiere en menos del  $\pm 15.0\%$  respecto al valor nominal, y el coeficiente de variación por nivel de concentración es menor al 10.0 %.

Debido a lo anterior, se determina que el método es lineal en el intervalo de trabajo.

#### 5.4.3 Precisión

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de precisión de los puntos control de Erdosteina y Metabolito M1 (*Tablas 16-19*). Se puede observar que los coeficientes de variación de las concentraciones cuantificadas de Erdosteina poseen valores de 6.07%, 7.14% y 5.62% (nivel bajo, medio y alto), mientras que las concentraciones de Metabolito M1 mostraron coeficientes de variación de 6.53%, 5.52% y 5.91% para los niveles bajo, medio y alto respectivamente.

Lo anterior permite demostrar que el método es preciso (repetible y reproducible) ya que el coeficiente de variación para cada nivel de concentración por día, así como entre los tres días de evaluación, son menores al 15.0%.

Tabla 16. Resultados de Precisión para Erdosteina.

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
<b>DÍA 1</b>	136.87	376.85	2372.16
	124.54	394.66	2554.73
	126.57	377.23	2535.80
	133.43	371.54	2363.50
	129.75	392.86	2424.48
<b>Promedio</b>	130.23	382.63	2450.13
<b>D.E.</b>	5.01	10.43	90.17
<b>C.V.</b>	3.84	2.73	3.68
<b>DÍA 2</b>	120.41	372.08	2242.91
	126.80	351.84	2261.29
	131.28	344.55	2273.64
	126.71	360.80	2589.45
	129.92	389.84	2147.32
<b>Promedio</b>	127.03	363.82	2302.92
<b>D.E.</b>	4.20	17.82	167.71
<b>C.V.</b>	3.30	4.90	7.28
<b>DÍA 3</b>	121.30	385.70	2329.46
	109.08	350.17	2441.92
	111.07	401.82	2546.69
	121.42	406.85	2477.59
	123.48	452.83	2531.17
<b>Promedio</b>	117.27	399.47	2465.37
<b>D.E.</b>	6.66	37.17	86.77
<b>C.V.</b>	5.68	9.31	3.52

Tabla 17. Resultados globales de Precisión para Erdosteina.

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina(ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
n	15	15	15
Promedio	124.84	381.97	2406.14
D.E.	7.58	27.27	135.13
C.V.	6.07	7.14	5.62

Tabla 18. Resultados de Precisión para el Metabolito M1.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
DÍA 1	684.71	2626.03	13222.68
	673.09	2512.77	13780.63
	662.55	2663.64	13611.65
	682.57	2549.71	12191.68
	675.35	2721.47	13266.43
Promedio	675.65	2614.72	13214.61
D.E.	8.78	84.46	617.89
C.V.	1.30	3.23	4.68
DÍA 2	608.82	2272.72	12738.88
	626.12	2575.83	12338.12
	657.92	2388.17	12789.79
	648.34	2386.83	12863.94
	604.64	2273.07	12969.26
Promedio	629.17	2379.32	12740.00
D.E.	23.56	123.90	240.78
C.V.	3.74	5.21	1.89
DÍA 3	540.78	2634.84	11460.29
	596.11	2446.50	11797.34
	595.04	2604.82	12108.64
	606.03	2627.95	11831.18
	649.33	2528.69	11492.86
Promedio	597.46	2568.56	11738.06
D.E.	38.68	80.19	267.77
C.V.	6.47	3.12	2.28

Tabla 19. Resultados globales de Precisión para el Metabolito M1.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
<b>n</b>	15	15	15
<b>Promedio</b>	634.09	2520.87	12564.22
<b>D.E.</b>	41.39	139.20	742.97
<b>C.V.</b>	6.53	5.52	5.91

#### 5.4.4 Exactitud

En las *tablas 20 y 21* se presentan los porcentajes de desviación absoluta de cada punto control evaluado durante la precisión del método. En dichas tablas se observa que los valores son menores al 15% establecido en el criterio de aceptación correspondiente, por lo que se concluye que el método es exacto.

Tabla 20. Resultados de Exactitud para Erdosteina.

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
	<b>% Desviación Absoluta</b>		
<b>DÍA 1</b>	9.50	5.79	5.11
	0.37	1.34	2.19
	1.26	5.69	1.43
	6.74	7.12	5.46
	3.80	1.79	3.02
<b>Promedio</b>	4.33	4.35	3.44
<b>DÍA 2</b>	3.67	6.98	10.28
	1.44	12.04	9.55
	5.02	13.86	9.05
	1.37	9.80	3.58
	3.94	2.54	14.11
<b>Promedio</b>	3.09	9.04	9.31
<b>DÍA 3</b>	2.96	3.58	6.82
	12.74	12.46	2.32
	11.14	0.46	1.87
	2.86	1.71	0.90
	1.22	13.21	1.25
<b>Promedio</b>	6.18	6.28	2.63
<b>Resultado global</b>			
<b>n</b>	15	15	15
<b>Promedio</b>	4.54	6.56	5.13

Tabla 21. Resultados de Exactitud para el Metabolito M1.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
	% Desviación Absoluta		
<b>DÍA 1</b>	14.12	5.04	10.19
	12.18	0.51	14.84
	10.43	6.55	13.43
	13.76	1.99	1.60
	12.56	8.86	10.55
<b>Promedio</b>	12.61	4.59	10.12
<b>DÍA 2</b>	1.47	9.09	6.16
	4.35	3.03	2.82
	9.65	4.47	6.58
	8.06	4.53	7.20
	0.77	9.08	8.08
<b>Promedio</b>	4.88	6.04	6.17
<b>DÍA 3</b>	9.87	5.39	4.50
	0.65	2.14	1.69
	0.83	4.19	0.91
	1.01	5.12	1.41
	8.22	1.15	4.23
<b>Promedio</b>	4.12	3.60	2.55
<b>Resultado global</b>			
<b>n</b>	15	15	15
<b>Promedio</b>	7.20	4.47	6.28

### 5.4.5 Estabilidad

#### 5.4.5.1 Estabilidad a largo plazo

En los resultados de la evaluación de estabilidad de las muestras a los 38 días, mostrados a continuación (*tablas 22 y 23*), se observa que las concentraciones cuantificadas de Erdosteina difieren, respecto a la concentración inicial, en un 4.42%, 8.12% y 5.49% para los niveles bajo, medio y alto respectivamente. Para el caso del Metabolito M1, las diferencias respecto al promedio de las concentraciones iniciales son de 6.33% para el nivel bajo, 9.84% para el nivel medio y 3.85% para el nivel alto. Además, los coeficientes de variación obtenidos para ambos analitos es menor al 15.0%. Por lo tanto, se

demuestra que las muestras son estables por lo menos durante 38 días cuando se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 22. Estabilidad a largo plazo  
(Erdosteina). Almacenamiento durante 38 días a  $-70^{\circ}\text{C}$

	Concentración inicial de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	119.87	458.78	2456.91
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	114.07	427.11	2506.38
	114.16	428.86	2313.10
	115.50	408.68	2146.63
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	114.58	421.55	2322.04
<b>D.E.</b>	0.80	11.18	180.04
<b>C.V.%</b>	0.70	2.65	7.75
<b>% Diferencia</b>	4.42	8.12	5.49

Tabla 23. Estabilidad a largo plazo  
(Metabolito M1). Almacenamiento durante 38 días a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

	Concentración inicial de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	584.23	2451.64	13109.53
	Concentración final de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	554.28	2320.87	12233.83
	552.30	2141.35	12883.67
	535.24	2169.17	12696.30
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	547.27	2210.46	12604.60
<b>D.E.</b>	10.47	96.62	334.48
<b>C.V.%</b>	1.91	4.37	2.65
<b>% Diferencia</b>	6.33	9.84	3.85

#### 5.4.5.2 Estabilidad en la mesa de trabajo

En el caso de la evaluación de la estabilidad en la mesa de trabajo se encontró que el promedio de las concentraciones cuantificadas de Erdosteina diferían 1.16%, 1.87% y 4.14% (para los niveles bajo, medio y alto respectivamente) del promedio de las concentraciones iniciales obtenidas y el coeficiente de variación no es mayor al 15.0% en cada nivel probado. A su vez, las concentraciones cuantificadas del Metabolito M1 mostraron una diferencia respecto al promedio de la concentración inicial de 0.05% para el nivel bajo, 0.37% para el nivel medio y 2.82% para el nivel alto (tablas 24 y 25).

Debido a lo anterior, se considera que las muestras son estables cuando se mantienen a temperatura ambiente durante 8 horas.

Tabla 24. Estabilidad en la mesa de trabajo. Resultados para Erdosteina.

	Concentración inicial de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	113.80	379.20	2439.40
	Concentración final de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	113.32	402.58	2529.32
	111.99	398.73	2579.98
	112.14	357.59	2511.23
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	112.48	386.30	2540.18
<b>D.E.</b>	0.73	24.94	35.64
<b>C.V.</b>	0.65	6.46	1.40
<b>% Diferencia</b>	1.16	1.87	4.14

Tabla 25. Estabilidad en la mesa de trabajo. Resultados para el Metabolito M1.

	Concentración inicial de las muestras de Metabolito (ng/mL)		
	577.30	2562.10	11788.80
	Concentración final de las muestras de Metabolito(ng/mL)		
	586.99	2629.34	12307.89
	550.23	2504.11	12152.19
	593.78	2524.28	11902.78
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	577.00	2552.58	12120.96
<b>D.E.</b>	23.43	67.24	204.36
<b>C.V.</b>	4.06	2.63	1.69
<b>% Diferencia</b>	0.05	0.37	2.82

#### 5.4.5.3 Estabilidad de la muestra procesada

Los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad de la muestra procesada se muestran en las *tablas* 26 y 27. Los resultados permiten demostrar que las muestras procesadas son estables cuando se almacenan hasta 48 horas en el automuestreador ya que se cumple con lo requerido por el criterio de aceptación correspondiente.

Tabla 26. Estabilidad de la muestra procesada. Resultados para Erdosteina.

	Concentración al tiempo cero de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	120.10	372.60	2374.10
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina almacenadas (ng/mL)		
	121.58	385.19	2355.73
	122.46	398.63	2416.17
	125.80	400.82	2362.00
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	123.28	394.88	2377.97
<b>D.E.</b>	2.23	8.46	33.23
<b>C.V.</b>	1.81	2.14	1.40
<b>% Diferencia</b>	2.62	5.99	0.16

Tabla 27. Estabilidad de la muestra procesada. Resultados para el Metabolito M1.

	Concentración al tiempo cero de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	618.20	2457.90	13079.30
	Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito M1 almacenadas (ng/mL)		
	615.66	2545.55	11669.43
	618.07	2585.93	11839.86
	605.49	2520.57	11493.21
<b>n</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	613.07	2550.68	11667.50
<b>D.E.</b>	6.68	32.98	173.33
<b>C.V.</b>	1.09	1.29	1.49
<b>% Diferencia</b>	0.83	3.77	10.79

#### 5.4.5.4 Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación

Al evaluar la estabilidad de las muestras a dos ciclos de congelación-descongelación se observó que los resultados no cumplían con los criterios de aceptación debido a que tanto el porcentaje de diferencia relativa como el coeficiente de variación para cada nivel de concentración excedían el 15.0% permitido.

Sin embargo, las muestras probaron ser estables cuando se sometían a un sólo ciclo de congelación-descongelación, esto según los resultados siguientes.

Tabla 28. Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación. Resultados para Erdosteina

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina (ng/mL)		
	136.87	376.85	2372.16
	124.54	394.66	2554.73
	126.57	377.23	2535.80
	133.43	371.54	2363.50
	129.75	392.86	2424.48
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	130.23	382.63	2450.13
<b>D.E.</b>	5.01	10.43	90.17
<b>C.V.</b>	3.84	2.73	3.68
<b>% Diferencia</b>	4.18	4.34	2.00

Tabla 29. Estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación. Resultados para el Metabolito M1.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito (ng/mL)		
	684.71	2626.03	13222.68
	673.09	2512.77	13780.63
	662.55	2663.64	13611.65
	682.57	2549.71	12191.68
	675.35	2721.47	13266.43
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	675.65	2614.72	13214.61
<b>D.E.</b>	8.78	84.46	617.89
<b>C.V.</b>	1.30	3.23	4.68
<b>% Diferencia</b>	12.61	4.59	10.12

#### 5.4.6 Límite de cuantificación

Al analizar los resultados de la evaluación del límite de cuantificación, se observa que el porcentaje de diferencia de la concentración cuantificada para las 6 réplicas respecto a la concentración nominal fue de 4.49 % para Erdosteina y de -9.42% para el Metabolito M1, mientras que el coeficiente de variación fue de 13.94% y de 6.30% respectivamente (*tablas 30 y 31*). Por lo tanto, las concentraciones evaluadas cumplen con los parámetros de precisión y exactitud.

Debido a lo anterior, se estableció como el límite de cuantificación a la concentración más baja del rango de trabajo, es decir 50 ng/mL de Erdosteina y 200 ng/mL de Metabolito M1.

Tabla 30. Límite de cuantificación. Resultados para Erdosteina.

Concentración nominal de las muestras de Erdosteina (ng/mL)	
<b>50.0</b>	
Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina (ng/mL)	
	59.04
	46.26
	42.96
	51.18
	40.24
	46.85
<b>n</b>	6
<b>Promedio</b>	47.76
<b>D.E.</b>	6.66
<b>C.V.</b>	13.94
<b>% Diferencia</b>	4.49

Tabla 31. Límite de cuantificación. Resultados para el Metabolito M1.

Concentración nominal de las muestras de Metabolito(ng/mL)	
<b>200.0</b>	
Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito(ng/mL)	
	198.66
	229.66
	227.21
	226.97
	203.75
	226.79
<b>n</b>	6
<b>Promedio</b>	218.84
<b>D.E.</b>	13.80
<b>C.V.</b>	6.30
<b>% Diferencia</b>	-9.42

### 5.4.7 Límite de detección

Las concentraciones de 12.5 ng/ mL para Erdosteina y de 50 ng/mL para Metabolito M1 (correspondientes a la dilución 1:2) fueron detectadas mediante el método propuesto, aunque los resultados al evaluar dichas concentraciones no mostraron ser precisos y exactos. Debido a esto, las concentraciones anteriores se establecen como el límite de detección.

A continuación se muestra la *figura 15*, la cual muestra los cromatogramas representativos para la inyección de esta prueba.

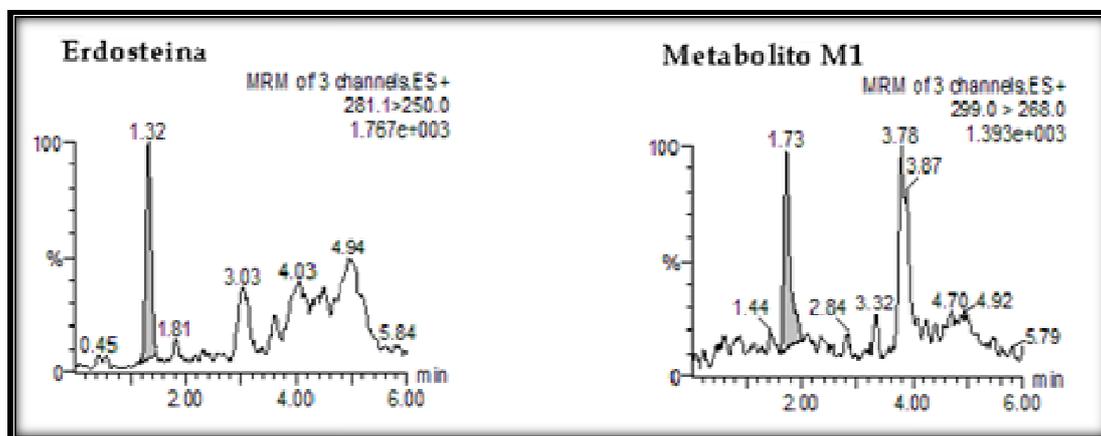


Figura 15. Cromatogramas representativos de la determinación del límite de detección.

### 5.4.8 Selectividad

#### 5.4.8.1 Compuestos endógenos de la matriz biológica

Ninguno de los cromatogramas obtenidos para los distintos plasmas evaluados durante la prueba de selectividad mostró interferencias a los tiempos de retención de los compuestos de interés.

En dichos cromatogramas (*figuras 16-18*) se pueden observar los picos correspondientes al gradiente aplicado al equipo durante la evaluación de este parámetro, mismos que se observaron durante toda la validación del método.

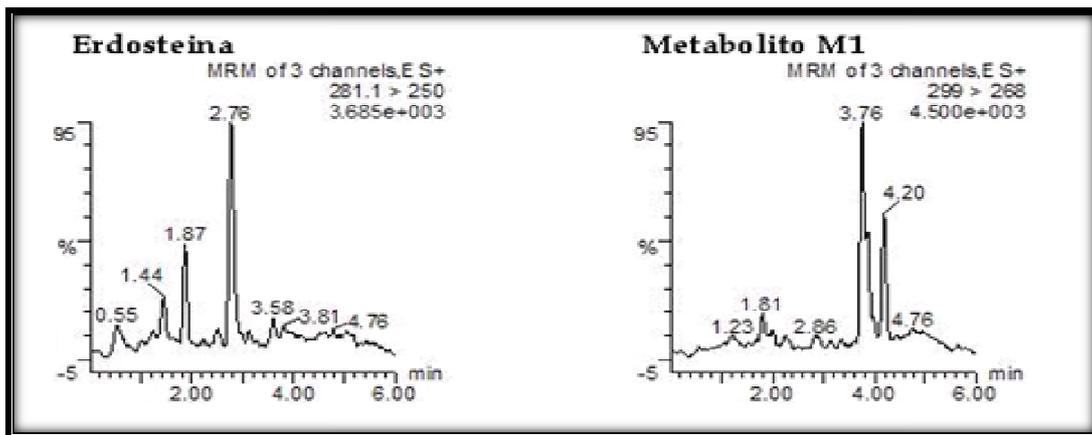


Figura 16. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.

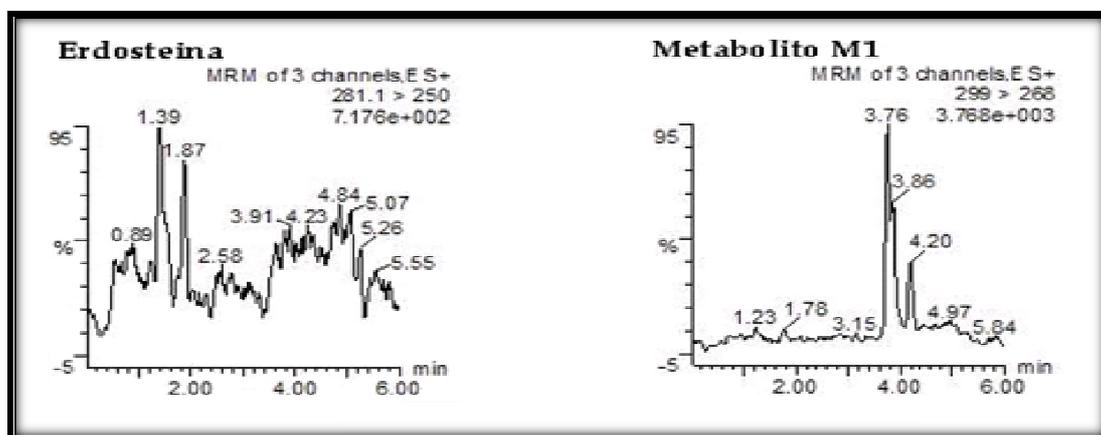


Figura 17. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.

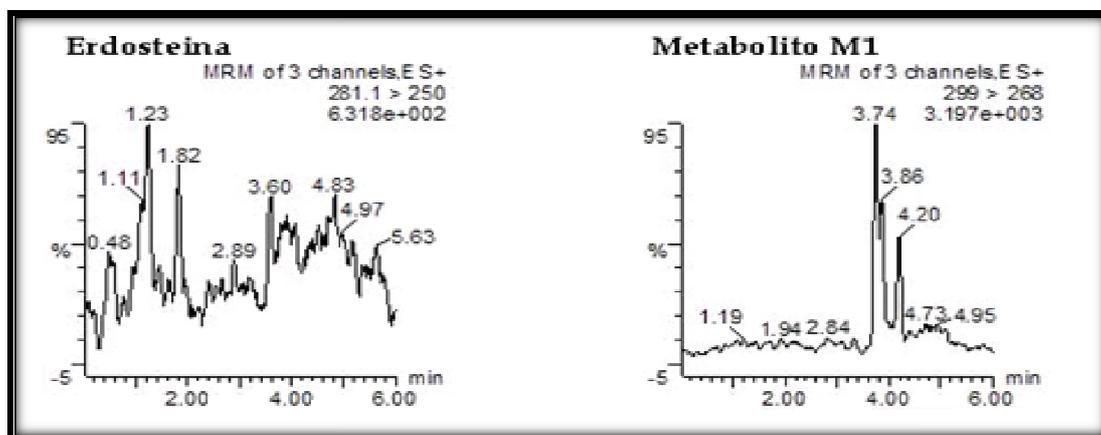


Figura 18. Cromatogramas representativos de blanco de plasma.

### 5.4.8.2 Fármacos de uso común

A continuación se muestran los cromatogramas de las muestras de plasma a las que se les adicionó Cafeína, Acido salicílico, Acetaminofén y Naproxeno sódico (*figuras 19-22*). En estas figuras se puede apreciar que no hay interferencias en el tiempo de retención de la Erdosteina y Metabolito M1.

La selección de dichos fármacos para ser evaluados durante la selectividad se debió a que, en el caso de que alguno de los voluntarios presente algún malestar durante el estudio de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia, estos son los fármacos comúnmente utilizados e incluso suelen ser consumidos diariamente (Cafeína).

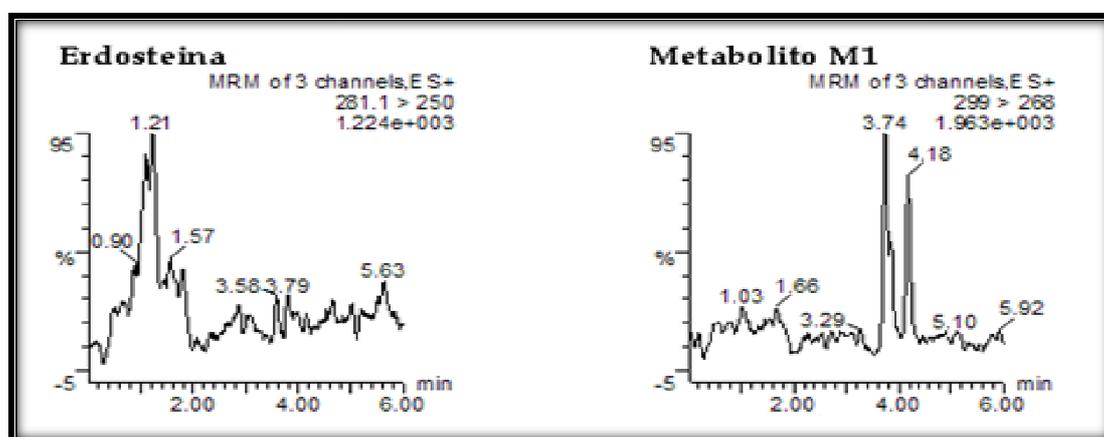


Figura 19. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Cafeína

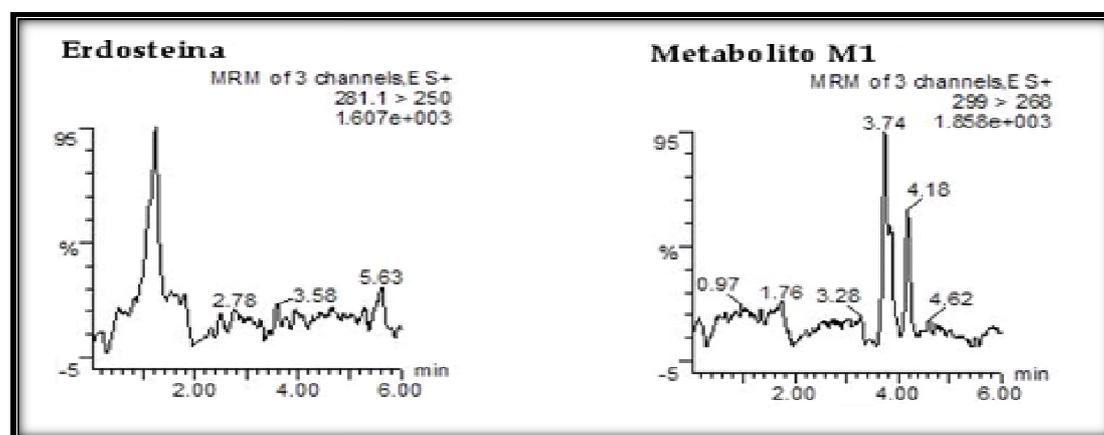


Figura 20. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Ácido Salicílico

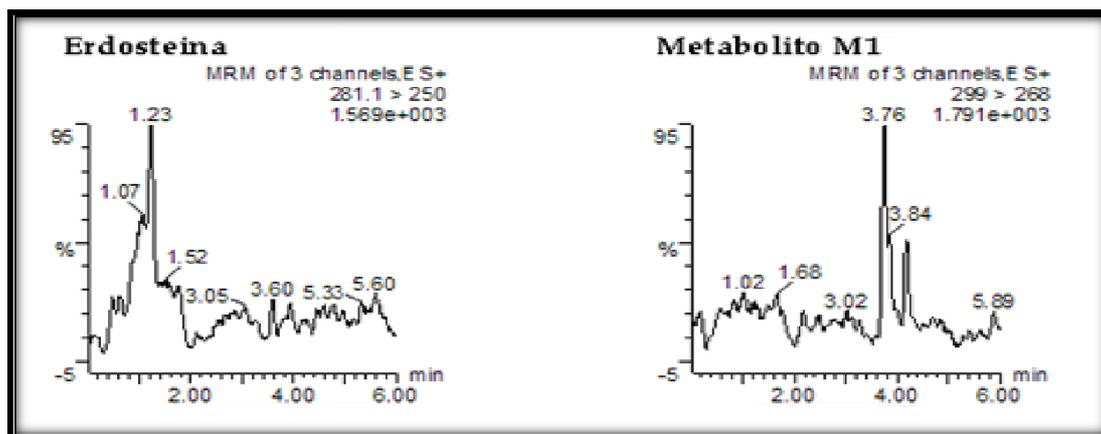


Figura 21. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Acetaminofén

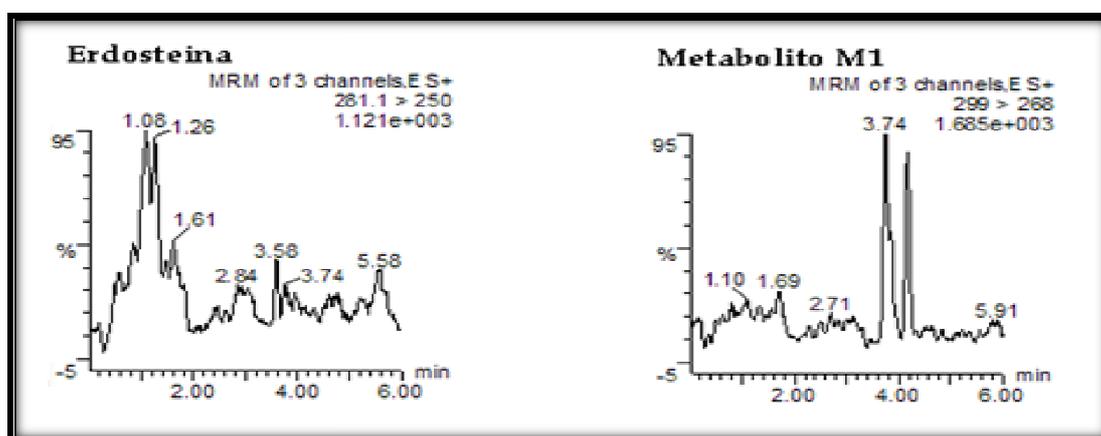


Figura 22. Cromatogramas de la muestra de plasma a la que se le adicionó Naproxeno Sódico

De los resultados anteriores podemos afirmar que el método es selectivo para la cuantificación de los analitos de interés.

#### 5.4.9 Tolerancia

##### 5.4.9.1 Tolerancia a plasma hemolizado y lipídico

Los resultados de la evaluación de la tolerancia del método para Erdosteina se presentan en las *tablas 32 y 33*, mientras que las *tablas 34 y 35* presentan los resultados para el Metabolito M1. Para ambos casos, se mostró que el método es tolerante a muestras lipídicas y hemolizadas ya que las diferencias de las concentraciones cuantificadas

respecto a las concentraciones nominales no son mayores al 15.0%, así como tampoco lo es el coeficiente de variación.

Lo anterior permite afirmar que las muestras que presenten lipidemia y/o hemólisis no presentarán dificultad al ser analizadas durante estudios de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia.

*Tabla 32. Tolerancia de Erdosteina en muestras de plasma lipidémico.*

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina(ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina lipidémicas (ng/mL)		
	123.37	369.21	2174.89
	123.59	386.26	2373.22
	116.63	398.32	2516.61
	122.48	430.28	2504.51
	132.37	426.83	2316.06
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	123.69	402.18	2377.06
<b>D.E.</b>	5.63	26.23	141.71
<b>C.V.%</b>	4.55	6.52	5.96
<b>% Diferencia</b>	1.05	0.55	4.92

*Tabla 33. Tolerancia de Erdosteina en muestras de plasma hemolizado.*

	Concentración nominal de las muestras de Erdosteina(ng/mL)		
	125.0	400.0	2500.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Erdosteina hemolizadas (ng/mL)		
	128.36	398.77	2354.54
	141.49	369.59	2585.56
	141.87	379.84	2418.66
	121.05	383.89	2397.00
	142.88	397.42	2228.99
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	135.13	385.90	2396.96
<b>D.E.</b>	9.87	12.30	128.51
<b>C.V.%</b>	7.31	3.19	5.36
<b>%Diferencia</b>	8.10	3.53	4.12

Tabla 34. Tolerancia del Metabolito M1 en muestras de plasma lipídico.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito M1 lipídicas (ng/mL)		
	614.11	2250.71	11663.31
	615.73	2457.33	12928.81
	595.71	2485.09	13510.21
	639.58	2711.56	13624.56
	661.31	2524.07	12458.57
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	625.29	2485.75	12837.09
<b>D.E.</b>	25.47	164.70	806.64
<b>C.V.%</b>	4.07	6.63	6.28
<b>% Diferencia</b>	4.21	0.57	6.98

Tabla 35. Tolerancia del Metabolito M1 en muestras de plasma hemolizado.

	Concentración nominal de las muestras de Metabolito M1 (ng/mL)		
	600.0	2500.0	12000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de Metabolito M1 hemolizadas (ng/mL)		
	630.48	2472.18	12843.87
	654.57	2236.96	13675.00
	664.13	2385.27	13021.82
	643.67	2360.48	12868.76
	670.62	2561.69	12004.96
<b>n</b>	5	5	5
<b>Promedio</b>	652.70	2403.32	12882.88
<b>D.E.</b>	16.05	122.13	595.65
<b>C.V.</b>	2.46	5.08	4.62
<b>% Diferencia</b>	8.78	3.87	7.36

#### 5.4.10 Acarreamiento

La figura 23 corresponde al cromatograma obtenido de la inyección de una fase móvil. En ella se puede apreciar que no se presenta ninguna señal cromatográfica a los tiempos de retención de Erdosteina o del Metabolito M1, lo que sugiere que el método no es propenso a presentar acarreamiento.

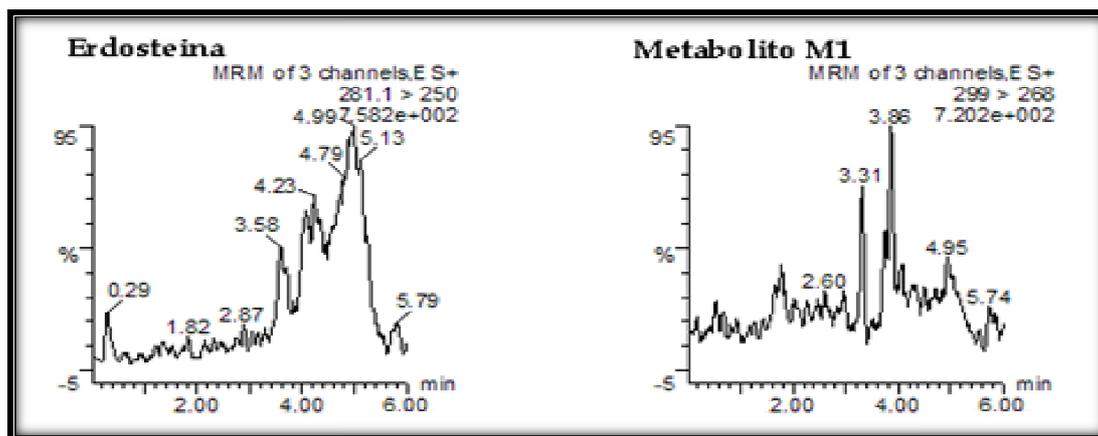


Figura 23. Cromatograma correspondiente a la inyección de una fase móvil.

### 5.5 Aplicación del método al análisis de muestras plasmáticas de 10 sujetos

El método validado se empleó en un estudio piloto con 10 voluntarios sanos. Al analizar las muestras se encontró que el método fue selectivo ya que no se presentó ninguna interferencia a los tiempos de retención de los analitos de interés ni del estándar interno. La *tabla 36* y *37* muestran las concentraciones de Erdosteina y Metabolito M1 para cada sujeto después de la administración del fármaco. Los resultados obtenidos para Erdosteina a los tiempos de muestreo de 6, 8 y 10 horas fueron omitidos de la tabla correspondiente debido a que presentaban valores por debajo del límite de cuantificación, lo mismo que aquellas muestras con la acotación correspondiente. La *tabla 38* corresponde a los promedios de las concentraciones obtenidas para cada analito. Debido a que al tiempo de muestreo de 5 horas sólo se detectó una muestra de Erdosteina, este fue el valor que se colocó en la tabla de promedios. Por otra parte, se muestran las gráficas promedio de concentración plasmática vs tiempo de los 10 voluntarios (*figuras 24* y *25*).

Los parámetros farmacocinéticos individuales se obtuvieron utilizando el modelo no compartimental del programa WinNonLin 4.0 (*tablas 39* y *40*). Estos resultados demuestran que los tiempos de muestreo seleccionados permiten caracterizar la farmacocinética de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano.

Tabla 36. Concentraciones cuantificadas de Erdosteina en plasma después de la administración de una dosis oral única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.

\*Muestras por debajo del límite de cuantificación.

Tiempo de muestreo (h)	Concentración plasmática de Erdosteina (ng/mL)									
	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3	Sujeto 4	Sujeto 5	Sujeto 6	Sujeto 7	Sujeto 8	Sujeto 9	Sujeto 10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	170.60	297.22	120.42	221.19	130.32	199.95	26.60	339.32	72.44	87.49
0.5	411.47	790.99	374.64	349.34	359.61	419.94	315.33	381.72	330.47	372.52
0.75	625.60	673.36	351.12	236.42	306.55	435.03	600.89	401.69	277.17	453.65
1	540.72	557.59	302.86	223.22	244.79	293.99	523.97	270.91	200.16	459.22
1.25	462.44	633.10	254.15	222.16	223.17	162.90	319.77	241.97	227.02	350.35
1.5	351.63	408.78	230.87	230.45	163.27	133.55	261.88	175.08	153.77	265.16
1.75	251.07	292.93	238.37	201.02	139.23	107.10	163.31	152.41	146.45	214.14
2	208.93	239.30	194.72	168.39	86.67	81.50	158.53	173.75	119.75	225.46
2.5	176.93	162.07	148.28	136.17	72.52	77.02	87.62	125.34	97.30	138.86
3	136.79	132.51	87.58	75.57	74.76	53.26	78.73	76.67	79.83	133.86
4	75.73	112.97	*	*	*	*	51.36	*	60.84	80.79
5	*	52.83	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabla 37. Concentraciones cuantificadas del Metabolito M1 en plasma después de la administración de una dosis oral única de 300 mg a 10 voluntarios sanos.

\*Muestras por debajo del límite de cuantificación.

Tiempo de muestreo (h)	Concentración plasmática de Metabolito M1 (ng/mL)									
	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3	Sujeto 4	Sujeto 5	Sujeto 6	Sujeto 7	Sujeto 8	Sujeto 9	Sujeto 10
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	316.09	*	358.89	*	193.49	*	*	*	*	*
0.5	1274.17	603.83	991.68	594.81	831.69	648.51	405.54	785.91	708.01	517.91
0.75	1731.33	981.74	1192.19	974.43	1047.46	1129.68	986.30	1161.28	1289.50	1035.25
1	1924.84	1169.78	1259.27	1314.12	1252.75	1160.74	1257.24	1586.40	1655.90	1373.13
1.25	2684.84	1432.16	1358.18	1454.96	1523.46	1203.92	1221.77	1735.53	1818.67	1647.59
1.5	2656.46	1433.74	1393.53	1523.49	1482.73	1297.53	1427.89	1814.26	1706.57	1836.60
1.75	2427.34	1364.01	1611.90	1378.16	1568.94	1350.77	1300.55	1726.57	1625.42	1569.53
2	2527.13	1304.83	1707.41	1490.63	1268.36	1361.37	1415.23	1739.40	1531.39	1641.52
2.5	2298.10	1455.41	1573.56	1414.44	1357.60	1210.45	1167.33	1798.59	1424.38	1533.62
3	2249.15	1484.56	1346.99	1264.29	1243.71	1167.19	1234.23	1795.31	1249.98	1459.20
4	1849.64	1216.91	1081.50	1291.91	1107.01	1070.33	1051.56	1765.01	1173.20	1205.95
5	1499.27	909.51	884.61	1192.51	1033.04	833.05	924.95	1380.24	807.36	1051.99
6	1187.74	672.47	698.91	935.70	759.42	942.27	850.48	1053.22	701.18	851.25
8	783.17	441.26	493.92	643.30	483.51	391.41	520.98	616.90	429.03	495.75
10	*	357.46	374.73	427.67	331.65	307.53	356.88	422.67	299.48	357.48

Tabla 38. Concentraciones promedio de Erdosteina y Metabolito M1.  
\*Muestras por debajo del límite de cuantificación.

Tiempo de muestreo (h)	Concentración promedio Erdosteina (ng/mL)	D. E.	Concentración promedio Metabolito M1 (ng/mL)	D. E.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	166.56	99.54	289.49	85.85
0.5	410.60	137.52	736.21	251.50
0.75	436.15	152.75	1152.92	228.34
1	361.74	142.01	1395.42	248.48
1.25	309.70	141.77	1608.11	429.26
1.5	237.44	88.84	1657.28	395.46
1.75	190.60	58.53	1592.32	326.48
2	165.70	55.04	1598.73	364.71
2.5	122.21	36.63	1523.35	326.09
3	92.96	29.88	1449.46	335.55
4	76.34	23.59	1281.30	287.94
5	52.83	---	1051.65	235.74
6	*	*	865.26	167.86
8	*	*	529.92	118.55
10	*	*	359.51	44.67

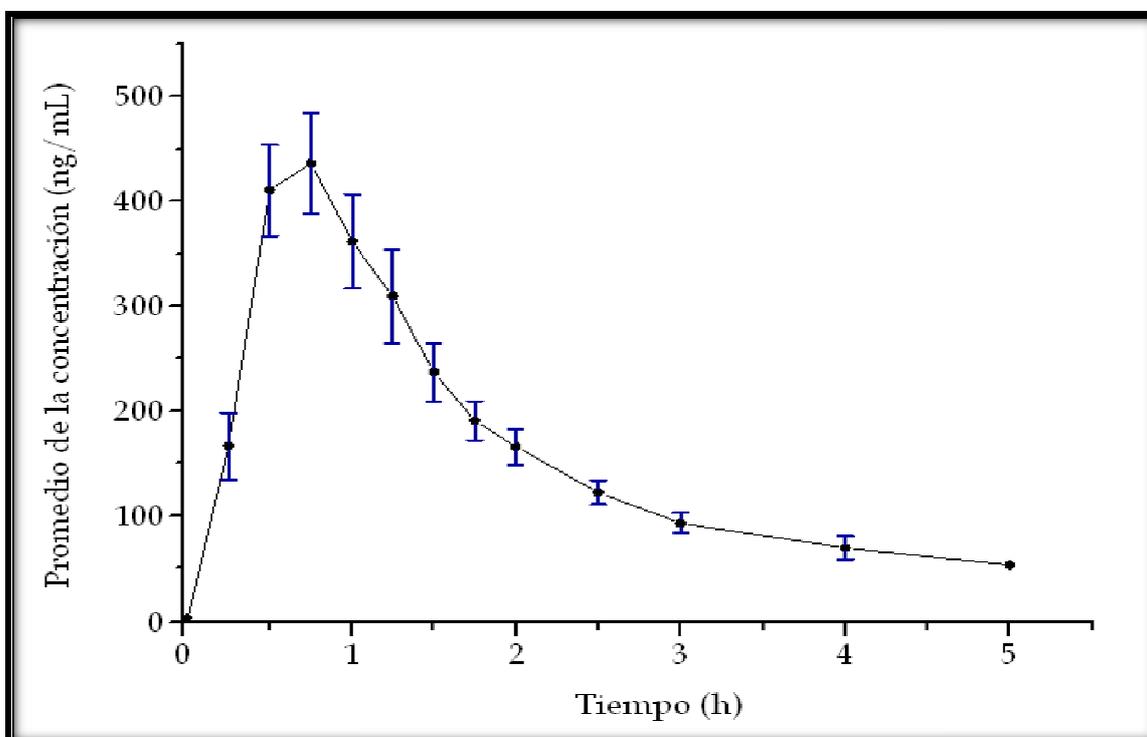


Figura 24. Concentración plasmática promedio de Erdosteina vs tiempo ( $\pm ee$ ) después de la administración de una dosis única de 300mg a 10 voluntarios sanos.

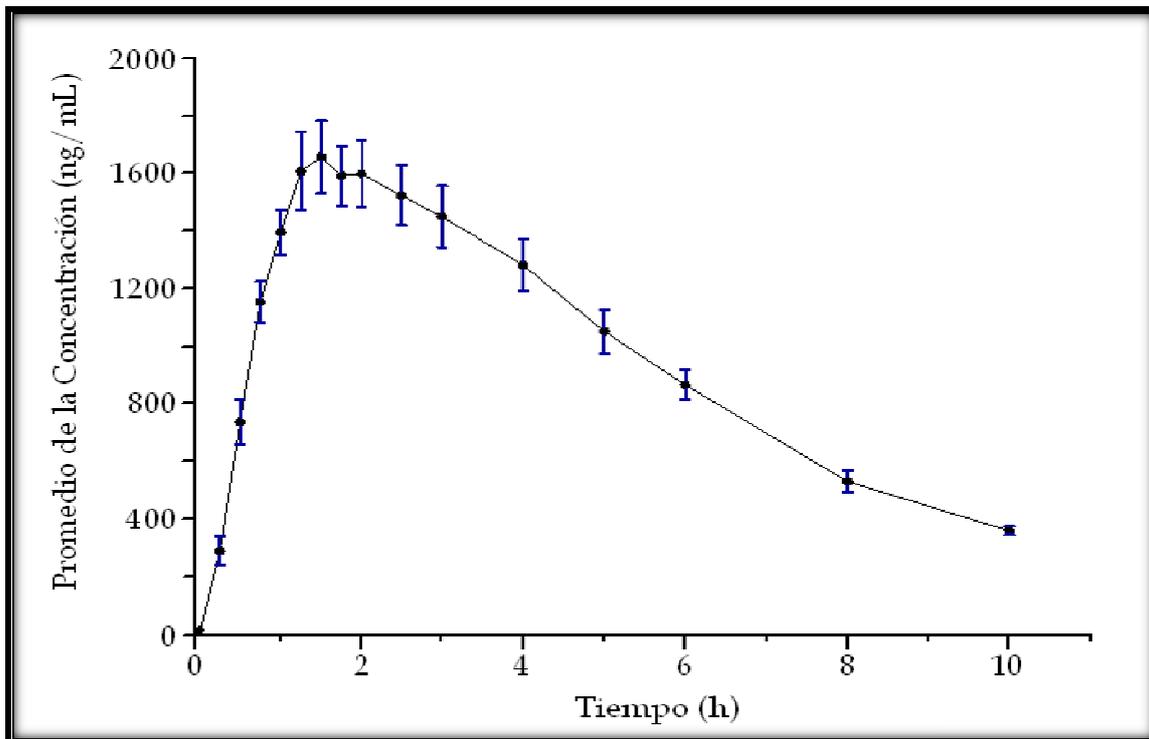


Figura 25. Concentración plasmática promedio de Metabolito M1 vs tiempo ( $\pm ee$ ) después de la administración de una dosis única de 300mg a 10 voluntarios sanos.

Tabla 39. Parámetros farmacocinéticos de Erdosteina.

Sujeto	Vida media (h)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$ABC_{0-t}$ (ng.h/mL)	$ABC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)
1	1.94	0.75	625.60	1010.65	1128.59
2	1.93	0.50	790.99	1323.03	1411.58
3	2.03	0.50	374.64	637.16	792.84
4	2.15	0.50	349.34	571.07	730.93
5	1.78	0.50	359.61	479.19	584.96
6	1.09	0.75	435.03	520.50	591.15
7	1.72	0.75	600.89	773.69	842.41
8	1.81	0.75	401.69	637.77	771.06
9	2.56	0.50	330.47	535.72	674.36
10	2.31	1.00	459.22	845.40	1006.10
<b>Promedio</b>	1.83	0.65	472.75	733.42	853.40
<b>D.E.</b>	0.67	0.17	151.15	265.10	260.14

Tabla 40. Parámetros farmacocinéticos del Metabolito M1.

Sujeto	Vida media (h)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$ABC_{0-t}$ (ng.h/mL)	$ABC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)
1	5.95	1.25	2684.84	12951.04	17173.35
2	6.15	3.00	1484.56	8527.34	10467.65
3	6.02	2.00	1707.41	8855.76	10812.87
4	7.30	1.50	1523.49	9701.01	12671.60
5	6.08	1.75	1568.94	8695.79	10543.13
6	5.88	2.00	1361.37	8177.12	9759.00
7	6.81	1.50	1427.89	8391.63	10643.31
8	6.04	1.50	1814.26	11580.33	13912.87
9	5.39	1.25	1818.67	8703.34	10144.11
10	5.92	1.50	1836.60	9420.32	11301.99
<b>Promedio</b>	6.15	1.73	1722.80	9500.37	11742.99
<b>D.E.</b>	0.53	0.52	379.18	1560.10	2282.47

Los resultados obtenidos en este estudio no coinciden con los reportados por otros autores ya que estos últimos son casi 5 veces mayores. Esta diferencia puede deberse a que en los estudios reportados se administró una dosis triple de 300 mg para un final de 900 mg de fármaco, mientras que en el presente estudio se administró una dosis única de 300 mg de Erdosteina.

Otro aspecto que pudo conducir a la diferencia en los resultados es el uso de un agente reductor durante el procesamiento de la muestra. En el trabajo realizado por Kim H. <sup>(16)</sup> no se menciona el uso de un agente reductor, mismo que si es utilizado en los trabajos de Sawuta W. <sup>(17)</sup> y Savu S. <sup>(15)</sup>, así como en el presentado en este trabajo.

El comportamiento observado para el Metabolito M1 es similar al reportado por Savu S. <sup>(15)</sup>, ya que se encontraron concentraciones medibles después de las 10 horas de administración y un  $ABC_{0-\infty}$  mayor que la obtenida para Erdosteina.

CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Se validó un método analítico para la cuantificación de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector masas/masas.

El método demostró ser selectivo, lineal, preciso y exacto dentro de un rango de 50 a 3000 ng/mL de Erdosteina y de 200 a 15000 ng/mL de Metabolito M1, además de obtener una recuperación aceptable y constante. El límite de cuantificación fue de 50.0 ng/mL para Erdosteina y de 200.0 ng/mL para el Metabolito M1.

Las muestras de plasma conteniendo Erdosteina y Metabolito M1 demostraron ser estables durante periodos largos de almacenamiento en congelación (38 días). Una vez descongeladas, las muestras son estables por lo menos 8 horas cuando se mantienen a temperatura ambiente y durante 48 horas cuando son procesadas y almacenan en el automuestrador. Sólo se demostró estabilidad de las muestras a un ciclo de congelación-descongelación.

El método propuesto resultó ser tolerante a muestras lipídicas y hemolizadas, además de ser apropiado para el análisis de muestras plasmáticas de voluntarios sanos después de una dosis oral única de 300 mg del principio activo.

Debido a esto, se concluye que el método puede emplearse para la cuantificación de Erdosteina y Metabolito M1 en plasma humano en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y/o bioequivalencia.

# [ BIBLIOGRAFÍA ]

## BIBLIOGRAFÍA

1. Oquendo Montes J. F., Martínez Sardiñas A., Acosta Hernández Z. **Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Consideraciones anestésicas.** *Sociedad cubana de Anestesiología y Reanimación.* 2007; 6(1); 80-96
2. Organización mundial de la salud. **Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).** 2009. Versión en línea disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/es/index.html>
3. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). **Clínica de EPOC.** 2008. [http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/Clinica\\_de\\_EPOC.html](http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/Clinica_de_EPOC.html)
4. National Electronic Library for Medicines. **Erdosteine.** *New Medicines Profile* 2007; 7(5). Versión en línea disponible en <http://www.nelm.nhs.uk/en/NeLM-Area/Evidence/Drug-Specific-Reviews/Erdosteine-Erdotin/?query=erdosteine&rank=62>
5. Dechant K., Noble S. **Erdosteine.** *Drugs* 1996; 56(6); 875-881
6. Braga P. C., Dal Sasso M., Sala M. T., Granelle V. **Effects of erdosteine and its metabolites on bacterial adhesiveness.** *Azneimittel-Forschung Drug research* 1999; 49(4); 344-350
7. Braga P. C., Dal Sasso M., Verducci P., Lo verso R., Marabini L. **Effect of metabolite I of erdosteine on the release of human neutrophil elastase.** *Pharmacology* 2006; 77; 150-154
8. Dal Sasso M., Culici M., Bianchi T., Fonti E., Braga P. C. **Inhibitory effects of metabolite I of erdosteine on the generation of nitric oxide and peroxynitrite chemiluminescence by human neutrophils.** *Pharmacology* 2004; 71; 120-127
9. Ricevuti G., Mazzone A., Uccelle E., Gazzani G., Fregnan G. **Influence of erdosteine, a mucolytic agent, on amoxicillin penetration into sputum in patients with an infective exacerbation of chronic bronchitis.** *Thorax* 1988; 43; 585-590
10. Cuevas Schacht F., González Enriquez H. **Erdosteina como agente mucorregulador.** *Neumología y cirugía de tórax* 2004; 63(2); 102-109

11. Marumatsu N., Toyo'oka T., Yamaguchi K., Kobayashi S. **High-performance liquid chromatographic determination of erdosteine and its optical active metabolite utilizing a fluorescent chiral tagging reagent, R-(2)-4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole.** *Journal of chromatography B* 1998; (719); 177-189
12. Vademécum Farmacéutico IPE. Multicolor, 16° edición 2008 p716.
13. Savu S., Mitrea M., Silvestro L., Mancini C. **HPLC with on-line mass spectrometry detection application to elucidate erdosteine metabolism: preliminary study.** *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 2000; 38(8); 415-417
14. Kim H., Young Chang K., Lee H. J., Beom Han S., Ryul Lee K. **Sensitive determination of erdosteine in human plasma by use of automated 96-well solid-phase extraction and LC-MS/MS.** *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2004; 34; 661-669
15. Sawuta W., Banecka-Majkutewicz Z., Kadzinski L., Jakóbkiewicz-Banecka J., Wegrzyn G., Nyka W., Banecki B. **Improved HPLC method for total plasma homocysteine detection and quantification.** *Acta biochimica polonica* 2008; 55(1); 119-125
16. Yuan L.S., Young R.C., Ji H.J., Ji S.K. Uy D.S. **Bioequivalence study of two Erdosteine preparations commercially available in Korea.** *Korean Journal of Clinical Pharmacy* 2007; 17 (2); 117-122
17. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSAI-1998, **Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.** *Diario Oficial de la Federación*, 7 de mayo de 1999
18. Chow Chan C., Lee Y.C., Lam H. **Analytical method validation and instrument performance verification.** *John Wiley & Sons Inc. E.U.A* 2004 p105-108
19. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R.D. **Validation of bioanalytical chromatographic methods.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 17 (2); 193-218
20. Shah V. P. **The history of bioanalytical method validation and regulation: evolution of a guidance document and bioanalytical method validation.** *The American Association of Pharmaceutical Scientist* 2007; 9(1); 43-47

21. Shah V. p., Midha K. K., Finflay J., Hill H. M., Hulse James., McGilveray I., McKay G., Miller K., Patnaik R., Powell M., Tonelli A., Viswanathan C., Yacobi A. **Bioanalytical method validation. A revisit with a decade of progress.** *Pharmaceutical research* 2000; 17(12); 1551-1557
22. Fernandez Lainez C., Vela Amieva M., Ibarra Gonzales I. **Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolónica en pediatría.** *Acta pediátrica* 2009; 30(5); 258-263
23. Matern D., Magera M. J. **Mass Spectrometry Methods for Metabolic and Health Assessment.** *The journal of nutrition.* 2001; 131; 1615s-1620s
24. Chace D. H., Kalas T. A. **A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing.** *Clinical biochemistry* 2005; 38 (4); 296-309
25. Corral Payá A. **Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas.** *Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia* 2006. Versión en línea disponible en <http://mural.uv.es/calooan/>
26. Jessica Gilman J., Mashburn C. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry** 2002. [http://www.colorado.edu/chemistry/chem5181/MS\\_ESI\\_Gilman\\_Mashburn.pdf](http://www.colorado.edu/chemistry/chem5181/MS_ESI_Gilman_Mashburn.pdf)
27. Plascencia Villa G. **Maestría en Ciencias Bioquímicas, Curso de métodos: espectrometría de masas.** *Instituto de Biotecnología, UNAM* 2003. Versión en línea disponible en [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec\\_Masas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf)
28. An introduction to Mass Spectrometry  
<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>
29. Scripps Center for Mass Spectrometry  
[http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms\\_toc.php](http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_toc.php)
30. Joel Mass spectrometers, Essays and tutorials. **Tándem mass spectrometry (MS/MS).**  
[http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?TabId=337&Command=Core\\_Download&EntryId=78&PortalId=2&TabId=337](http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?TabId=337&Command=Core_Download&EntryId=78&PortalId=2&TabId=337)
31. Wen J., Wu Y., Zhang L., Qi Y., Fan G. **High-throughput determination of fudosteine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, following protein precipitation in the 96-well plate format.** *Journal of Chromatography B* 2008; 867 (1); 153-159

32. Peste G., Bibire N., Apostu M., Vlase A., Oniscu C. **A New Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Bisoprolol in Human Plasma Samples.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2009; 2009
33. Wang H., Zhou H., Horimoto S., Jiang J., Mayumi T., Hu P. **Quantitative determination of trimebutine maleate and its three metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 2002; 779 (2); 173–187