



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
METOCLOPRAMIDA EN ORINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL ZARCO ALMAZÁN



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	Dra. Inés Fuentes Noriega.
Vocal	M en C. Sofia Margarita Rodríguez Alvarado.
Secretario	M en F. Luis Jesús García Aguirre.
1er. Suplente	Profesor. Lauro Misael del Rivero Ramírez.
2do. Suplente	M en C. María de Lourdes Mayet Cruz

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

UNAM, Edificio E, Laboratorios 112-113.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Inés Fuentes Noriega.

SUSTENTANTE

Miguel Ángel Zarco Almazán.

DEDICATORIA

A mi madre. Lilia C. Almazán Chávez.

A mi hija Bianca Zarco Morales.

A mi ahijado Arthur Astorga Almazán.

A Brenda A. Morales Martínez

A mis hermanos. Francisco Zarco Almazán y Lilia Nayeli Astorga Almazán.

A mi primo hermano. Alejandro Echevarria Zarco.

A mi tío Manuel Zarco García.

En memoria de mi padre, abuelo y tía. Patricio M. Zarco García, Matías Zarco Urrutia

Y

Catalina Zarco García.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su apoyo y comprensión.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme educación, desarrollo, cultura y conocimiento en mi carrera para ser hombre de bien.

A la Facultad de Química por las experiencias que me dio.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por su apoyo, paciencia, tiempo y comprensión.
Mi respeto, aprecio, admiración y gratitud.

A los proyectos PAPYME PE201807 para la realización de este trabajo.

A la M en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado por la revisión de este trabajo y consejos para este trabajo.

A la Dra. Helgi Helen Jung Cook por brindarme la oportunidad de desarrollar habilidades en el uso de instrumentos de análisis, en especial el equipo de CLAR.
Mi respeto, admiración y gratitud.

Al M en F. Luis Jesús García Aguirre por la revisión de este trabajo y sus consejos.

A todos los profesores que me enseñaron y dedicaron tiempo para aprender de su conocimiento a lo largo de mi carrera.

A la Q.F.B. Brenda A Morales Martínez por su confianza en mí.

A todos mis compañeros de la facultad de química.

A mis amigos Arie, Beto y Carlos por confiar en mí.

*AFRONTAR CON VALOR Y DIGNIDAD LAS
ADVERSIDADES QUE SE PRESENTEN EN LA VIDA.*

PERSEVERAR HASTA ALCANZAR LA METAS.

¡MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!

¡HASTA LA VICTORIA SIEMPRE!

ÍNDICE	página
Lista de figuras	4
Lista de tablas.....	5
Símbolos y abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. GENERALIDADES.....	11
2.1 Monografía del clorhidrato de metoclopramida.....	11
2.1.1 Formula estructural.....	11
2.1.2 Formula condensada.....	11
2.1.3 Nombre químico.....	11
2.1.4 Descripción.....	11
2.1.5 Efectos farmacológicos.....	11
2.1.6 Usos y aplicación farmacológica.....	11
2.1.7 Farmacocinética.....	12
2.1.8 Farmacodinamia.....	12
2.1.9 Precauciones de uso.....	12
2.1.10 Contraindicaciones.....	13
2.1.11 Reacciones secundarias y adversas.....	13
2.1.12 Interacciones medicamentosas.....	13
2.1.13 Vías de administración y dosis.....	13
2.1.14 Formas farmacéuticas del clorhidrato de metoclopramida.....	13
2.1.15 Espectrofotometría UV- VIS (Absorción por los compuestos orgánicos).....	14

2.1.16 Definiciones.....	15
2.2 Validación de métodos analíticos.....	16
2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.....	16
2.3.1 Objetivo y campo de aplicación de la NOM-177-SSA1-1998.....	16
2.3.2 Punto 9 de la NOM-177-SSA1-1998. Requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia.....	16
2.3.2.1 Numerales del punto 9 de la NOM-177-SSA1-1998.....	16
3 OBJETIVOS.....	22
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.1 Desarrollo del método analítico.....	23
4.2 Material, equipos y reactivos.....	23
4.3 Preparación y tratamiento de la orina para la validación del método analítico.....	24
4.3.1 Preparación de las soluciones para la validación del método.....	25
4.4 Validación del método.....	26
4.5 Linealidad del método.....	26
4.5.1 Curvas de calibración.....	27
4.6 Selectividad del método.....	27
4.7 Recuperación absoluta.....	28
4.8 Precisión del método.....	28
4.8.1 Repetibilidad.....	28
4.8.2 Reproducibilidad intralaboratorio.....	28
4.9 Exactitud.....	29
4.10 Límite de cuantificación.....	30
4.11 Estabilidad.....	30

4.11.1 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, en refrigeración a 3° C durante 48 Y 72 h.....	30
4.11.2 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, ciclos de congelación – descongelación a -19°C.....	31
4.11.3 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, en congelación a -19°C por 28 días.....	32
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	34
5.1 Validación del método analítico.....	34
5.1.1 Linealidad del método.....	34
5.1.2 Selectividad del método.....	36
5.1.3 Recuperación absoluta.....	39
5.1.4 Precisión del método.....	40
5.1.4.1 Repetibilidad.....	41
5.1.4.2 Reproducibilidad intralaboratorio.....	42
5.1.5. Exactitud del método.....	48
5.1.6 Límite de cuantificación.....	51
5.1.7 Estabilidad.....	53
5.1.7.1 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, en refrigeración a 3° C durante 48 Y 72 h.....	53
5.1.7.2 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, en ciclos de congelación–descongelación a -19°C.....	58
5.1.7.3 Estabilidad del clorhidrato de metoclopramida en orina, en congelación a -19°C por 28 días.....	64
6. Conclusiones.....	71
7. Anexos.....	72
8. Bibliografía.....	74

LISTA DE FIGURAS	paginas
Figura 1. Estructura molecular del clorhidrato de metoclopramida.....	11
Figura 2. Gráficas 1, 2 y 3 de las curvas de calibración de MCP · HCl en orina. Linealidad del método.....	34
Figura 3. Gráfica de la curva de calibración promedio. Linealidad del método.....	35
Figura 4. Espectro de barrido de la orina.....	36
Figura 5. Espectro de absorción obtenido del barrido de MCP · HCl en orina, en concentración de 1.0 µg/mL.....	37
Figura 6. Longitudes de onda de máxima absorción y absorbancias obtenidas del espectro de barrido del MCP · HCl en orina en concentración de 1.0 µg/mL.....	37
Figura 7. Espectro de absorción obtenido del barrido de MCP · HCl en orina, en concentración de 5.0 µg/mL.....	38
Figura 8. Gráfica de la curva de calibración. Repetibilidad.....	40
Figura 9. Gráfica de la curva de calibración. Reproducibilidad intralaboratorio día 1...	42
Figura 10. Gráfica de la curva de calibración. Reproducibilidad intralaboratorio día 2...	44
Figura 11. Gráfica de la curva de calibración. Reproducibilidad intralaboratorio día 3...	46
Figura 12. Gráfica de la curva de calibración. Límite de cuantificación.....	51
Figura 13. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad del MPC · HCl en orina, refrigeración a 3° C durante 48 y 72 h.....	53
Figura 14. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad del MPC · HCl en orina, ciclos de congelación-descongelación.....	58
Figura 15. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad del MPC · HCl en orina, congelación a 28 días.....	64

LISTA DE TABLAS

paginas

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración estándar a partir de la solución primaria S1 para la validación del método.....	27
Tabla 2. Resultados de las tres curvas de calibración para determinación de la linealidad del método a partir de las absorbancias.....	34
Tabla 3. Promedio de las absorbancias de las tres curvas de calibración para la determinación de la linealidad del método.....	35
Tabla 4. Resultados de los espectros de barrido del MCP · HCl en orina a tres niveles de concentración por triplicado. Longitudes de onda de máxima absorción y absorbancias.....	36
Tabla 5. Absorbancias del MCP · HCl en agua a tres niveles de concentración dentro del rango por triplicado.....	39
Tabla 6. Absorbancias del MCP · HCl en orina a tres niveles de concentración dentro del rango por triplicado.....	39
Tabla 7. Resultados. Recuperación absoluta.....	39
Tabla 8. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de repetibilidad del método.....	40
Tabla 9. Absorbancias de la curva de calibración y concentraciones experimentales de los puntos de control.....	41
Tabla 10. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para el día 1.....	42
Tabla 11. Concentraciones experimentales de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 1.....	43
Tabla 12. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 2.....	44
Tabla 13. Concentraciones experimentales de los puntos control del MCP · HCl en orina. Reproducibilidad intralaboratorio día 2.....	45
Tabla 14. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 3.....	46
Tabla 15. Concentraciones experimentales de los puntos control del MCP · HCl en orina reproducibilidad intralaboratorio día 3.....	47

Tabla 16. Resultados del % CV los días 1, 2 y 3. Reproducibilidad intralaboratorio.....	47
Tabla 17. Concentraciones experimentales de las curvas de calibración de precisión (repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio) para determinación de la exactitud del método.....	48
Tabla 18. Concentraciones experimentales de los puntos de control de precisión para determinación de la exactitud del método.....	49
Tabla 19. Valores de la concentración experimental promedio de los puntos control de las pruebas de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) con resultados de % DEA.....	50
Tabla 20. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de límite de cuantificación.....	51
Tabla 21. Resultados de la concentración experimental. Límite de cuantificación.....	52
Tabla 22. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3° C durante 48 y 72 h.....	53
Tabla 23. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3°C tiempo cero.....	54
Tabla 24. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3°C durante 48 h.....	55
Tabla 25. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3 °C durante 72 h.....	56
Tabla 26. Resultados de % CV y % DEA para determinación de estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3° C para los tiempos T0, 48 y 72 h.....	57
Tabla 27. Curva de calibración para determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación-descongelación.....	58
Tabla 28. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación. Tiempo cero.....	59
Tabla 29. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad MCP · HCl en orina.	

Ciclos de congelación- descongelación, primer ciclo.....	60
Tabla 30. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación, segundo ciclo.....	61
Tabla 31. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación, tercer ciclo.....	62
Tabla 32. Resultados del promedio de % CV y % DEA para determinación de estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación-descongelación.....	63
Tabla 33. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de la estabilidad del MPC · HCl en orina. Congelación durante 28 días.....	64
Tabla 34. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, tiempo cero.....	65
Tabla 35. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 1.....	66
Tabla 36. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 2.....	67
Tabla 37. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 3.....	68
Tabla 38. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 4.....	69
Tabla 39. Promedio de las absorbancias de los puntos control de las cuatro semanas y la concentración experimental de cada semana de los 28 días de congelación a -19° C del MCP · HCl en orina con cálculo del % DEA y % CV de las cinco series.....	70

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
b	Intercepto o intercepción al eje
% CV	Coefficiente de variación expresado en porcentaje
DE	Desviación estándar
% DEA	Desviación estándar absoluta expresada en porcentaje
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Fr	Factor de respuesta
g	Gramo
h	Hora
λ	Longitud de onda
\pm	Mas, menos
m	pendiente
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
min	Minutos
mL	Mililitros
MCP · HCl	Clorhidrato de metoclopramida
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
%	Porcentaje
PROM	Promedio
PLM	Diccionario de Especialidades Farmacéuticas
SSA	Secretaria de Salud
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

RESUMEN

La metoclopramida es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de múltiples afecciones gastrointestinales como son el reflujo esofágico, gastroenteritis infecciosa, úlcera gástrica estenosis pilórica entre otras. Se sabe que este fármaco se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral, Un 98 % se elimina vía renal y una mínima cantidad pasa a la bilis, pero el metabolismo hepático de primer paso reduce su biodisponibilidad a cerca de 75 %. Hasta 39 % de la metoclopramida se excreta sin cambios por orina [5], cuando se administra por vía oral y alcanza su máxima concentración plasmática (C_{max}) entre los 45 y 90 minutos, la acción farmacológica de la metoclopramida administrada vía oral inicia de 30 a 60 minutos. Su distribución obedece a un modelo bicompartimental con baja unión a proteínas plasmáticas y amplia difusión tisular preferencial al tracto gastrointestinal, hígado, y vías biliares. Se metaboliza por oxidación de un derivado mono desmetilado, pero la mayor parte se conjuga produciendo glucuronidos y sulfatos. El aclaramiento renal depende de la dosis administrada. La mayor parte del fármaco se elimina dentro de las primeras 6 horas. [12], la vida media del fármaco en la circulación es de cuatro a seis horas, pero puede ser de hasta 24 h en pacientes con trastorno en la función renal. [5]. Con base en estas características se ha considerado que este fármaco podría ser útil para ser evaluado y aplicado en el laboratorio de biofarmacia, como práctica ya que en algunas universidades (o centros educativos) no se cuenta con aparatos modernos y caros de análisis como el CLAR, entre otros.

Por lo antes mencionado el objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico sencillo para la cuantificación de metoclopramida en orina. Para lo cual será utilizada la espectrofotometría al UV.

Para llevar a cabo la validación del método analítico se tomaron en consideración algunos de los lineamientos de la NOM 177-SSA1 que aplican en el punto nueve que hace referencia a los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia.

Las pruebas consideradas para la validación del método analítico con respecto a la NOM -177-SSA1-1998 son: Linealidad, selectividad, recuperación absoluta, precisión (repetibilidad, reproducibilidad intralaboratorio) exactitud, límite de cuantificación, y estabilidad.

Las pruebas mencionadas se realizaron a partir de orina proveniente de seis voluntarios que se mezcló, diluyó y se utilizó como muestra de trabajo. Para el proceso de validación de este estudio no se analizaron las muestras de orina de manera individual como lo indica la NOM-177-SSA1-1998 pero si se apega a que se cumpliera con los criterios que indica para cada una de las pruebas mencionadas.

Una vez que el método sea validado, se determinará si es aplicable para su uso por los estudiantes que cursan el laboratorio de biofarmacia.

1. INTRODUCCIÓN

La asignatura del laboratorio de biofarmacia se programa una vez a la semana con cuatro horas de duración, se cubren temas de disolución intrínseca, control farmacéutico, validación de metodología para perfiles de disolución y para determinar biodisponibilidad de un medicamento en fluidos biológicos (orina).

La finalidad de este trabajo es desarrollar un método analítico espectrofotométrico simple para cuantificar clorhidrato de metoclopramida en orina y sea aplicable para su uso por los estudiantes que cursan el laboratorio de biofarmacia.

En estudios de biodisponibilidad un 39% de la metoclopramida se elimina inalterado pero debido a que nuestro compuesto orgánico de estudio presenta absorción al UV por su estructura molecular que contiene grupos cromóforos y por que puede ser una opción para su posible aplicación como práctica de laboratorio de biofarmacia, ya que en algunas universidades (o centros educativos) no se cuenta con aparatos modernos y caros de análisis como el CLAR, entre otros.

Los métodos espectroscópicos moleculares figuran entre los métodos analíticos instrumentales más utilizados. La espectroscopia de absorción molecular en la región UV y visible tiene su principal aplicación en el análisis cuantitativo, y es uno de los métodos preferidos en laboratorios químicos y clínicos, [2] muchos tipos de compuestos orgánicos e inorgánicos absorben radiación directamente en la región UV y VIS.

Las mediciones de absorción en la región UV y VIS del espectro, proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas. La espectrofotometría UV y VISIBLE es una de las herramientas más poderosas y útiles para el análisis cuantitativo. [2]. Las principales características de este método son: su amplia aplicación en sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos; su sensibilidad razonable, sus límites de detección en cuanto a concentración molar son relativamente altos ($1E-4$ a $1E-7$ Molar); su selectividad moderada a alta; su exactitud y precisión razonables (los errores relativos son de 1 a 3% y, con técnicas especiales, pueden reducirse a unas décimas de porcentaje), así como su rapidez y conveniencia. Además que los métodos espectrofotométricos se pueden automatizar fácilmente. [2].

Cuando se desarrollan métodos de análisis nuevos es necesario constatar que el proceso establecido sea lo suficiente fiable y reproducible para producir un resultado previsto dentro de intervalos definidos, para lo cual hay que validar el método.

La validación es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico empleado para una prueba específica es apto para el uso destinado. [14] proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento de análisis, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. Nos ayuda a demostrar con evidencia experimental documentada que el método analítico cumple con el propósito para el cual fue diseñado. Los criterios de validación de métodos analíticos son establecidos por organismos internacionales oficiales.

2. GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFÍA DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA.

2.1.1 FÓRMULA ESTRUCTURAL.

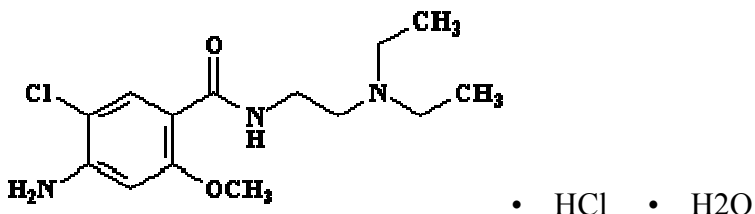


Figura 1. Estructura molecular del clorhidrato de metoclopramida.

2.1.2 FÓRMULA CONDENSADA

C₁₄H₂₂ClN₃O₂·HCl·H₂O

2.1.3 NOMBRE QUÍMICO

Monoclorhidrato de 4-amino-5-cloro-N-[2-(dietil-amino) etil]-*o*-anisamida, monohidrato. [3]

2.1.4 DESCRIPCIÓN

Polvo blanco cristalino o casi blanco, no tiene olor. 1.0 g es soluble en 0.7 mL de agua a 25° C, en 3.0 g de etanol (96 %) y en 55 g de cloroformo, es practicante insoluble en éter. Es soluble en ácido clorhídrico diluido.

Muestra dos constantes de ionización; pKa = 0.42 y pKa = 9.71 [4].

2.1.5 EFECTOS FARMACOLÓGICOS

La metoclopramida produce la mayor parte de sus efectos en el SNC que son característicos del bloqueo dopaminérgico. [5]

2.1.6 USOS Y APLICACIONES FARMACOLÓGICAS

La metoclopramida está indicada para trastornos de la motilidad gastrointestinal, incluyendo reflujo gastroesofágico y gastroparesia diabética (estasis gástrica diabética). Náusea y vómito de origen central y periférico asociados con: cirugía; enfermedades metabólicas o infecciosas; migraña; cefalea o fármacos (incluyendo los de quimioterapia oncológica). Para facilitar la intubación del intestino delgado y estudios radiológicos del tracto gastrointestinal. [12]

2.1.7 FARMACOCINÉTICA

Las concentraciones plasmáticas pico se alcanzan 30 a 60 minutos después de una dosis oral. La excreción ocurre sobre todo en la orina. La vida media plasmática es aproximadamente de 4 a 6 horas. [5]

La metoclopramida experimenta mínimo metabolismo hepático, a excepción de la conjugación simple. Se ha descrito su uso, con un buen nivel de seguridad, en pacientes con enfermedad hepática avanzada y cuya función renal era normal. [12].

2.1.8 FARMACODINAMIA

La metoclopramida, un antagonista dopaminérgico, estimula la motilidad del músculo liso del tracto gastrointestinal superior sin estimular las secreciones pancreáticas, biliares o gástricas. Al parecer, sensibiliza los tejidos a la acción de la acetilcolina. El efecto de la metoclopramida sobre la motilidad no depende de la innervación vagal intacta, pero puede ser suprimido por fármacos anticolinérgicos. La metoclopramida aumenta el tono y la amplitud de las contracciones gástricas (especialmente antrales), relaja el esfínter pilórico, el duodeno y el yeyuno, lo que acelera el vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal. La metoclopramida también aumenta el tono en reposo del esfínter esofágico inferior. [12]

2.1.9 PRECAUCIONES DE USO

Cuando se administra metoclopramida en forma conjunta con psicotrópicos, antihistamínicos o barbitúricos se debe tener en cuenta que puede tener efectos depresivos en el SNC, igualmente cuando se consume alcohol en forma concomitante con el medicamento.

Cuando se utiliza la vía parenteral, si el medicamento se aplica en forma rápida se puede llegar a provocar síntomas extrapiramidales (torticollis, trismos, crisis oculogiras), que son reversibles al suspender el medicamento o bien seden con la administración de diazepam o difenhidramina. En la literatura internacional, la aparición de síntomas extrapiramidales con la administración de metoclopramida a dosis terapéuticas se da uno en treinta tres mil pacientes.

En pacientes con insuficiencia renal crónica se debe valorar la administración del fármaco por periodos prolongados, debido a que su eliminación por vía renal del 98 % y en caso necesario se debe ajustar la dosis del medicamento.

La metoclopramida ha sido ampliamente utilizada durante el embarazo para aliviar tanto la hiperémesis gravídica, reflujo gastroesofágico y las gastroparesia que pueden presentarse durante el embarazo. El consenso general recomienda su uso durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y como con la gran mayoría de los medicamentos no contraindicados durante el embarazo. Su prescripción durante el primer trimestre queda a juicio del médico tratante, tomando en cuenta la severidad del caso, los beneficios potenciales y el probable riesgo que pudiera haber para el producto. La metoclopramida se elimina en pequeñas dosis en la leche materna. [12]

2.1.10 CONTRAINDICACIONES

Esta contraindicado en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a la metoclopramida o a cualquiera de sus componentes.

Siempre que la estimulación de la motilidad gastrointestinal pudiera ser peligrosa por ejemplo en presencia de hemorragia gastrointestinal, obstrucción mecánica o perforación.

En pacientes con feocromocitoma, ya que el fármaco puede causar una crisis hipertensiva, probablemente debido a la liberación de catecolamina del tumor. Estas crisis hipertensivas se pueden controlar con fentolamina.

En pacientes con epilepsia o en pacientes que estén recibiendo otros fármacos que pudieran causar reacciones extrapiramidales, puesto que se puede aumentar la frecuencia y la severidad de las reacciones extrapiramidales o de las crisis epilépticas. [12]

2.1.11 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS

Las reacciones adversas más frecuentes son: inquietud, somnolencia, cansancio y laxitud, que se presentan en aproximadamente el 10 % de los pacientes. Con menor frecuencia pueden ocurrir: síntomas extra piramidales, insomnio, cefalea, mareos, náuseas, galactorrea, ginecomastia, eritema, incluyendo urticaria o trastornos intestinales. [12]

2.1.12 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

La metoclopramida puede ser utilizada en forma concomitante con bloqueadores H₂, inhibidores de la bomba de protones y antiácidos, ya que no interfiere farmacocinéticamente ni farmacodinámicamente con estos productos, como es el caso de otros procinéticos que están contraindicados cuando se administra con psicotrópicos, antihistamínicos o barbitúricos produce efectos depresivos adicionales en el SNC, igualmente cuando se consume alcohol.

El cloranfenicol, ácido acetilsalicílico, desipramina, dexorubicina, y propantelina disminuyen la velocidad de absorción de la metoclopramida, las propiedades anti migrañosas de la metoclopramida pueden potenciarse con la administración de concomitante de analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

2.1.13 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS

Las vías de administración oral con dosis de 10 mg y 20 mg y solución 100 mg/100 mL por vía intramuscular con una dosis de 10 mg/2 mL y 100 mg/5 mL.

2.1.14 FORMAS FARMACÉUTICAS DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA

Las formas farmacéuticas en las que se comercializa la metoclopramida son en tabletas, grageas (tableta recubierta), solución oral y solución inyectable.

2.1.15 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS (ABSORCIÓN POR LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS).

Las mediciones de absorción en la región UV-VIS del espectro, proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas.

Absorción por los compuestos orgánicos.

La absorción de la radiación ultravioleta y visible por las moléculas orgánicas se debe a la excitación de dos tipos de electrones: 1) los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces, y 2) los electrones externos no compartidos que se localizan principalmente en los átomos de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

La longitud de onda en la que absorbe una molécula orgánica va a depender de la fuerza con la que se sujeten sus electrones. Los que comparten enlaces sencillos, como los de carbono-carbono o carbono-hidrógeno están unidos con tal fuerza que solo es posible la absorción con fotones más energéticos que los UV normales. Los electrones que participan en enlaces dobles y triples se sujetan con menos fuerza, y por lo tanto es más fácil excitarlos. Por esta razón, las especies con enlaces insaturados suelen absorber en la región UV. Los grupos funcionales orgánicos insaturados que absorben en la región UV-VIS se conocen como cromóforos. La posición del doble enlace y su absorptividad dependerá del disolvente y de otros detalles estructurales de la molécula. Así mismo la conjugación entre dos o más cromóforos puede ocasionar cambios en el máximo de absorbancia con longitudes de onda mayores. [2].

2.1.16 DEFINICIONES

Linealidad. Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. [6].

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

Recuperación absoluta. Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica. [6]

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. [6].

Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. [6].

Reproducibilidad intralaboratorio. Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas. [6].

Exactitud. Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. [6]. Límite de detección: es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas. [6].

Límite de cuantificación. Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. [6]

Estabilidad. Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis. [6]

2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cuál fue diseñado. [6]

Las pruebas para validar un método analítico son: linealidad, especificidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

En México, las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico, para llevar a cabo el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia están especificadas en la NOM-177-SSA1-1998.

2.3 NORMA OFICIAL MEXICANA 177-SSA1-1998

Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Los requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

2.3.1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN DE LA NOM-177-SSA1-1998

Esta norma Oficial Mexicana establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a que se deben sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas.

Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para todos los establecimientos que realicen las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de medicamentos.

2.3.2 NUMERALES DEL PUNTO 9 DE LA NOM-177-SSA1-1998 REQUISITOS PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE UNA PRUEBA DE BIOEQUIVALENCIA.

2.3.2.1 NUMERALES DEL PUNTO 9 DE LA NOM-177-SSA1-1998.

9.1 Validación de métodos analíticos.

9.1.1 Realizar la validación del método analítico con el mismo tipo de matriz biológica que aquella de las muestras biológicas.

9.1.2 Antes de la validación, establecer los criterios para aceptar o rechazar los experimentos de validación; sustentar científicamente estos criterios y documentar las medidas correctivas.

9.1.3 Llevar a cabo la validación una vez establecidas las condiciones analíticas, e incluir como mínimo los parámetros que describen a continuación:

9.1.3.1 Rango: establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos por al menos cinco concentraciones distintas cada una sin incluir muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

9.1.3.2 Recuperación absoluta: 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. Comparar estos resultados con las respuestas de las soluciones del mismo compuesto e las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta (s) razón (es) no necesariamente es el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

9.1.3.3 Linealidad: definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.

9.1.4 Precisión.

9.1.4.1 Repetibilidad: analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero debe incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 %; en los métodos por radioinmunoanálisis (RIA) no debe ser mayor que el 20 %.

9.1.4.2 Reproducibilidad intralaboratorio: analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración pero den incluirse dentro del rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 %; en los métodos por RIA no debe ser mayor que el 20 %.

9.1.5 Exactitud: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del ± 15 % del valor nominal de concentración, excepto los métodos por RIA que deben estar dentro del 20 %.

9.1.6 Estabilidad: determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos lo siguiente:

9.1.6.1 Condiciones de almacenamiento: evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las

muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

9.1.6.2 Ciclos de congelación-descongelación: evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar la muestra.

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

9.1.7. Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad expresados en los números 9.1.4 y 9.1.5.

9.1.8. Límite de cuantificación; analizar por quintuplicado la concentración mas baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como limite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%. Para métodos RIA debe considerarse $\pm 25\%$. Otros criterios distintos a este deben ser justificados.

9.1.9. Límite de detección; determinar 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. Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.

9.1.10. Selectividad; establecer la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. Evaluar el método contra posible interferencia (por ejemplo metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

9.1.11. Tolerancia; evaluar la tolerancia del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (por ejemplo pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica. Las modificaciones que se consideren, deben ser las que cumplan con los criterios de exactitud y precisión expresados en los numerales 9.1.4. y 9.1.5.

9.2. Informe de la validación del método analítico.

Elaborar un informe de la validación del método analítico que incluya lo indicado en el numeral 9.1. y que este aprobado por el responsable sanitario antes de su aplicación.

9.3. Muestras biológicas.

9.3.1. Bioseguridad; todas las muestras de fluidos biológicos deben considerarse potencialmente peligrosas o infecciosas y manejarse de conformidad con la normatividad aplicable.

9.3.2. Transporte de muestras biológicas; el transporte de las muestras biológicas debe llevarse a cabo de acuerdo con un PNO que considere tipo de contenedor, registros de condiciones de transporte (temperatura, humedad y tiempo), y correcta identificación.

9.3.3. Recepción de muestras biológicas en el laboratorio analítico; la recepción de muestras biológicas debe hacerse de acuerdo con un PNO, donde se indiquen los aspectos que se deben revisar como: número, integridad de contenedores, identificación, estado físico de la muestra (por ejemplo congelada, descongelada, hemolizada). Se debe verificar que las muestras cumplan con las condiciones acordadas conjuntamente con la unidad clínica.

9.3.4. Almacenamiento de muestras biológicas.

9.3.4.1. Se debe contar con equipo para el almacenamiento de las muestras biológicas, que sea apropiado para la cantidad de muestras y condiciones de almacenamiento.

9.3.4.2. Se deben contar con mecanismos para el registro y control de la temperatura durante el periodo de almacenamiento de las muestras.

9.3.4.3. Las muestras se deben almacenar en condiciones que aseguren su identidad e integridad, durante su periodo de estabilidad.

9.3.4.4. En caso de mantenimiento o contingencias (por ejemplo fallas eléctricas, servicios de limpieza), debe existir un PNO que considere las acciones a seguir para el manejo y almacenamiento de las muestras biológicas.

9.4. Análisis químico de muestras biológicas.

9.4.1. Las muestras biológicas recibidas de la unidad clínica, deben estar identificadas con un código que evite al analista relacionarlas con la identidad de los productos en estudio.

9.4.2. Realizar antes del análisis químico de muestras biológicas un plan de trabajo donde se indique: el responsable del análisis, las actividades asignadas a cada persona, el orden de análisis de las muestras, los criterios de aceptación, rechazo y reanálisis.

9.4.3. Realizar el análisis químico del estudio en las mismas condiciones analíticas establecidas en la validación del método analítico.

9.4.4. Se debe asegurar que no existan interferencias en la matriz biológicas usada como blanco de referencia.

9.4.5. Se debe investigar que no exista interferencia con la cuantificación del compuesto por analizar en las muestras predosis, para cada periodo del estudio.

9.4.6. Preparar y conservar muestras control en la misma matriz biológica, por lo menos a tres concentraciones: alta, media y baja, dentro del rango y por duplicado, que se distribuirán y analizarán a lo largo de cada corrida analítica.

9.4.7. Analizar las muestras control bajo el mismo procedimiento y al mismo tiempo que las muestras problema. Las muestras control deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos durante la validación del método.

9.4.8. Las muestras control sirven como criterio de aceptación o rechazo de una corrida analítica: 2 de 6 muestras control, que no sean de la misma concentración, pueden estar fuera de $\pm 20\%$ de la concentración nominal respectiva. En caso de utilizar un mayor número de muestras control, se debe aplicar un estudio estadístico para determinar que el criterio propuesto es equivalente al criterio antes mencionado.

9.4.9. Para cada día de análisis se debe procesar la curva de calibración de manera idéntica a lo establecido en la validación y debe cumplir con los criterios establecidos durante la validación.

9.4.10. Las muestras biológicas provenientes de un sujeto en sus diferentes periodos, deben analizarse bajo la misma curva patrón, en la misma corrida analítica y en el mismo instrumento. Cuando esto no sea posible, se sustentará científicamente.

9.4.11. Cuando se obtengan concentraciones por debajo del límite de cuantificación, estas concentraciones no deben incluirse en los cálculos.

9.4.12. Cuando se obtengan por encima del rango la muestra puede diluirse con el mismo tipo de matriz biológica.

9.4.13. Registrar las condiciones instrumentales empleadas durante el análisis químico de las muestras biológicas.

9.4.14. Verificar el buen funcionamiento del sistema analítico, confirmando antes del análisis de muestras de cada día de trabajo, que los diferentes equipos trabajan correctamente (por ejemplo eficiencia de la columna, volumen de entrega de bombas cromatográficas, precisión del inyector); cualquier otra evaluación que asegure la adecuación de todo el sistema analítico para cuantificar confiablemente las muestras biológicas.

9.5. Seguimiento del método durante el análisis de muestras biológicas.

9.5.1. Demostrar la consistencia de las curvas de calibración con respecto a pendiente, ordenada y coeficiente de regresión en cada día de análisis. Las muestras control deben cumplir los criterios de precisión y exactitud determinados durante la validación del

método, en los diferentes días de análisis del total de las muestras biológicas de un estudio.

9.6. Informe y evaluación del análisis químico de las muestras biológicas.

9.6.1. Elaborar un informe del análisis de muestras, que incluya lo siguiente:

9.6.1.1. Descripción de los medicamentos: denominación común internacional (DCI), denominación genérica, denominación distintiva, forma farmacéutica, dosis, número de lote, fecha de caducidad y fabricante;

9.6.1.2. Descripción de la muestra biológica que considere: fluido, volumen de fluido por muestra, condiciones de almacenamiento y número de muestra;

9.6.1.3. Breve descripción del método analítico para cuantificar las muestras;

9.6.1.4. Resumen de la validación del método analítico;

9.6.1.5. Descripción del análisis de muestras que incluya: sujetos analizados por corrida analítica, orden de inyección, reanálisis, criterios de aceptación o rechazo de la corrida.

9.6.1.6. Resultados del seguimiento del método durante el análisis de muestras biológicas: curvas de calibración (pendiente, ordenada y coeficiente de regresión) de cada uno de los días de análisis y los resultados de las muestras control de cada análisis;

9.6.1.7. Resultados de concentración del o los compuestos analizados en la matriz biológica de todos los sujetos, identificando con claridad número de sujeto, periodos analizados, clave de las muestras y unidades de concentración y fecha de análisis;

9.6.1.8. Por lo menos un juego completo de registros gráficos de la cuantificación (por ejemplo cromatogramas, espectrogramas) de un sujeto para el intervalo total de muestras (del tiempo 0 a t).

9.6.1.9. Ejemplo de una hoja de cálculo de concentraciones de las muestras analizadas, a partir de los datos crudos.

9.6.1.10. Dictamen.

3. OBJETIVOS

- Desarrollar y validar un método analítico espectrofotométrico al UV para cuantificar clorhidrato de metoclopramida en orina †, considerando algunos de los lineamientos del punto nueve de la NOM -177-SSA1-1998.
- Determinar si el método analítico es adecuado para su uso como práctica de laboratorio de biofarmacia.

† **Orina:** Para el presente estudio, se refiere a la matriz biológica en la cuál se cuantifica el clorhidrato de metoclopramida, consiste en una mezcla de seis muestras de orina que se recolectaron a partir de seis voluntarios sanos, la cuál se centrifugo, filtro y se diluyo con agua, en proporción 1:10.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo y validación del método analítico espectrofotométrico al UV se consideró como analito de estudio el clorhidrato de metoclopramida y como matriz biológica de trabajo orina, esta proveniente de seis voluntarios sanos que se mezcló, separó, filtro y se diluyó en agua en una proporción de 1:10.

La dilución de la mezcla de orina en agua en proporción 1:10 se realiza para poder obtener de manera mas confiable las respuestas obtenidas por el equipo.

Todas las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro se registraron como absorbancia, considerando una longitud de onda de 309 nm ya que a esta longitud de onda se realiza el análisis del clorhidrato de metoclopramida de acuerdo a la USP.

4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO

Se realizó considerando algunos de los parámetros fundamentales para la validación de métodos analíticos que especifica la NOM-177-SSA1-1998 en el numeral 9. Que hacen referencia a los requisitos y criterios para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia, con excepción del análisis individual de las muestras por cada voluntario.

4.2 MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIAL

- 1 Espátula cromo-níquel
- 1 Nave de pesado
- 1 Matraz volumétrico de 100 mL
- 3 Matraces volumétricos 50 mL
- 16 Matraces volumétricos 10 mL
- 2 Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- 1 Pizeta
- 1 Micro pipeta de 5000 µL
- 1 Micro pipeta de 1000 µL

EQUIPOS

- Vórtex
- Balanza analítica Sartorius
- Espectrofotómetro Shimadzu modelo 1601 UV-VIS
- Centrifuga Eppendorf

REACTIVOS

- Estándar de referencia de clorhidrato de metoclopramida. Lote B40278, Pureza 100.14%, Caducidad 18-11-2010, Procedencia laboratorio Sanofi-Aventis.
- Agua desionizada.

4.3 PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ORINA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORINA PREVIO A SU USO COMO MATRIZ BIOLÓGICA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO AL UV

Para la preparación de la matriz biológica empleada para la validación del método se recolectaron seis muestras de orina a partir de seis voluntarios sanos, cuatro hombres y dos mujeres de entre 17 y 33 años de edad. (Ver anexos)

Previo a la recolección de las muestras de orina se le pidió a cada individuo que se hidratara por la noche antes de acostarse con 250 mL de agua y que no ingiriera refrescos ni dulces que contengan colorantes, al despertar se eliminará la primera orina del día y al tomar sus alimentos ingiriera 250 mL de agua, posteriormente se recolectara la segunda orina del día en frascos contenedores de orina limpios, tomando medidas de higiene.

Una vez obtenidas las muestras de orina de cada uno de los voluntarios, cada muestra se repartió en seis tubos de ensayo de 13X150 mm, a cada tubo se le adicionaron aproximadamente 10 mL de orina, cada tubo fue etiquetado y posteriormente se pusieron en congelación a -19°C hasta su uso.

TRATAMIENTO DE LA MATRIZ BIOLÓGICA (PREPARACIÓN DE LA ORINA)

Las muestras de orina de cada voluntario se pusieron a descongelar a temperatura ambiente, mientras que las otras cinco muestras de orina se mantuvieron en congelación a -19°C hasta el día de su uso. Una vez descongeladas las muestras se trataron de manera independiente de la siguiente manera:

Los tubos con las muestras de orina se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min [9], una vez centrifugadas las muestras se decantaron, transfiriendo el sobrenadante a jeringas de 10 mL, estas con filtros de $0.45\ \mu\text{m}$ [7]. La orina filtrada se midió en una probeta graduada de 10 mL hasta recolectar un volumen de 8.3 mL para cada muestra hasta coleccionar un volumen aproximado de 50 mL de orina que a su vez se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 mL, una vez mezclada la orina de los seis voluntarios se llevó a volumen con agua desionizada. Quedando así preparada la matriz biológica (orina) para validar el método analítico espectrofotométrico al UV y cuantificar el clorhidrato de metoclopramida en la orina.

De esta manera se trataron todas las muestras de orina que se utilizaron en cada una de las pruebas realizadas en la validación del método analítico espectrofotométrico para cuantificar el clorhidrato de metoclopramida en orina.

Nota: Este procedimiento de preparación de la orina se realizó varias veces con los mismos voluntarios donantes, hasta terminar las pruebas que indicadas por la NOM 177-SSA1-1998 del numeral 9.1 referente a validación de métodos analíticos

4.3.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Se preparó una solución estándar con agua desionizada, a partir de un estándar de clorhidrato de metoclopramida (MCP · HCl) de Sanofi-Aventis en un volumen de 100 mL.

A partir de la solución estándar se preparó una solución primaria con orina y de esta solución se prepararon las curvas de calibración que se utilizaron para la validación del método analítico.

Solución estándar (1000 µg/mL)

Pesar exactamente 0.1000 g de estándar de clorhidrato de metoclopramida, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL disolver con 20 mL de agua desionizada y llevar al aforo con el mismo disolvente agitar en vórtex 30 s. Esta solución contiene 1000 µg/mL de clorhidrato de metoclopramida.

Solución primaria S1 (20 µg/mL)

De la solución estándar tomar un volumen de 1.0 mL, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo con orina, agitar con vórtex 30 s. Esta solución contiene 20 µg/mL de clorhidrato de metoclopramida.

Preparación de las curvas de calibración para la validación del método a partir de las solución primaria S1 (ver tabla 1).

Preparación del blanco

El blanco se preparó tomando un 1 mL de agua desionizada que se transfiere a un matraz volumétrico de 50 mL y llevándose al aforo con orina, se agito en el vórtex 30 s y se dejo reposar unos minutos hasta su uso.

4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación del método se realizó evaluando los parámetros de linealidad, selectividad, recuperación absoluta, la precisión como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, exactitud, límite de cuantificación y estabilidad del MCP · HCl en orina, considerando los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-1998 del punto 9 de los numerales 9.1 al 9.1.10 para cada prueba. Se hace la excepción del análisis individual de las muestras como lo indica la norma.

De acuerdo al parámetro a evaluar se realizaron las curvas de calibración correspondientes, estableciendo el rango en un intervalo de concentración de 0.5 µg/mL a 6.0 µg/mL de MCP · HCl, una vez preparadas las muestras se analizaron en el espectrofotómetro en la región UV a una longitud de onda de 309 nm midiendo la respuesta como absorbancia, se realizaron las graficas de concentración nominal contra absorbancia de acuerdo al parámetro a evaluar, de cada curva se obtuvo la pendiente (m), el intercepto (b) y el coeficiente de correlación (r). A partir de estos datos se realizaron los cálculos para evaluar cada parámetro de acuerdo al criterio establecido.

Los puntos control se establecieron en concentración de 0.1, 0.3 y 5.0 µg/mL de MCP · HCl, y los barridos en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm.

Con los datos obtenidos se realizan los cálculos para definir si el método analítico espectrofotométrico al UV es adecuado para su uso.

4.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se determinó preparando tres curvas de calibración estándar a partir de orina (ver paginas 24 y 27), cada curva de calibración se preparó con seis puntos, los cuales fueron leídos en el espectrofotómetro al ultravioleta a una longitud de onda de 309 nm, midiendo la absorbancia obtenida como respuesta.

Para cada una de las curvas de calibración estándar se graficó la concentración nominal contra la respuesta obtenida (absorbancia) y se obtuvieron los datos de regresión lineal con los seis puntos de la curva determinando la pendiente (m), la intersección al eje (b) y el coeficiente de correlación (r).

Como criterio de aceptación la linealidad del método debe demostrar un coeficiente de regresión mayor que 0.99. [6]

4.5.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración estándar a partir de la solución primaria S1 la validación del método.

SOLUCIÓN PRIMARIA S1 (µg/mL)	ALÍCUOTA DE LA SOLUCIÓN PRIMARIA S1 (mL)	VOLUMEN DE AFORO CON ORINA (mL)	CONCENTRACIÓN NOMINAL DE LA CURVA (µg/mL)
20.0	0.25	10.0	0.5
20.0	0.75	10.0	1.5
20.0	1.25	10.0	2.5
20.0	1.75	10.0	3.5
20.0	2.25	10.0	4.5
20.0	3.0	10.0	6.0

4.6 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

Analizar la muestra blanco de la matriz biológica proveniente de la mezcla de orina tratada (ver pagina 25) y evaluar el método contra posibles interferencias que pueda presentar la orina (p. Ej. fármacos o sustancias endógenas). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar. [6].

A partir de la solución estándar de 1000 µg/mL MCP · HCl en agua desionizada se preparó una solución primaria S1 de 20 µg/mL MCP · HCl en orina, se preparó una curva de calibración de MCP · HCl en orina y se prepararon por duplicado los puntos control de clorhidrato de metoclopramida en orina a tres niveles de concentración bajo, medio y alto.

Para determinar la selectividad del método se realizó un barrido con la mezcla de orina ajustando la línea base del equipo con un blanco de agua desionizada y se observó en el espectro de barrido que la orina no presente absorbancias ni máximos de absorción en la longitud de onda establecida para la identificación del MCP · HCl en orina.

Posteriormente se realizó un barrido de los tres niveles de concentración del MCP · HCl en orina, ajustando la línea base del equipo con blanco de orina y se observan los máximos de absorción que presenta el MCP · HCl en orina, se registran las longitudes de onda de máxima absorción y las absorbancias que presenta el clorhidrato de metoclopramida en la orina de los tres niveles por duplicado.

Se compararon los máximos de absorción que presenta la orina contra los máximos de absorción que presenta la orina con MCP · HCl a tres niveles y determinar que no hubiese interferencia de sustancias endógenas o fármacos presentes en la orina que pudiesen interferir en el análisis del MCP · HCl en orina.

4.7 RECUPERACIÓN ABSOLUTA

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. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es el 100 % pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

La recuperación se determinó preparando una curva de calibración y por triplicado cada una de las concentraciones de los puntos control dentro del rango en agua y orina.

Las concentraciones de clorhidrato de metoclopramida de los puntos control son: 1.0, 3.0 y 5.0 µg/mL

Se registraron las absorbancias de los tres niveles de concentraciones de los controles en agua, considerando a estas respuestas como el 100 %. Posteriormente se registraron las absorbancias de los tres niveles de concentración de los controles en orina y se comparó la respuesta promedio de los puntos control considerando como el 100 % el promedio de respuesta en agua.

4.8 PRECISIÓN DEL MÉTODO

4.8.1 REPETIBILIDAD

Analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a la de la curva de calibración, pero deben estar incluidos en el rango de la curva. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %. [6]

Para evaluar la precisión como repetibilidad se preparó una curva de calibración de MCP · HCl en orina recién preparado (ver tabla 1) y, por quintuplicado se prepararon los puntos control de la curva a tres niveles de concentración dentro del rango, se determinó el coeficiente de variación como porcentaje de los puntos control.

El blanco de ajuste: 1 mL de agua desionizada en 50 mL de orina.

Como criterio de aceptación de la prueba, se considera aceptable si el coeficiente de variación de los cinco datos de los puntos control de la muestra de MCP · HCl en orina son menores o iguales al 15 %.

4.8.2 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

Analizar por quintuplicado durante tres días un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica

estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 % [6].

Para evaluar la precisión como reproducibilidad se preparo una curva de calibración estándar de MCP · HCl en orina. (Ver tabla 1) y, por quintuplicado se prepararon los puntos control de la curva a tres niveles de concentración.

Este procedimiento se repitió durante tres días, se determino el coeficiente de variación de los puntos control para cada día de análisis. Se calculó el coeficiente de variación de los controles y de las tres curvas de calibración de los tres días de estudio y también se determinó el coeficiente de variación de todas las curvas de calibración de los tres días de análisis.

El blanco de ajuste: 1 mL de agua desionizada en 50 mL de muestra de orina diluida.

La prueba se considera aceptable si el coeficiente de variación de los cinco datos de los puntos control de MCP · HCl en orina no son mayores al 15 % para cada día de análisis.

4.9 EXACTITUD DEL MÉTODO

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del ± 15 % del valor nominal de concentración. [6]

Con los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad se calcularon las concentraciones experimentales de los puntos control y las concentraciones experimentales de las curvas de calibración, se calculó el por ciento de la desviación estándar absoluta (% DEA), para los datos de los puntos control.

Como criterio de aceptación se considera que el % DEA se menor al ± 15 % para los valores de concentración experimental de los puntos control de las pruebas de repetibilidad como reproducibilidad.

4.10 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20% . [6]

Para determinar el límite de cuantificación se preparó una curva de calibración estándar de MCP · HCl en orina.

Por quintuplicado se preparó la concentración más baja de la curva de calibración que es $0.5\ \mu\text{g/mL}$ de clorhidrato de metoclopramida en orina.

El blanco de ajuste: $1\ \text{mL}$ de agua desionizada en $50\ \text{mL}$ de muestra de orina diluida.

Se procedió a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de $309\ \text{nm}$.

Se registraron los valores de absorbancia para los puntos de la curva y los valores de absorbancia de las cinco concentraciones bajas.

Se calculó el % DEA y el coeficiente de variación de la concentración experimental de las cinco lecturas.

Como criterio de aceptación se consideró como criterio que el % CV sea menor al 20% .

4.11 ESTABILIDAD

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos lo siguiente: Evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

4.11.1 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA, EN REFRIGERACIÓN A $3^\circ\ \text{C}$ DURANTE 48 Y 72h.

La determinación de la estabilidad se llevó a cabo en dos partes, la primera parte fue para determinar la estabilidad del MCP · HCl en la matriz biológica durante un periodo de 48 horas y la segunda parte se determinó la estabilidad del MCP · HCl durante 72 horas en refrigeración a $3^\circ\ \text{C}$.

Se preparó una curva de calibración en orina recién preparada y se prepararon los puntos control a tres niveles bajo, medio y alto (1.0 , 3.0 y 5.0) $\mu\text{g} / \text{mL}$ por triplicado en tres series, la curva de calibración estándar se utilizó para determinar las concentraciones experimentales de las tres series de los puntos control. Después de obtener los resultados de absorbancia de la curva, se realizó la lectura de la 1ª serie considerándola como el

tiempo cero, el blanco se guardó en refrigeración en tubos de ensayo para cada serie. Para la serie dos y tres se guardaron en refrigeración en tubos de ensayo, dejando a la serie dos en refrigeración a 3° C por 48 horas y a la serie tres a 3° C por 72 horas. Pasado el periodo de tiempo para cada serie se dejó que las muestras se estabilizaran a temperatura ambiente y se procedió a realizar la lectura de las muestras, ajustando con su respectivo blanco, posteriormente se compararon las respuestas obtenidas con la curva de calibración estándar del tiempo cero (1ª serie) y se calculó la concentración experimental para cada serie y el % DEA y el % C V.

Como criterio de aceptación de la prueba se considera aceptable si el coeficiente de variación de los cinco datos de la cantidad recuperada de los puntos control de la muestra de MCP · HCl son menores o iguales al 15 % y si % DEA menor al ± 15 % para los valores de concentración experimental para los puntos control de las pruebas de repetibilidad como reproducibilidad.

La concentración de los datos de las tres series independientes debe estar dentro del ± 15 % del valor nominal de concentración, para que se acepte como estable.

4.11.2 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA, CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN A -19°C.

Evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocidas del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras. [6]

Para determinar la estabilidad del MCP · HCl en la matriz biológica se evaluaron tres ciclos de congelación- descongelación.

Se preparó una curva de calibración de MCP · HCl en orina, se prepararon los puntos control por triplicado a tres niveles de concentración bajo, medio alto (1.0, 3.0 y 5.0) $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tres series y un blanco para la curva de calibración, este blanco es el mismo para cada una de las series las tres series.

El blanco de ajuste: 1mL de agua desionizada en 50mL de orina.

Las tres series (1, 2 y 3) de los tres niveles de concentración se prepararon el mismo día. La curva de calibración estándar se utilizó para determinar las concentraciones experimentales de las tres series de los puntos controles, para los tres ciclos de congelación-descongelación.

El día de la preparación de las tres series se realizó la lectura de la serie 1 considerándola como el tiempo cero.

Las series 1, 2 y 3 se pusieron en congelación a -19° C por 24 h al igual que el blanco para cada serie.

Pasadas 24 h en congelación las series 1, 2 y 3 junto con su blanco se dejaron descongelar a temperatura ambiente, una vez descongeladas y equilibradas a temperatura ambiente se realizó nuevamente la lectura de la serie 1 ajustando el equipo con su blanco, se procedió a realizar la lectura al UV a 309 nm, esta lectura se consideró como el primer ciclo de congelación descongelación.

La series 2 y 3 se descongelaron a temperatura ambiente e intactas se pusieron nuevamente en congelación a -19°C por 24 h con su blanco.

Pasadas 24 h en congelación las series 2 y 3 junto con su blanco se pusieron a descongelar a temperatura ambiente, una vez descongeladas y equilibradas a temperatura ambiente se realizó la lectura de la serie 2 ajustando el equipo con su blanco, se procedió a realizar la lectura al UV a 309 nm, esta lectura se consideró como el segundo ciclo de congelación descongelación.

La serie 3 descongelada a temperatura ambiente e intacta se puso nuevamente en congelación a -19°C por 24 h junto con su blanco.

Pasadas 24 h en congelación las serie 3 junto con su blanco se pusieron a descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelada y equilibrada a temperatura ambiente se realizó la lectura de la serie 3 ajustando el equipo con su blanco, se procedió a realizar la lectura al UV a 309 nm, esta lectura se consideró como el tercer ciclo de congelación descongelación.

Una vez que se obtuvieron las lecturas de los tres ciclos de congelación-descongelación

Se calcularon las concentraciones experimentales para calcular el % DEA y el % C V.

Como criterio de aceptación de la prueba se considera aceptable si el coeficiente de variación de los cinco datos de la cantidad recuperada de los puntos control de la muestra de MCP · HCl son menores o iguales al 15 % y que el % DEA sea menor al $\pm 15\%$ para los valores de concentración experimental para los puntos control de las pruebas de repetibilidad como reproducibilidad.

La concentración de los datos de las tres series independientes debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración, para que se acepte como estable.

4.11.3 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA, EN CONGELACIÓN A -19°C POR 28 DÍAS

Evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocidas del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras. [6]

Para determinar la estabilidad del MCP · HCl en la matriz biológica en congelación a -19°C se preparó una curva de calibración en orina, se prepararon los puntos control por triplicado a tres niveles en cinco series.

La curva de calibración estándar se utilizó para determinar las concentraciones experimentales de las cinco series de los puntos control, después de obtener los

resultados de absorbancia de la curva se realizo la lectura de la 1ª serie considerándola como el tiempo cero.

El blanco de ajuste: 1 mL de agua desionizada en 50 mL de orina.

Se guardó un blanco de ajuste en congelación para cada serie en tubos de ensayo, dejando a las cuatro series restantes en congelación a -19°C .

Cada una de las series se fue descongelando a temperatura ambiente y analizando de la misma manera que se realizo con la serie 1 del tiempo cero.

Cada una de las 4 series restantes se fue descongelando cada 7 días hasta completar 28 días, pasado el periodo de tiempo para cada serie se dejo que las muestras se descongelaran a temperatura ambiente y se procedió a realizar la lectura de las muestras, ajustando con su respectivo blanco, posteriormente se compararon las respuestas obtenidas con la curva de calibración estándar del tiempo cero y se calculó la concentración experimental para cada serie a partir de la curva de calibración del tiempo cero y se calculó el % DEA y el % C. V.

Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir con los criterios de exactitud y repetibilidad expresados en los 9.1.4 y 9.1.5. [6]

La prueba se considera aceptable si el coeficiente de variación de los cinco datos de la cantidad recuperada de los puntos control de la muestra de $\text{MCP} \cdot \text{HCl}$ son menores o iguales al 15 % y si el % DEA están dentro al $\pm 15\%$ para los valores de concentración experimental para los puntos control de las pruebas de repetibilidad como reproducibilidad.

La concentración de los datos de las tres series independientes deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración en comparación al del tiempo cero, para que se acepte como estable.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tabla 2. Resultados de las tres curvas de calibración para determinación de la linealidad del método a partir de las absorbancias.

Linealidad del método						
Concentración nominal (µg/mL)	Absorbancia (λ = 309 nm)			PROM	DE	% CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
	Abs 1	Abs 2	Abs 3			
0.5	0.019	0.019	0.018	0.019	0.0006	3.1
1.5	0.051	0.050	0.049	0.050	0.0010	2.0
2.5	0.081	0.080	0.078	0.080	0.0015	1.9
3.5	0.106	0.105	0.104	0.105	0.0010	1.0
4.5	0.132	0.131	0.130	0.131	0.0010	0.8
6	0.183	0.182	0.181	0.182	0.0010	0.5
m =	0.0291	0.0290	0.0290	0.0290		
b =	0.0056	0.0052	0.0039	0.0049		
r =	0.9988	0.9988	0.9989	0.9989		

Para que la linealidad del método se considere valida el coeficiente de regresión lineal debe ser mayor o igual que 0.99.

Los resultados de la tabla muestran que los valores para cada una de las curvas de calibración tienen un coeficiente de regresión mayor a 0.99 por lo que si cumple con esta especificación.

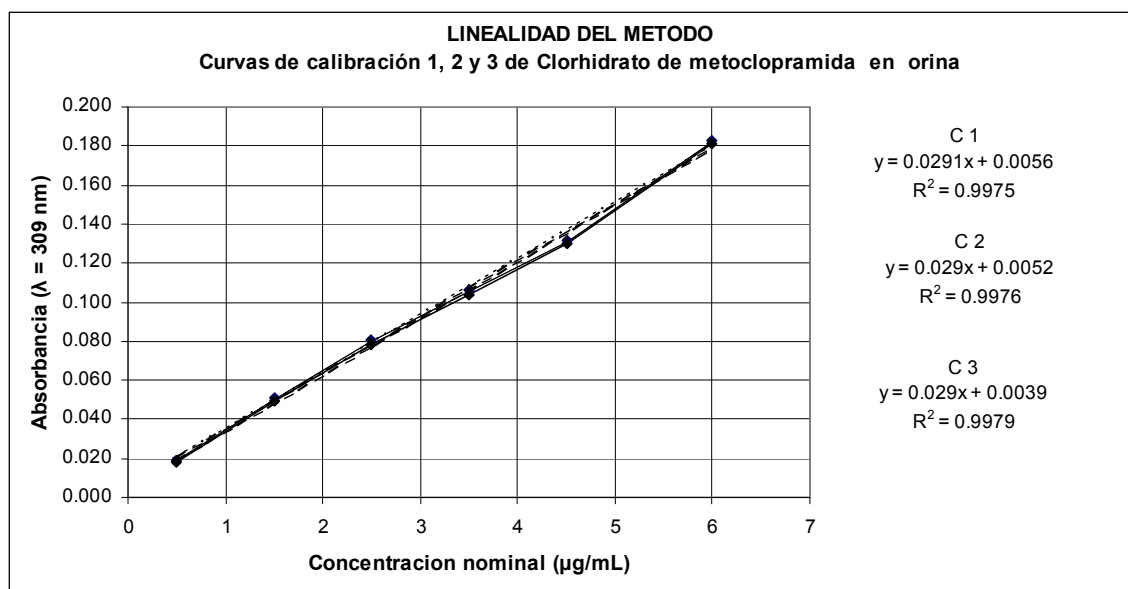


Figura 2. Gráfica 1, 2 y 3 de las curvas de calibración 1, 2 y 3. Linealidad del método.

Tabla 3. Promedio de las absorbancias de las tres curvas de calibración para la determinación de la linealidad del método.

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia promedio
0.5	0.019
1.5	0.050
2.5	0.080
3.5	0.105
4.5	0.131
6.0	0.182
m =	0.029
b =	0.005
r =	0.998

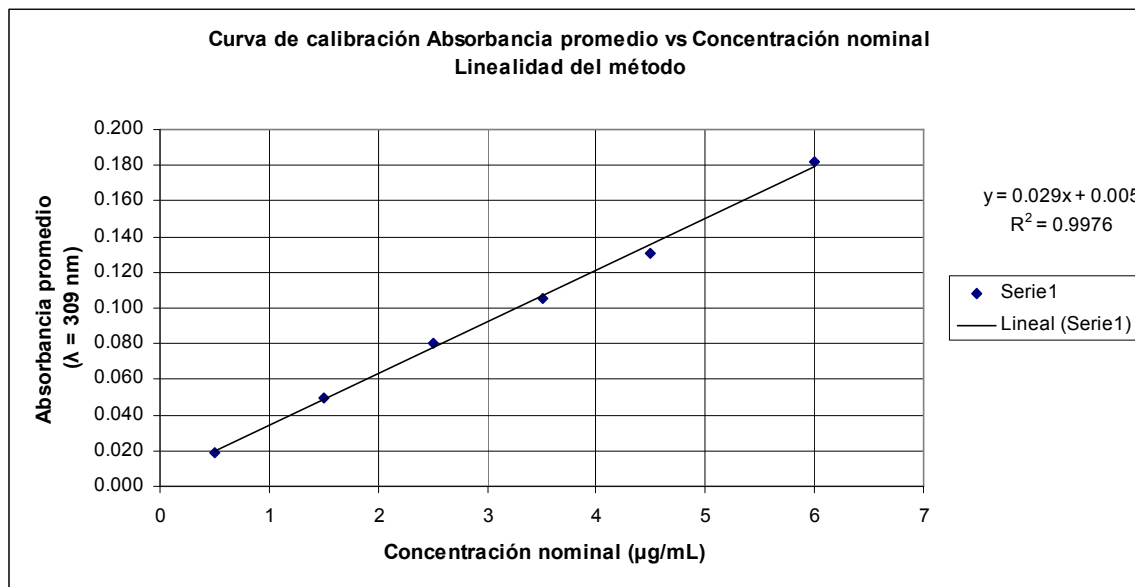


Figura 3. Gráfica de la curva de calibración promedio. Linealidad del método.

5.1.2 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

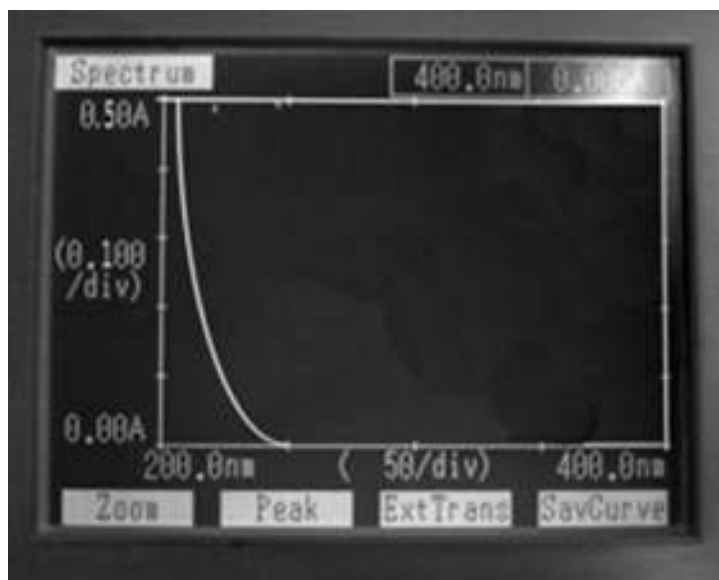


Figura 4. Espectro de barrido de la orina.

Tabla 4. Resultados de los espectros de barrido de MCP · HCl en orina a tres niveles de concentración por triplicado. Longitudes de onda de máxima absorción y absorbancias.

1er Barrido	Control bajo 1.0 µg/mL	1er Barrido	Control medio 3.0 µg/mL	1er Barrido	Control alto 5.0 µg/mL
λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs
309.5	0.033	309.5	0.102	309.5	0.170
273.5	0.040	273.5	0.123	272.5	0.192
213.5	0.087	213.5	0.259	214	0.369
2º Barrido	Control bajo	2º Barrido	Control medio	2º Barrido	Control alto
λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs	λ max (nm)	Abs
309.5	0.033	309.5	0.100	309.5	0.168
273.5	0.038	273.5	0.126	272.5	0.171
213.5	0.074	213.5	0.226	213.5	0.363

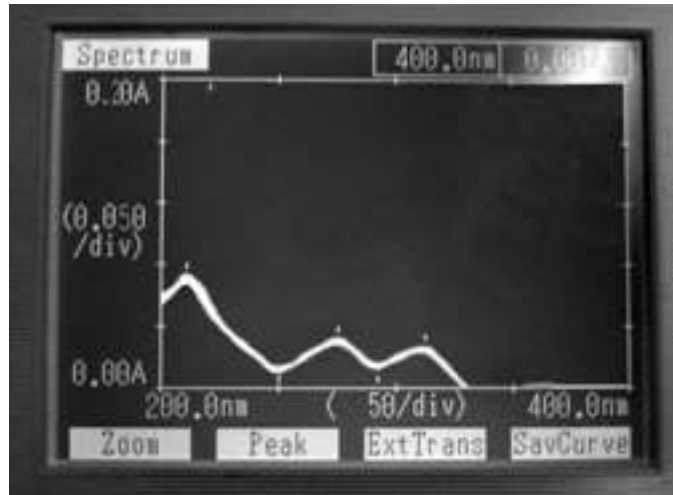


Figura 5. Espectro de absorción obtenido del barrido de MCP · HCl en orina en concentración de 1.0 µg/mL.

Peak detection	
λ	ABS
309.5	0.033
273.5	0.040
213.5	0.087

Figura 6. Longitudes de onda de máxima absorción y absorbancias obtenidas del espectro de barrido del MCP · HCl en orina en concentración de 1.0 µg/mL.

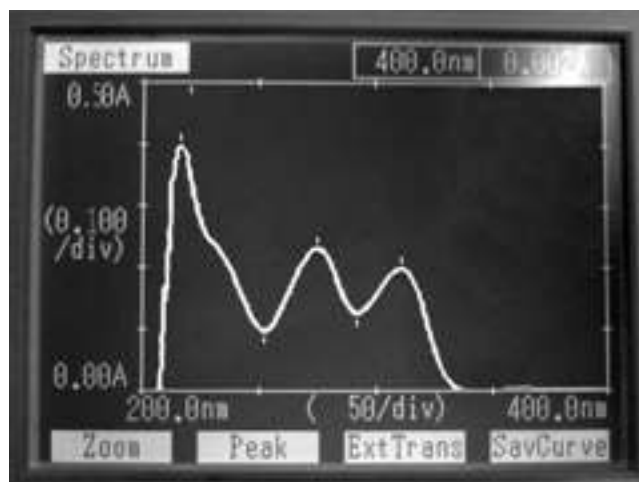


Figura 7. Espectro de absorción obtenido del barrido de MCP · HCl en orina en concentración de 5.0 µg/mL.

La línea base para el barrido de la orina se realizó con agua desionizada.

La línea base para el barrido del MCP · HCl en orina se realizó con orina.

Los barridos de las figuras 4, 5 y 7 se realizaron en el intervalo de 200 a 400 nm.

Las figuras 5 y 7 muestran los espectros de barrido del MCP · HCl en orina a dos niveles de concentración alto y bajo ambos presentan las tres longitudes de onda de máxima absorción bien definidos característicos de la molécula.

El espectro de la figura 4 en comparación a los espectros de las figuras 5 y 7 muestra que el barrido de la orina no presenta registros de longitudes de onda de máxima absorción que interfieran con los máximos de absorción que presenta el MCP · HCl en orina.

Esto muestra que el método presenta selectividad, ya que no se observa alguna interferencia de sustancias endógenas o fármacos presentes en la orina que afecten la cuantificación del MCP · HCl en la orina.

5.1.3 RECUPERACIÓN ABSOLUTA

Tabla 5. Absorbancias de MCP · HCl en agua a tres niveles de concentración dentro del rango por triplicado.

Recuperación absoluta (Absorbancias en agua)		
Absorbancia $\lambda= 309$ nm		
Control bajo	Control medio	Control alto
1.0 $\mu\text{g/mL}$	3.0 $\mu\text{g/mL}$	5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.032	0.095	0.162
0.032	0.099	0.160
0.033	0.097	0.159
Promedio de las absorbancias de los controles en agua		
Control bajo	Control medio	Control alto
0.032	0.097	0.160

Tabla 6. Absorbancias del MCP · HCl en orina a tres niveles de concentración dentro del rango por triplicado.

Recuperación absoluta (Absorbancias en orina diluida)		
Absorbancia $\lambda= 309$ nm		
Control bajo	Control medio	Control alto
1.0 $\mu\text{g/mL}$	3.0 $\mu\text{g/mL}$	5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.035	0.092	0.149
0.034	0.091	0.152
0.032	0.093	0.150
Promedio las absorbancias de los controles en orina diluida		
control bajo	control medio	control alto
0.034	0.092	0.150

Tabla 7. Resultados. Recuperación absoluta.

Absorbancias promedio de los puntos control $\lambda= 309$ nm			
Respuesta promedio	control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$	control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
Abs en agua	0.032	0.097	0.160
Abs en orina	0.034	0.092	0.150
% recuperación	106	95	94

La recuperación absoluta para el control bajo es mayor al 100 % mientras que para el control medio y bajo la recuperación absoluta esta por abajo del 100 %, pero son reproducibles en cada nivel de concentración dentro del rango por lo que si cumple con el criterio establecido.

5.1.4 PRECISIÓN DEL MÉTODO

5.1.4.1 REPETIBILIDAD

Tabla 8. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de repetibilidad del método.

Precisión (Repetibilidad)	
Concentración nominal (µg/mL)	Absorbancia curva de calibración
0.5	0.017
1.5	0.053
2.5	0.082
3.5	0.108
4.5	0.139
6.0	0.181

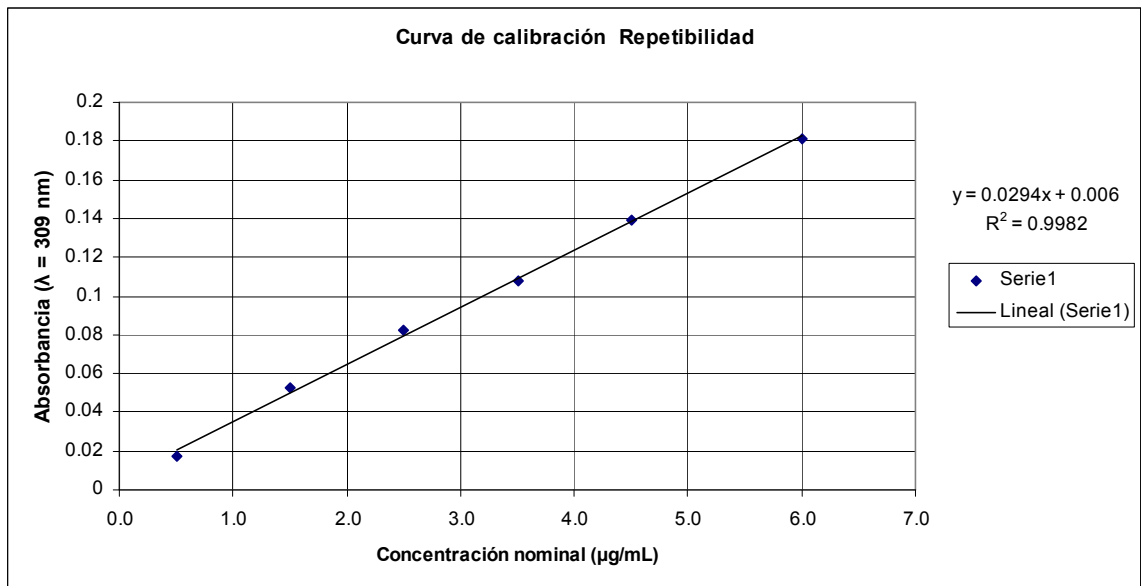


Figura 8. Gráfica de la curva de calibración. Repetibilidad.

REPETIBILIDAD

Tabla 9. Absorbancias de la curva de calibración y concentraciones experimentales de los puntos de control.

Repetibilidad del método					
Concentración Nominal [MCP · HCl] (µg/mL)	Absorbancias de las curva de calibración a $\lambda = 309\text{nm}$	Concentraciones experimentales de los puntos control [MCP · HCl] (µg/mL)			
		Control bajo 1.0 µg/mL	Control medio 3.0 µg/mL	Control alto 5.0 µg/mL	
0.5	0.017				
1.5	0.053	1.09	3.03	5.07	
2.5	0.082	1.12	2.99	5.07	
3.5	0.108	1.05	3.06	5.10	
4.5	0.139	1.09	3.09	5.17	
6.0	0.181	1.12	3.03	5.14	
m=	0.017	PROM	1.1	3.0	5.1
b=	0.053	DE	0.028	0.039	0.044
r=	0.082	%CV	2.6	1.3	0.9

La tabla 9 muestra que el coeficiente de variación de la respuesta y el coeficiente de variación de la concentración experimental calculada de los puntos control, son menores al 15% por lo que se cumple con el criterio de aceptación de la NOM-177-SSA1-1998 en el numeral. Lo que demuestra que el método es repetible.

5.1.4.2 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

Día 1

Tabla 10. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para el día 1.

Concentración nominal de MCP · HCl (µg/mL)	Absorbancia λ= 309nm	Absorbancia (λ= 309nm)			
		Puntos control			
		Control bajo 1.0 µg/mL	Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL	
0.5	0.016	0.032	0.097	0.162	
1.5	0.045	0.034	0.100	0.167	
2.5	0.081	0.032	0.097	0.161	
3.5	0.113	0.033	0.098	0.163	
4.5	0.146	0.034	0.095	0.161	
6.0	0.195	-----	-----	-----	
m =	0.328	PRO M	0.033	0.097	0.163
b =	0.002	DE	0.001	0.002	0.002
r =	0.999	%CV	3.0	1.9	1.5

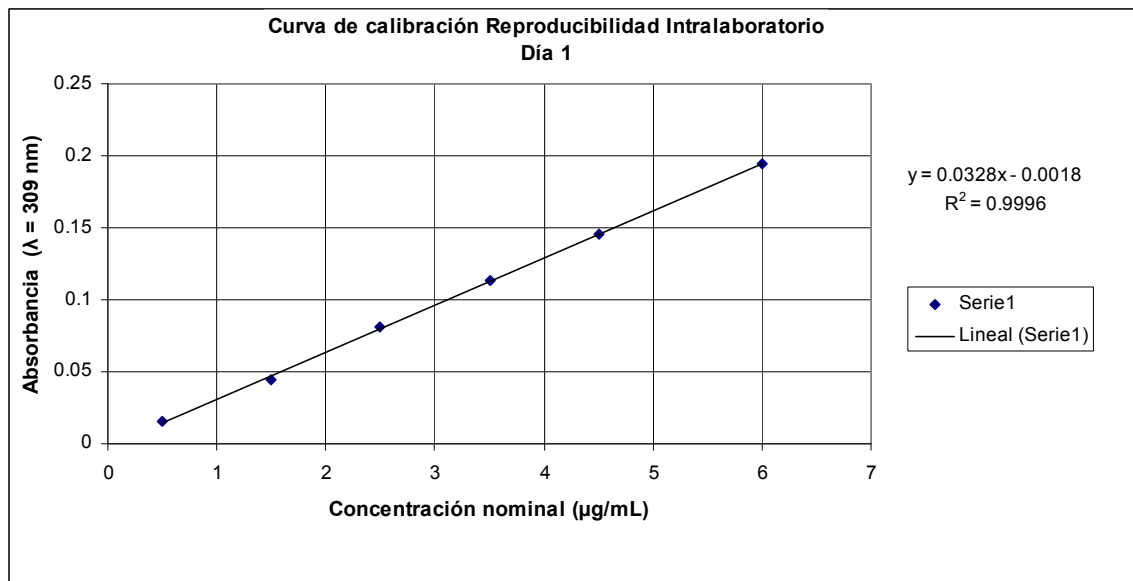


Figura 9. Gráfica de la curva de calibración. Reproducción intralaboratorio día 1.

Tabla 11. Concentraciones experimentales de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 1.

Concentración experimental del MCP · HCl de los puntos control (µg/mL)			
Control bajo 1.0µg/mL		Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL
1.03		3.01	4.99
1.09		3.10	5.15
1.03		3.01	4.96
1.06		3.04	5.02
1.09		2.95	4.96
PROM	1.06	3.02	5.02
DE	0.030	0.055	0.076
%CV	2.9	1.8	1.5

La tabla 11 muestra que el coeficiente de variación de la concentración experimental calculada del día 1 de los puntos control, es menor al 15 %.

REPRODUCIBILIDAD

Día 2

Tabla 12. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 2.

Concentración de MCP · HCl (µg/mL)	Absorbancia λ=309nm	Absorbancia (λ= 309nm)			
		Puntos control			
		1.0 µg/mL	3.0 µg/mL	5.0 µg/mL	
0.5	0.014	0.032	0.096	0.160	
1.5	0.048	0.031	0.097	0.162	
2.5	0.079	0.032	0.099	0.161	
3.5	0.111	0.034	0.100	0.166	
4.5	0.140	0.033	0.099	0.165	
6.0	0.194	-----	-----	-----	
m=	0.032	PROM	0.032	0.098	0.163
b=	-0.002	DE	0.001	0.002	0.003
r=	0.999	%CV	3.5	1.7	1.6

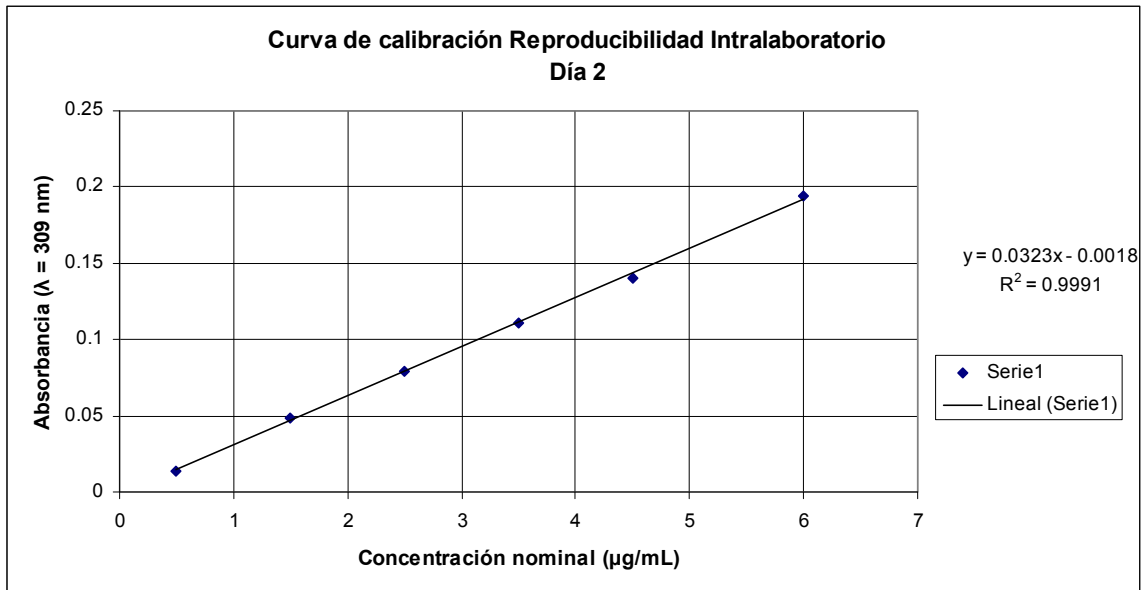


Figura 10. Gráfica de la curva de calibración. Reproducibilidad intralaboratorio día 2.

Tabla 13. Concentraciones experimentales de los puntos control del MCP · HCl en orina
Reproducibilidad intralaboratorio día 2.

Concentración experimental del MCP · HCl de los puntos control (µg/mL)			
Control bajo 1.0µg/mL		Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL
	1.05	3.03	5.01
	1.02	3.06	5.07
	1.05	3.12	5.04
	1.11	3.15	5.20
	1.08	3.12	5.16
PROM	1.06	3.10	5.10
DE	0.035	0.051	0.080
%CV	3.3	1.6	1.6

La tabla 13 muestra que el coeficiente de variación de la concentración experimental calculada para el día 2 de los puntos control, es menor al 15 %.

REPRODUCIBILIDAD

Día 3

Tabla 14. Absorbancias de la curva de calibración y de los puntos control para determinación de la reproducibilidad intralaboratorio día 3.

concentración de MCP HCl (µg/mL)	Absorbancia λ=309nm	Absorbancias λ=309nm			
		Concentración de los puntos control			
		1.0 µg/mL	3.0 µg/mL	5.0 µg/mL	
0.5	0.017	0.032	0.097	0.161	
1.5	0.049	0.030	0.093	0.158	
2.5	0.083	0.033	0.099	0.165	
3.5	0.114	0.031	0.098	0.158	
4.5	0.148	0.032	0.097	0.162	
6.0	0.196	-----	-----	-----	
m=	0.0326	PROM	0.032	0.097	0.161
b=	0.0006	DE.	0.001	0.002	0.003
r=	0.9999	CV%	3.6	2.4	1.8

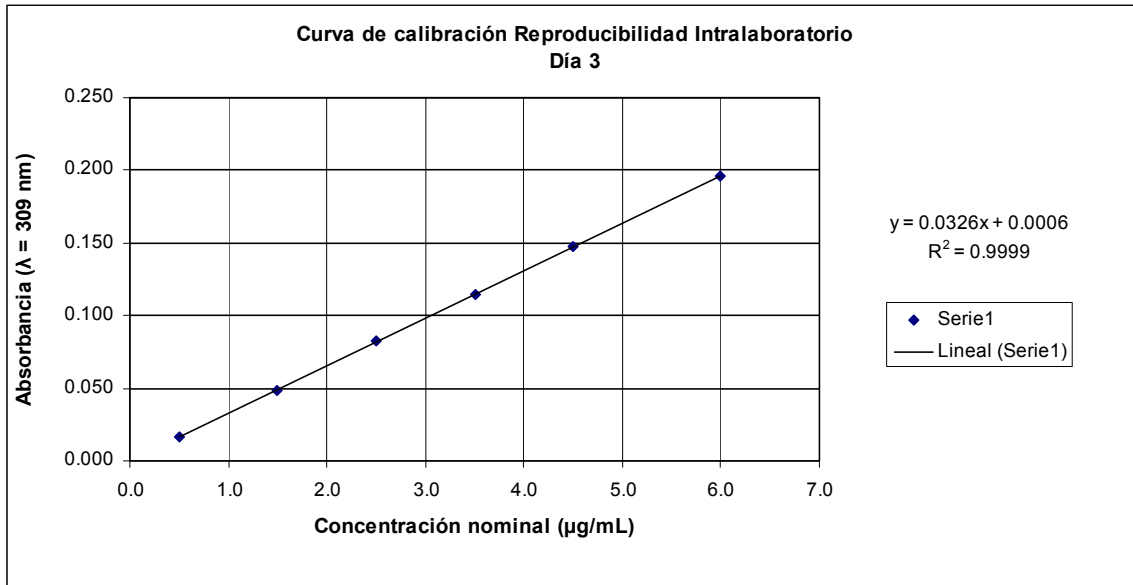


Figura 11. Gráfica de la curva de calibración. Reproducibilidad intralaboratorio día 3.

Tabla 15. Concentraciones experimentales de los puntos control del MCP · HCl en orina. Reproducibilidad intralaboratorio día 3.

Concentración experimental del MCP · HCl de los puntos control (µg/mL)			
Control bajo 1.0µg/mL		Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL
0.96		2.96	4.92
0.90		2.83	4.83
0.99		3.02	5.04
0.93		2.99	4.83
0.96		2.96	4.95
PROM	0.95	2.95	4.91
DE	0.035	0.070	0.090
%CV	3.7	2.4	1.8

Tabla 16. Resultados del % CV reproducibilidad intralaboratorio días 1, 2 y 3.

Resultados % CV para los tres días de análisis			
Concentración experimental de MCP · HCl (µg/mL)			
Control bajo 1.0µg/mL		Control bajo 1.0µg/mL	Control bajo 1.0µg/mL
1.03		3.01	4.99
1.09		3.1	5.15
1.03		3.01	4.96
1.06		3.04	5.02
1.09		2.95	4.96
1.05		3.03	5.01
1.02		3.06	5.07
1.05		3.12	5.04
1.11		3.15	5.2
1.08		3.12	5.16
0.96		2.96	4.92
0.9		2.83	4.83
0.99		3.02	5.04
0.93		2.99	4.83
0.96		2.96	4.95
PROM =	1.02	3.02	5.01
DE =	0.063	0.082	0.109
%CV =	6.2	2.7	2.2

La tabla muestra los tres días de análisis, se observa que el coeficiente de variación de la concentración experimental calculada para los puntos control es menor al 15 %. Lo que demuestra que el método es reproducible y cumple con el criterio de la NOM-17-SSA1-1998.

5.1.5 EXACTITUD DEL MÉTODO

Tabla 17. Concentraciones experimentales de las curvas de calibración de precisión (repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio) para determinación de la exactitud del método.

Concentración nominal de MCP HCl ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)					DE	%CV	%DEA
	Curva1	Curva2	Curva3	Curva4	PROM			
0.5	0.54	0.49	0.50	0.37	0.48	0.07	15.20	4.5
1.5	1.43	1.54	1.48	1.60	1.51	0.07	4.91	-0.9
2.5	2.52	2.50	2.53	2.58	2.53	0.03	1.36	-1.4
3.5	3.50	3.50	3.48	3.47	3.49	0.02	0.43	0.4
4.5	4.51	4.40	4.52	4.52	4.49	0.06	1.36	0.3
6.0	6.00	6.07	5.99	5.95	6.00	0.05	0.81	0.0

Tabla 18. Concentraciones experimentales de los puntos control de precisión para determinación de la exactitud del método.

Resultados % DEA			
Concentración experimental de MCP HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.03		3.01	4.99
1.09		3.10	5.15
1.03		3.01	4.96
1.06		3.04	5.02
1.09		2.95	4.96
1.05		3.03	5.01
1.02		3.06	5.07
1.05		3.12	5.04
1.11		3.15	5.20
1.08		3.12	5.16
0.96		2.96	4.92
0.90		2.83	4.83
0.99		3.02	5.04
0.93		2.99	4.83
0.96		2.96	4.95
1.09		3.03	5.07
1.12		2.99	5.07
1.05		3.06	5.10
1.09		3.09	5.17
1.12		3.03	5.14
PROM =	1.04	3.03	5.03
DE =	0.06	0.07	0.10
%CV =	6.05	2.42	2.08
Valor absoluto%DEA=	4.1	0.9	0.7

Tabla 19. Valores de la concentración experimental promedio de los puntos control de las pruebas de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) con resultados de %DEA.

Valor promedio de cada uno del punto control de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad a partir de las concentraciones experimentales obtenidas.			
Reproducibilidad	Valor promedio de la concentración experimental de los puntos control de MCP HCl ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control bajo	Control medio	Control alto
	1.0 $\mu\text{g/mL}$	3.0 $\mu\text{g/mL}$	5.0 $\mu\text{g/mL}$
DIA 1	1.06	3.02	5.02
DIA 2	1.06	3.02	5.02
DIA 3	0.95	2.95	4.91
Repetibilidad	1.09	3.04	5.11
PROM	1.04	3.01	5.01
DE.	0.06	0.04	0.08
%CV	6.02	1.33	1.5
VALOR ABSOLUTO	%DEA	%DEA	%DEA
	3.4	0.2	0.2

La tabla 19 muestra el valor promedio de las concentraciones en cada nivel de concentración, los valores obtenidos de repetibilidad como de reproducibilidad están dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración y cumplen con el criterio de la NOM-177-SSA1-1998. Lo que indica que el método es exacto.

5.1.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tabla 20. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de límite de cuantificación.

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias $\lambda=309\text{nm}$
0.5	0.017
1.5	0.048
2.5	0.078
3.5	0.109
4.5	0.142
6	0.198
m=	0.0325
b=	-0.0018
r=	0.999

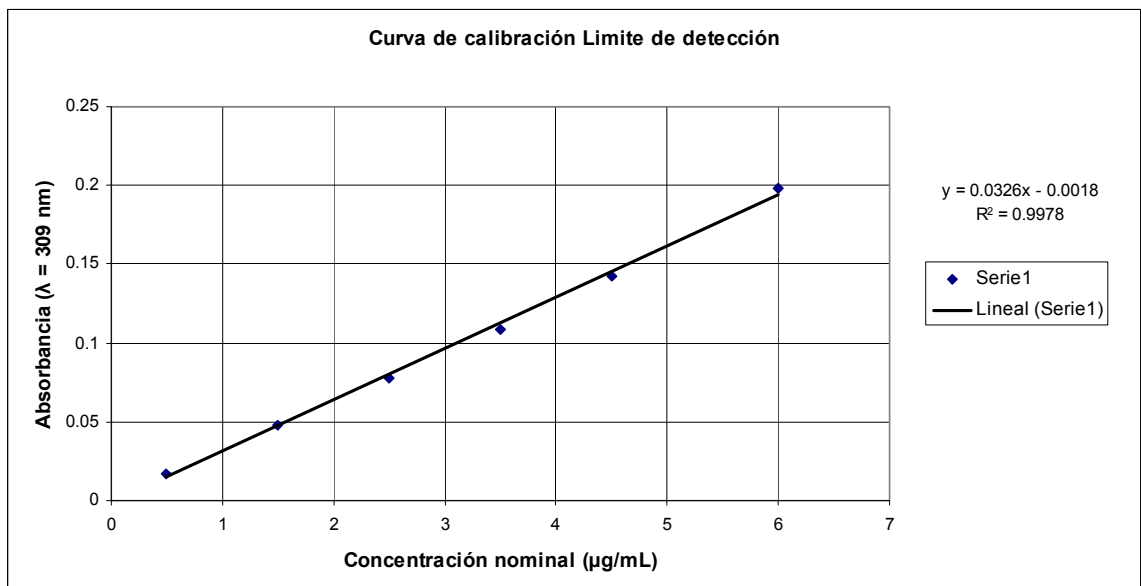


Figura 12. Gráfica de la curva de calibración. Límite de cuantificación.

Tabla 21. Resultados de concentración experimental. Límite de cuantificación.

Limite de cuantificación (0.5 µg/mL)		Concentración Experimental (µg/mL)	%DEA
Absorbancia			
0.015		0.52	3.2
0.015		0.52	3.2
0.015		0.52	3.2
0.016		0.55	9.3
0.014		0.49	3.0
PROM	0.015	0.52	4.4
DE	0.001	0.02	-----
%CV	4.7	4.2	-----

El valor promedio de la concentración experimental esta dentro del $\pm 20\%$ del valor del valor nominal con un % CV menor al 20 % por cual se considera que tal concentración es aceptable como límite de cuantificación.

5.1.7 ESTABILIDAD

5.1.7.1 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA DILUIDA EN REFRIGERACIÓN A 3° C DURANTE 48 Y 72 HORAS

Tabla 22. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de estabilidad de MCP · HCl en orina, refrigeración a 3° C durante 48 y 72h.

Concentración de MCP · HCl en orina diluida (µg/mL)	Absorbancias $\lambda=309\text{nm}$
0.5	0.016
1.5	0.045
2.5	0.077
3.5	0.106
4.5	0.140
6.0	0.192
m=	0.0319
b=	-0.0024
r=	0.999

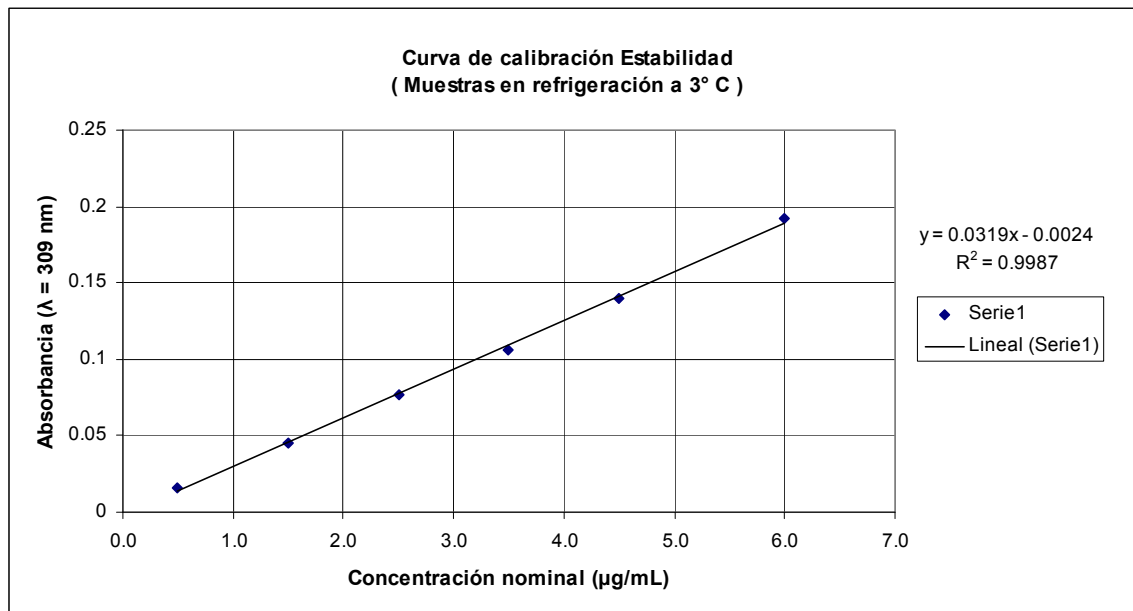


Figura 13. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad en refrigeración a 3° C durante 48 y 72 h.

Tabla 23. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3°C tiempo cero.

T 0 (muestras recién preparadas)			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
Control bajo 1.0 μ g/mL		Control medio 3.0 μ g/mL	Control alto 5.0 μ g/mL
0.033		0.095	0.160
0.034		0.096	0.162
0.033		0.096	0.162
PROM	0.0333	0.0957	0.1613
DE	0.0006	0.0006	0.0012
%CV	1.7	0.6	0.7
Concentración de MCP · HCl en orina diluida (μ g/mL)			
Control bajo 1.0 μ g/mL		Control medio 3.0 μ g/mL	Control alto 5.0 μ g/mL
1.11		3.05	5.09
1.14		3.08	5.15
1.11		3.08	5.15
PROM	1.12	3.07	5.13
DE	0.02	0.02	0.04
%CV	1.62	0.59	0.71
%DEA		%DEA	%DEA
10.95		1.73	1.77
14.08		2.78	3.02
10.95		2.78	3.02
Promedio	12.0	2.4	2.6

Tabla 24. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina, refrigeración a 3°C durante 48 h.

Muestras control refrigeradas a 3°C por 48 horas.			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.032		0.096	0.158
0.033		0.098	0.159
0.031		0.097	0.157
PROM	0.032	0.097	0.158
DE	0.001	0.001	0.001
%CV	3.1	1.0	0.6
Concentración experimental ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.08		3.08	5.03
1.11		3.15	5.06
1.05		3.11	4.99
PROM	1.08	3.11	5.03
DE	0.03	0.03	0.03
%CV	2.9	1.0	0.6
%DEA		%DEA	%DEA
7.82		2.78	0.52
10.95		4.87	1.14
4.68		3.82	0.11
PROM	7.8	3.8	0.6

Los resultados muestran que el MCP · HCl en la muestra de orina es estable en refrigeración a 3° C por un período de tiempo de 48h, ya que los valores de DEA% están dentro de especificación.

Tabla 25. Resultados absorbancia y concentración experimental de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad en refrigeración 3° C durante 72 h.

Muestras control refrigeradas a 3° C por 72 h			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
Control bajo 1.0 μ g/mL		Control medio 3.0 μ g/mL	Control alto 5.0 μ g/mL
0.055		0.114	0.182
0.051		0.117	0.177
0.053		0.114	0.179
PROM	0.053	0.115	0.179
DE	0.002	0.002	0.003
%CV	3.8	1.5	1.4
Concentración experimental (μ g/mL)			
Control bajo 1.0 μ g/mL		Control medio 3.0 μ g/mL	Control alto 5.0 μ g/mL
1.80		3.65	5.78
1.67		3.74	5.62
1.74		3.65	5.68
PROM	1.74	3.68	5.69
DE	0.063	0.054	0.079
%CV	3.6	1.5	1.4
%DEA		%DEA	%DEA
79.88		21.58	15.56
67.34		24.71	12.42
73.6		22.6	13.9
PROM	73.6	22.9	13.9

La tabla muestra que el clorhidrato de metoclopramida ya no es estable en la orina después de 72 h.

Tabla 26. Resultados promedio de % CV y % DEA para determinación de estabilidad del MCP · HCl en orina, en refrigeración a 3° C para los tiempos T0, 48 y 72 h,

Promedio de % CV y % DEA de la concentración experimental Puntos control, T0, 48 y 72 h			
Concentración experimental de MCP · HCl (µg/mL)			
	Control bajo 1.0µg/mL	Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL
% CV (0 h)	1.6	0.6	0.7
% CV (48 h)	2.9	1.0	0.6
% CV (72 h)	3.6	1.5	1.4
%DEA (T 0)	12.0	2.4	2.6
%DEA (48 h)	7.8	3.8	0.6
%DEA (72 h)	73.6	22.6	13.9

La tabla 25 muestra que a las 72 h en refrigeración el MCP · HCl comienza a descomponerse en la orina ya que las lecturas de absorbancia cambian.

Los resultados del % CV están por debajo del 15% que es aceptable mientras que el % DEA esta muy elevado y no cumplen con este criterio por lo que se considera que el MCP · HCl no es estable en orina cuando se mantiene en refrigeración por más de 72 h.

5.1.7.2 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA, CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN A -19°C.

Tabla 27. Curva de calibración para determinación de la estabilidad del MCP · HCl en ciclos de congelación-descongelación.

Concentración nominal (µg/mL)	Absorbancias $\lambda=309\text{nm}$
0.5	0.019
1.5	0.056
2.5	0.089
3.5	0.121
4.5	0.152
6	0.202
m=	0.033
b=	0.005
r=	0.999

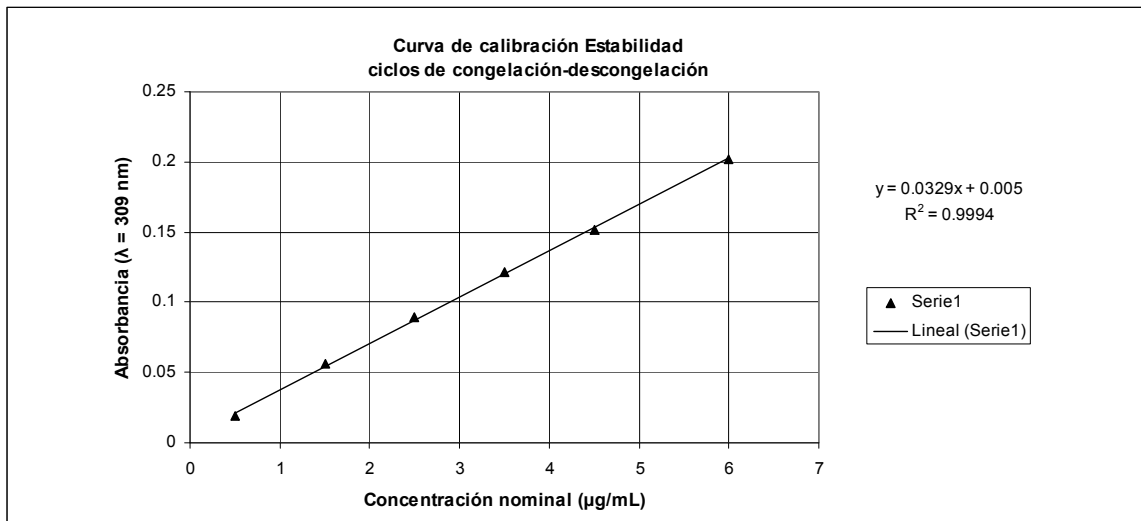


Figura 14. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.

Tabla 28. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación. Tiempo cero.

Puntos control			
Tiempo cero muestras recién preparadas			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.039		0.105	0.172
0.038		0.102	0.170
0.040		0.107	0.176
PROM	0.039	0.105	0.173
DE	0.001	0.003	0.003
%CV	2.6	2.4	1.8
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.03		3.04	5.07
1.00		2.95	5.01
1.06		3.10	5.19
PROM	1.03	3.03	5.09
DE	0.030	0.076	0.093
%CV	2.9	2.5	1.8
%DEA		%DEA	%DEA
3.3		1.3	1.5
0.3		1.8	0.2
6.3		3.3	3.9

Tabla 29. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelaón, primer ciclo.

Puntos control			
Primer ciclo de congelación-descongelaón			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.041		0.113	0.180
0.040		0.111	0.179
0.041		0.114	0.181
PROM	0.041	0.113	0.180
DE	0.001	0.002	0.001
%CV	1.4	1.4	0.6
Concentracón experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.094		3.281	5.316
1.063		3.220	5.286
1.094		3.311	5.346
PROM	1.084	3.271	5.316
DE	0.018	0.046	0.030
%CV	1.62	1.42	0.57
%DEA		%DEA	%DEA
9.4		9.4	6.3
6.3		7.3	5.7
9.4		10.4	6.9

Tabla 30. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación, segundo ciclo.

Puntos control			
Segundo ciclo de congelación-descongelación			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.043		0.114	0.182
0.044		0.114	0.182
0.046		0.115	0.187
PROM	0.044	0.114	0.184
DE	0.002	0.001	0.003
%CV	3.4	0.5	1.6
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.15		3.31	5.38
1.18		3.31	5.38
1.25		3.34	5.53
PROM	1.19	3.32	5.43
DE	0.046	0.018	0.088
%CV	3.9	0.5	1.6
%DEA		%DEA	%DEA
15.4		10.4	7.5
18.5		10.4	7.5
24.6		11.4	10.6

Tabla 31. Absorbancia y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de %DEA para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación- descongelación, tercer ciclo.

Puntos control			
Tercer ciclo de congelación-descongelación			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.055		0.117	0.184
0.051		0.115	0.183
0.053		0.119	0.189
PROM	0.053	0.117	0.185
DE	0.002	0.002	0.003
%CV	3.8	1.7	1.7
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.52		3.40	5.44
1.40		3.34	5.41
1.46		3.46	5.59
PROM	1.46	3.40	5.48
DE	0.061	0.061	0.098
%CV	4.2	1.8	1.8
%DEA		%DEA	%DEA
51.9		13.4	8.8
39.7		11.4	8.1
45.8		15.4	11.8

Tabla 32. Resultados promedio de % CV y % DEA para determinación de estabilidad del MCP · HCl en orina. Ciclos de congelación-descongelación.

% CV y % DEA de la concentración experimental de los puntos control en ciclos congelación-descongelación			
Concentración experimental de MCP · HCl (µg/mL)			
	Control bajo 1.0µg/mL	Control medio 3.0µg/mL	Control alto 5.0µg/mL
% CV (T 0)	2.9	2.5	1.8
% CV (1er ciclo)	1.6	1.4	0.6
% CV (2º ciclo)	3.9	0.5	1.6
% CV (3er ciclo)	4.2	1.8	1.8
%DEA (T 0)	3.3	0.9	1.9
%DEA (1erciclo)	8.4	9.0	6.3
%DEA (2º ciclo)	19.5	10.7	8.5
%DEA (3erciclo)	45.8	13.4	9.6

Los resultados muestran que el % CV si cumple, ya que para todos los ciclos esta por debajo del 15 %, mientras que el % DEA no cumple en el segundo y tercer ciclo de congelación-descongelación.

Por lo que por lo que el MCP · HCl en orina es estable solo en el primer ciclo de congelación-descongelación.

5.1.7.3 ESTABILIDAD DEL CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA EN ORINA, EN CONGELACIÓN A -19°C POR 28 DÍAS.

Tabla 33. Absorbancias de la curva de calibración para determinación de la estabilidad del MPC · HCl en orina. Congelación durante 28 días.

Concentración nominal MPC · HCl (µg/mL)	Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$
0.5	0.018
1.5	0.054
2.5	0.091
3.5	0.124
4.5	0.152
6.0	0.199
m=	0.033
b=	0.0053
r=	0.999

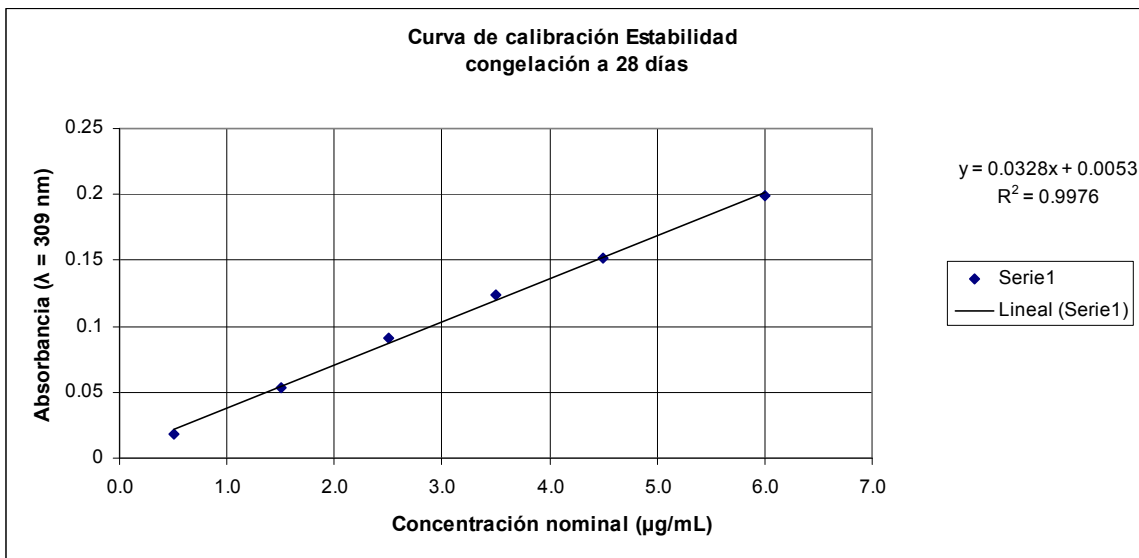


Figura 15. Gráfica de la curva de calibración. Estabilidad del MPC · HCl en congelación a -19° C por 28 días.

Tabla 34. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, tiempo cero.

Puntos control			
Tiempo cero			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.039		0.106	0.178
0.039		0.108	0.181
0.037		0.110	0.179
PROM	0.038	0.108	0.179
DE	0.001	0.002	0.002
%CV	3.0	1.9	0.9
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.03		3.07	5.27
1.03		3.13	5.36
0.97		3.20	5.30
PROM	1.01	3.13	5.31
DE	0.035	0.061	0.047
%CV	3.5	1.9	0.9

Tabla 35. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 1.

Puntos control Semana 1			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.038		0.110	0.183
0.040		0.111	0.185
0.039		0.109	0.179
PROM	0.039	0.110	0.182
DE	0.001	0.001	0.003
%CV	2.6	0.9	1.7
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.00		3.20	5.42
1.06		3.23	5.48
1.03		3.16	5.30
PROM	1.03	3.20	5.40
DE	0.031	0.031	0.093
%CV	3.0	1.0	1.7

Tabla 36. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 2.

Puntos control Semana 2			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
0.041		0.115	0.187
0.042		0.116	0.186
0.040		0.115	0.184
PROM	0.041	0.115	0.186
DE	0.001	0.001	0.002
%CV	2.4	0.5	0.8
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$		Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
1.09		3.35	5.54
1.12		3.38	5.51
1.06		3.35	5.45
PROM	1.09	3.36	5.50
DE	0.031	0.018	0.047
%CV	2.8	0.5	0.8

Tabla 37. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 3.

Puntos control Semana 3			
Absorbancia $\lambda = 309$ nm			
	Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$	Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
	0.044	0.112	0.185
	0.043	0.115	0.187
	0.043	0.114	0.189
PROM	0.043	0.114	0.187
DE	0.001	0.002	0.002
%CV	1.3	1.3	1.1
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
	Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$	Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
	1.18	3.26	5.48
	1.15	3.35	5.54
	1.15	3.32	5.61
PROM	1.16	3.31	5.54
DE	0.018	0.047	0.061
%CV	1.5	1.4	1.1

Tabla 38. Absorbancias y concentraciones experimentales de los puntos control con cálculo de % CV para la determinación de la estabilidad del MCP · HCl en orina. Congelación a -19° C, semana 4.

Puntos control Semana 4			
Absorbancia $\lambda = 309 \text{ nm}$			
	Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$	Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
	0.049	0.117	0.192
	0.047	0.115	0.19
	0.049	0.118	0.189
PROM	0.048	0.117	0.190
DE	0.001	0.002	0.002
%CV	2.4	1.3	0.8
Concentración experimental de MCP · HCl ($\mu\text{g/mL}$)			
	Control bajo 1.0 $\mu\text{g/mL}$	Control medio 3.0 $\mu\text{g/mL}$	Control alto 5.0 $\mu\text{g/mL}$
	1.33	3.41	5.70
	1.27	3.35	5.64
	1.33	3.44	5.61
PROM	1.31	3.40	5.65
DE	0.035	0.047	0.047
%CV	2.7	1.4	0.8

Tabla 39. Promedio de las absorbancias de los puntos control de las cuatro semanas y de la concentración experimental promedio de cada semana de los 28 días de congelación a -19° C de MCP · HCl en orina con calculo del %DEA y %CV de las cinco series.

Absorbancia Promedio $\lambda = 309 \text{ nm}$			
Promedio (T 0)	0.038	0.108	0.179
Promedio (T 1)	0.039	0.110	0.182
Promedio (T 2)	0.041	0.115	0.186
Promedio (T 3)	0.043	0.114	0.187
Promedio (T 4)	0.048	0.117	0.190
PROM	0.042	0.113	0.185
DE	0.004	0.004	0.004
%CV	9.6	3.2	2.3
Concentración Experimental Promedio ($\mu\text{g/mL}$)			
	1.0	3.0	5.0
Promedio (T 0)	1.01	3.13	5.31
Promedio (T 1)	1.03	3.20	5.40
Promedio (T 2)	1.09	3.36	5.50
Promedio (T 3)	1.16	3.31	5.54
Promedio (T 4)	1.31	3.40	5.65
PROM	1.12	3.28	5.48
DE	0.12	0.11	0.13
%CV			
Porcentaje de Desviación Estándar Absoluta			
%DEA (T 0)	0.9	4.5	6.2
%DEA (T 1)	2.0	1.9	1.7
%DEA (T 2)	5.9	5.1	1.9
%DEA (T 3)	6.5	1.5	0.7
%DEA (T 4)	13.1	2.8	1.8

Las muestras de MCP · HCl en orina son estables en congelación a -19° C por 28 días ya que se cumple con los parámetros de exactitud y precisión que indica la NOM-177-SSA1-1998.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas para validar el método analítico espectrofotométrico para cuantificar clorhidrato de metoclopramida en orina, muestran que el método analítico es adecuado para cuantificar clorhidrato de metoclopramida en orina bajo las condiciones de trabajo establecidas ya que es lineal en el rango de concentraciones establecido, la muestra de orina no presenta interferencias con el analito, es repetible, reproducible y exacto, la metoclopramida es estable en la matriz biológica en condiciones de refrigeración por 48 h, es estable en el primer ciclo de congelación-descongelación y es estable en congelación a -19°C por 28 días.

El método analítico propuesto para cuantificar clorhidrato de metoclopramida en orina es factible para su uso y puede tener aplicación como práctica para laboratorio de biofarmacia.

7. ANEXOS

Datos de los voluntarios participantes en el estudio, primera recolección de muestras de orina.

VOLUNTARIO	EDAD	SEXO	VOLUMEN DE ORINA (mL)	FECHA DE RECOLECCIÓN	pH de la orina
1	29	Femenino	60	08-07-09	7.5
2	17	Masculino	50	07-07-09	5.0
3	32	Masculino	55	09-07-09	7.0
4	24	Masculino	60	07-07-09	6.0
5	28	Masculino	60	08-07-09	6.5
6	25	Femenino	50	08-07-09	8.0

Datos de pH de la solución estándar y de la orina.

SOLUCIONES	pH
Solución estándar	8.0
Orina diluida	7.0
Blanco de la muestra de orina	7.0

Datos de los voluntarios participantes en el estudio segunda recolección de muestras de orina.

VOLUNTARIO	EDAD	SEXO	VOLUMEN DE ORINA (mL)	FECHA DE RECOLECCIÓN	pH de la orina
1	29	Femenino	60	24-08-09	7.5
2	17	Masculino	60	24-08-09	5.5
3	32	Masculino	65	26-08-09	7.0
4	24	Masculino	65	26-08-09	6.0
5	28	Masculino	70	27-08-09	6.0
6	25	Femenino	55	27-08-09	7.5

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfredo Fernández Serret. Yeni Aguilar Cabrera. Et.al. Validación de métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe. Revista cubana farmacia. (36).pp. 28-34. 2002.
2. Skoog. West. Holler. Crouch. Química analítica. 7a Ed. Cap 23. Aplicaciones de los métodos espectroscópicos atómicos y moleculares. Pp.614-626 2001.
3. United States Pharmacopeia. USP 31 Monografías oficiales. Vol. III pp.2963
4. Alaa S. Amin and Gamal H. Ragab. Spectrophotometric Methods for the Determination of Anti-Emetic Drugs in Bulk and in Pharmaceutical Preparations. Analytical Sciences. Vol. 19. Pp.747-751. 2003.
5. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. I. 9ª edición. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. España 2001 pp. 431, 973-999.
6. NOM 177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
7. Pablo A.M. Quiroga. Patricia m. Bustillo and María G. Volonte. In Vitro Dissolution and Urinary Excretion Study of Metoclopramide Tablets. Biopharmaceutics and Drug Disposition. Vol.19. pp.479-482.1998.
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM 9ª edición. Secretaria de Salud, México, 1132-1133, 1883-1887. 2004.
9. Z. Desta. G. M. Wu. A.M. Morocho. The Gastro prokinetic and Antiemetic Drug Metoclopramide is a Substrate and Inhibitor of Cytochrome P450 2D6.The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.Vol.30.No3.2002.
10. Massimo Cossu. Vanna Sanna. Et.al. A New Sensitive Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography Method for Quantitative Determination of Metoclopramide in Canine Plasma. Analytical Letters. Vol. 41.pp. 767-778.2008.
11. Food and drug administration. Guidance for the industry. Bioanalytical method validation. May 2001.
12. PLM.Diccionario de especialidades farmacéuticas 2008.Tomo I, edición 54 Ed. Thompson. México.pp.768-770. 2007.
13. The Merck Index. An encyclopedia of Chemicals, drugs and biological. Merck Research Laboratories. 13th Edition. USA, pp.1094. 2001
14. Ludwig Hubert, Validation of analytical Methods: review and strategy. July 2001.
15. www.labcompliance.com
16. Del Rivero Ramírez L. Misael. Fuentes Noriega Inés. Jung Cook Helgi. Et.al. laboratorio de biofarmacia. 2007. pp. 37-45. 2007.
17. Guideline for industry. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-QA2 (Mach 1995).
18. Guideline for Industry. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. October. 1999.
19. <http://www.fda.gov/ceder/guidance/index.htm>
20. Christina Graffner. Per-olof Lagerstrom. Et.al. Pharmacokinetics of Metoclopramide Intravenously and Orally Determined by Chromatography.Br. J. Clin. Pharmac. Vol.8. pp. 469-474. 1979.

21. D.N. Bateman, C. Kahn and D.S. Davies. The Pharmacokinetics of Metoclopramide in Man with Observations in the Dog. *Br. J. Clin. Pharmac.* Vol. 9. pp. 371-377. 1980.