



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

*FACULTAD DE QUÍMICA*

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) PARA  
CUANTIFICAR PROPAFENONA EN PLASMA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

*QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA*

**PRESENTA**

*BRENDA JAZMIN FLORES ARGUELLO*



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dra. Inés Fuentes Noriega

**VOCAL:** Profesor: M. en C. Juan Manuel Rodríguez

**SECRETARIO:** Profesor: M. en C. Liz Jannet Medina Reyes

**1er. SUPLENTE:** Profesor: M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz

**2° SUPLENTE:** Profesor: M. en F. Luis Jesús García Aguirre

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 112, Facultad de Química, Edificio “E”, UNAM; Centro de Estudios Científicos y clínicos (CECYCPHARMA).

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Inés Fuentes Noriega  
(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO:** Q.F.B. Elisa Zamora Bello  
(nombre y firma)

**SUSTENTANTE:** Brenda Jazmín Flores Argüello  
(nombre (s) y firma (s) )



### Agradecimientos:

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer, aquellas en especial que marcaron cada una de las etapas de mi vida; tengo la dicha de estar con algunas de ellas y otras permanecen en mis recuerdos, pero sin importar en donde se encuentren quiero darles las gracias por formar parte de mi.

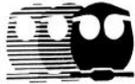
Con este trabajo expreso mi infinita gratitud a mi madre Patricia Argüello, que a pesar de las adversidades logró guiarme hacia el camino profesional, ya que gracias a sus consejos pude concluir este ciclo de mi vida, debo a ella lo que soy y llegue a ser.

Gracias a la Dra. Inés Fuentes Noriega, que me dio la confianza y el apoyo para la realización de este proyecto; y a los sinodales por dedicar parte de su tiempo a la revisión del presente.

A mi familia por su cariño y apoyo incondicional, sin duda ellos forman parte de este logro.

Agradezco a mis más entrañables amigos, que compartieron conmigo infinidad de experiencias y buenos momentos; así como a mis compañeros de la carrera y generación.

A Misael por su comprensión y cariño brindado durante todo este tiempo. Gracias por estar a mi lado incondicionalmente y por ser tan especial.



Quisiera agradecer también a CECYC PHARMA por darme la oportunidad de incursionar en el ámbito laboral y permitirme llevar a cabo el presente trabajo; a mis compañeros de la unidad clínica y en especial a la unidad analítica que hicieron amenas mis tardes. Gracias por los consejos y el tiempo dedicado a mi desarrollo profesional, especialmente a los coordinadores, quienes me guiaron en todo momento y ofrecieron su ayuda de forma sincera.

A Dios, por permitir mi existencia y brindarme la oportunidad de concluir una etapa más en mi vida llena de dicha y bendiciones.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

El universo conspira para realizar lo que realmente deseas...

...Orgullosamente puma, orgullosamente UNAM.

*Por mi raza hablará el espíritu... ... México, Pumas, Universidad!!*

**Contenido**

Índice de figuras .....	1
Índice de tablas.....	1
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Generalidades.....</b>	<b>5</b>
3.1 Arritmias cardiacas.....	5
3.1.1 Síntomas.....	5
3.1.2 Causas.....	6
3.1.3 Tratamiento.....	6
3.2 Propafenona.....	8
3.2.1 Propiedades Físicoquímicas.....	8
3.2.2 Farmacodinamia.....	9
3.2.3 Farmacocinética.....	10
3.2.4 Constantes farmacocinéticas.....	11
3.2.5 Interacciones medicamentosas.....	12
3.2.6 Efectos adversos.....	13
3.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	16
3.3.1 Reservorio de la fase móvil.....	16
3.3.2 Sistemas de bombeo.....	17
3.3.2.1 Bombas de desplazamiento.....	17
3.3.2.2 Bombas reciprocantes.....	17
3.3.3 Inyector.....	18
3.3.4 Detector.....	18
3.3.4.1 Detector UV.....	19
3.3.4.2 Detectores de fluorescencia.....	19
3.3.4.3 Detector electroquímico.....	20
3.3.4.4 Detector de índice de refracción.....	20
3.3.4.5 Detector de absorción en el infrarrojo.....	20
3.3.5 Columna.....	21
3.3.6 Selección de fase móvil.....	21
3.3.7 Registrador de señales.....	22



3.3.7.1 Cromatograma .....	22
3.3.7.2 Parámetros cromatográficos .....	23
3.4 Optimización de métodos analíticos .....	26
3.5 Validación de métodos analíticos .....	27
3.5.1 Selectividad.....	27
3.5.2 Curva de calibración.....	27
3.5.3 Linealidad.....	27
3.5.4 Puntos de control de calidad .....	27
3.5.5 Recuperación absoluta.....	28
3.5.6 Precisión .....	28
3.5.6.1 Repetibilidad.....	28
3.5.6.2 Reproducibilidad intralaboratorio .....	28
3.5.7 Exactitud .....	28
3.5.8 Límite de cuantificación y detección .....	29
3.5.9 Estabilidad de la muestra .....	29
3.5.10 Tolerancia del método.....	29
<b>4. Parte experimental. ....</b>	<b>30</b>
4.1 Equipos, materiales y reactivos .....	30
4.1.1 Equipos e instrumentos.....	30
4.1.2 Materiales .....	31
4.1.3 Reactivos y disolventes.....	31
4.1.4 Sustancias de referencia .....	31
4.1.5 Preparación de soluciones .....	32
4.2 Optimización de método analítico.....	35
4.2.1 Selección de columna .....	35
4.2.2 Fase móvil.....	36
4.2.3 Selección de la longitud de onda.....	36
4.2.4 Definición de rango de trabajo.....	36
4.2.5 Selección del Estándar Interno (E.I.) .....	37
4.2.6 Temperatura de columna y automuestreador .....	37
4.2.7 Volumen de inyección, velocidad de flujo .....	37
4.2.8 Método de extracción .....	37



4.3	Validación del método analítico. ....	39
4.3.1	Preparación de las curvas de calibración y muestras de control de calidad. ...	39
4.3.2	Descripción del método analítico. ....	42
4.3.3	Corrida analítica. ....	43
4.3.4	Adecuabilidad del Sistema. ....	43
4.3.5	Método de Procesamiento. ....	44
4.3.6	Descripción de la muestra biológica. ....	44
4.3.7	Selectividad. ....	45
4.3.8	Linealidad del método. ....	46
4.3.9	Precisión y exactitud del método. ....	46
4.3.10	Repetibilidad. ....	46
4.3.11	Reproducibilidad. ....	47
4.3.12	Exactitud del método. ....	48
4.3.13	Limite de cuantificación y limite de detección. ....	48
4.3.14	Recobro. ....	49
4.3.15	Anticoagulantes (Heparina). ....	49
4.3.16	Estabilidad. ....	50
4.3.16.1	Estabilidad de muestra procesada citratos y heparina. ....	50
4.3.16.2	Estabilidad temperatura ambiente. ....	51
4.3.16.3	Estabilidad refrigeración. ....	51
4.3.16.4	Ciclos congelación – descongelación. ....	51
4.3.16.5	Estabilidad a largo plazo (congelación a -40°C a -80° C). ....	51
4.3.16.6	Estabilidad en solución (refrigeración). ....	52
4.3.17	Efecto de la dilución. ....	52
4.3.18	Tolerancia. ....	52
<b>5.</b>	<b>Resultados y análisis. ....</b>	<b>53</b>
5.1	Optimización de método analítico. ....	53
5.1.1	Selección de columna. ....	53
5.1.2	Fase móvil. ....	53
5.1.3	Selección de la longitud de onda. ....	53
5.1.4	Selección del Estándar Interno (E.I.). ....	54
5.1.5	Método de extracción. ....	54
5.1.6	Condiciones cromatográficas finales. ....	55



---

5.2 Validación.....	56
5.2.1 Selectividad.....	56
5.2.2 Linealidad del método. ....	60
5.2.3 Precisión y exactitud del método.....	62
5.2.3.1 Repetibilidad .....	62
5.2.3.2 Reproducibilidad del primer analista.....	63
5.2.3.3 Reproducibilidad del segundo analista.....	64
5.2.3.4 Reproducibilidad entre analistas.....	65
5.2.4 Limite de cuantificación y limite de detección. ....	66
5.2.5 Recobro .....	68
5.2.5.1 Propafenona.....	68
5.2.5.2 Fenitoina (Estándar interno).....	70
5.2.5.3 Anticoagulantes. ....	72
5.2.6 Estabilidades.....	73
5.2.6.1 Estabilidad de muestra procesada.....	73
5.2.6.2 Estabilidad temperatura ambiente .....	75
5.2.6.3 Estabilidad refrigeración .....	76
5.2.6.4 Ciclos congelación descongelación .....	77
5.2.6.5 Estabilidad a largo plazo (congelación a - 40° a - 80 °C) .....	78
5.2.6.6 Estabilidad en solución (refrigeración).....	79
5.2.6 Efecto de la dilución .....	80
5.2.7 Tolerancia .....	81
5.2.8 Resumen de la validación del método analítico para propafenona. ....	84
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>87</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>88</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>90</b>



## Índice de figuras.

Fig. 1 Estructura química de clorhidrato de propafenona .....	8
Fig. 2 Vía metabólica de propafenona.....	11
Fig. 3 Representación de un cromatograma. ....	23
Fig. 4 Representación del factor de coleo. ....	26
Fig. 5 Método de extracción de prueba .....	38
Fig. 6 Diagrama de extracción .....	42
Fig. 7 Selectividad de folios de plasma .....	56
Fig. 8 Blanco de plasma de citratos (BP) y heparinizado (BP HEP) .....	57
Fig. 9 Blanco de plasma hemolizado (BP_1 HEMO) y plasma lipémico (BP_1 LIPE) .....	58
Fig. 10 Selectividad a fármacos y anticoagulante (EDTA).....	58
Fig. 11 Curva de calibración promedio del método de propafenona.....	61
Fig. 12 Cromatograma de Límite de cuantificación (LC-1) y detección (LD-1) del método de propafenona. ....	67

## Índice de tablas.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas de algunos métodos por CLAR para cuantificar propafenona. ....	15
Tabla 2. Preparación de puntos control de sistema para evaluar recobro. ....	40
Tabla 3. Preparación de curva de calibración y puntos control de Método. ....	41
Tabla 4. Parámetros de aceptación para adecuabilidad del sistema. ....	43
Tabla 5. Selectividad fármacos. ....	45
Tabla 6. Área de propafenona a diversas longitudes de onda. ....	53
Tabla 7. Condiciones cromatográficas para cuantificar propafenona en plasma. ....	55
Tabla 8. Controles bajos en plasma lipémico. ....	70
Tabla 9. Controles bajos en plasma hemolizado. ....	59
Tabla 10. Curvas de linealidad del método. ....	61
Tabla 11. Linealidad del método analítico .....	60
Tabla 12. Repetibilidad del método para cuantificar propafenona en plasma.....	62
Tabla 13. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma (primer Investigador).....	63
Tabla 14. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma (segundo analista) .....	64



Tabla 15. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma.....	65
Tabla 16. Límites de detección y límite de cuantificación para el método analítico. ....	66
Tabla 17. Límites de detección para el método analítico.....	67
Tabla 18. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar propafenona en plasma de citratos.....	68
Tabla 19. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar propafenona en plasma heparinizado.....	69
Tabla 20. Recobro de fenitoina en plasma con citratos.....	70
Tabla 21. Recobro de fenitoina en plasma heparinizado.....	71
Tabla 22. Recobro anticoagulantes.....	72
Tabla 23. Estabilidad de propafenona en plasma de citratos (muestra procesada).....	74
Tabla 24. Estabilidad de propafenona en plasma heparinizado(muestra procesada).....	74
Tabla 25. Estabilidad de propafenona en plasma (temperatura ambiente).....	75
Tabla 26. Estabilidad de propafenona en plasma (refrigeración).....	76
Tabla 27. Tercer ciclo congelación/descongelación. ....	77
Tabla 28. Estabilidad largo plazo 98 días.....	78
Tabla 29. Estabilidad de propafenona en solución. Refrigeración.....	79
Tabla 30. Estabilidad de fenitoina estándar interno).Refrigeración.....	79
Tabla 31 Efecto de la dilución 1:2 para propafenona.....	80
Tabla 32. Efecto de la dilución 1:4 para propafenona.....	80
Tabla 33. Cambio de equipo cromatográfico.....	82
Tabla 34. Cambio de anticoagulante (plasma de citratos y heparina).....	83
Tabla 35. Resumen de la validación para propafenona.....	84



## 1. Introducción.<sup>1,2,3</sup>

Propafenona pertenece a la clase de fármacos antiarrítmicos utilizados en el tratamiento de arritmias ventriculares y supraventriculares, las cuales pueden tener una incidencia de hasta un 50 % después de una cirugía cardíaca. Dichos fármacos se eligen de acuerdo al mecanismo de la arritmia específica.

Resulta ser importante la cuantificación de la concentración plasmática para identificar las causas de algunos fracasos de efectos terapéuticos o poder desarrollar nuevas formas de dosificación; por ello es necesario contar con un método analítico robusto que permita la cuantificación del analito de interés.

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de propafenona mediante CLAR utilizando un detector UV a una longitud de onda de 210 nm; el método empleado utiliza fenitoína como estándar interno, llevando a cabo una extracción líquido – líquido con una mezcla de Diclorometano: Hexanos 70:30 %v/v que fue necesaria para cuantificar el límite establecido (0.015 µg/mL) de acuerdo al C<sub>max</sub> reportado en la literatura (189.9 +/- 20.92 ng/mL).

El objetivo fue la validación del método para cuantificar el antiarrítmico en plasma, tomando como referencia la NOM-177-SSA1-1998; ya que para llevar a cabo estudios farmacocinéticos es necesario contar con métodos analíticos validados que permitan la cuantificación del analito de interés; el método optimizado permite su aplicación en un estudio de biodisponibilidad al cumplir criterios establecidos en la norma.



## **2. Objetivos.**

- Optimizar un método analítico para cuantificar propafenona en plasma empleando cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV.
- Validar el método analítico de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.



### 3. Generalidades.

#### 3.1 Arritmias cardiacas.<sup>4,5</sup>

Las arritmias cardiacas se deben a cualquier cambio en el sistema de conducción eléctrica normal del corazón, es decir, que el corazón lata de manera irregular. Una arritmia puede ser un ritmo cardiaco anormalmente lento (bradicardia) o anormalmente rápido (taquicardia).

Las taquicardias supraventriculares (TSV) son arritmias causadas por la formación anormal, rápida y paroxística del impulso eléctrico del corazón; es una taquiarritmia que se origina por encima de la bifurcación del haz de His, el cual es un grupo de fibras que transportan impulsos eléctricos a través del centro del corazón.

##### 3.1.1 Síntomas.<sup>6</sup>

Los síntomas comunes abarcan:

- Dolor torácico.
- Desmayos.
- Latidos cardíacos rápidos o lentos (palpitaciones).
- Mareo, vértigo.
- Palidez.
- Dificultad para respirar.
- Latidos intermitentes: cambios en el patrón del pulso.
- Sudoración.



### 3.1.2 Causas.<sup>6</sup>

Las arritmias pueden ser causadas por diferentes factores:

- Enfermedad arterial coronaria.
- Desequilibrios de electrolitos en la sangre (como el sodio o potasio).
- Cambios en el músculo cardíaco
- Lesión de un ataque al corazón .
- Proceso de curación después de una cirugía de corazón.
- Ritmos irregulares del corazón.

### 3.1.3 Tratamiento.<sup>1,7,8</sup>

El tratamiento de las arritmias cardíacas incluye diversas opciones terapéuticas: fármacos antiarrítmicos, marcapasos cardiodesfibriladores o cirugía. La elección de un fármaco antiarrítmico se basa principalmente en la experiencia individual y estudios clínicos realizados.

Han sido divididos en cuatro grupos:

Grupo I. Fármacos que bloquean los canales de sodio dependientes del voltaje.

IA características:

Anticolinérgicos.

Prolongan la repolarización.

Cinética intermedia.

Prolongan la duración del potencial de acción.

Ejemplos: procainamida, disopiramida y quinidina.



IB características:

Cinética rápida.

Reducen o acortan el potencial de acción.

Ejemplos: lidocaina, mexiletina, tocainida y morizacina.

IC características:

Cinética lenta.

Prolongan ligeramente el potencial de acción.

Ejemplos: **propafenona**, flecainida y encainida.

Grupo II. Fármacos que actúan bloqueando receptores  $\beta$ - adrenérgicos.

Ejemplos: propranolol, metoprolol, nadolol y atenolol.

Grupo III. Bloqueadores de los canales de potasio. Fármacos que prolongan la duración del potencial de acción y, por lo tanto, del periodo refractario.

Características:

Antiadrenérgicos.

Prolongan la repolarización.

Ejemplos: bretilio, amiodarona, sotalol y azimilida.

Grupo IV. Fármacos que bloquean los canales de calcio dependientes del voltaje tipo L.

Ejemplos: verapamilo, diltiazem y bepridil.



### 3.2 Propafenona.<sup>1,9,10</sup>

La propafenona es un antiarrítmico del grupo 1C (mencionado anteriormente), bloqueador de canales de sodio, antagonista de los receptores -  $\beta$  adrenérgicos y débil antagonista de calcio, disminuye la conducción auricular, ventricular del nódulo del sistema His-Purkinje y las vías accesorias.

#### 3.2.1 Propiedades Fisicoquímicas.<sup>1,10</sup>

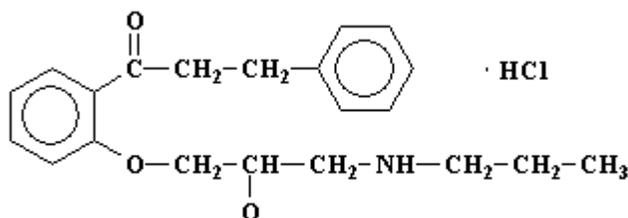


Fig. 1. Estructura química de clorhidrato de propafenona.

#### Denominación química:

1-[2-[2-Hidroxi-3-(propilamino) propoxi] fenil]-3-fenil-1-propanona.

**Fórmula condensada:**  $C_{21}H_{27}NO_3$

#### Composición cuantitativa:

H: 7.97%

C: 73.87%

N: 4.10%

O: 14.06%

**Peso molecular:**

Propafenona: 341.45 g/mol

Clorhidrato de propafenona: 377.91 g/mol

**Solubilidad**

Baja solubilidad en alcoholes alifáticos, soluble en agua (20°C), cloroformo y etanol e insoluble en éter.

**Aspecto físico:** Cristales finos color blanco.

**Constante de disociación:** pKa 9.0

**Espectro UV:** 210 nm.

**3.2.2 Farmacodinamia.**<sup>11</sup>

La propafenona reduce la corriente interna de sodio en las células del miocardio y las fibras de purkinje. También posee una potente eficacia bloqueadora beta; reduce la velocidad de incremento del potencial de acción y por ello disminuye la conducción de los impulsos (efecto dromotrópico negativo). Prolonga los periodos refractarios en la aurícula, en el nódulo auriculoventricular y en los ventrículos, y amplía también los periodos refractarios de las vías accesorias en pacientes con síndrome de Wolff-Parkinson-White (WPW).

El síndrome de Wolff Parkinson White es una enfermedad cardíaca infrecuente que se puede presentar con arritmias cardíacas y electrocardiograma característico.



### 3.2.3 Farmacocinética.<sup>1,3,8,9,10,11</sup>

La propafenona se absorbe bien desde el sistema gastrointestinal, su biodisponibilidad es reducida en aproximadamente un 50% ya que sufre metabolismo de primer paso por el hígado para formar varios metabolitos.

El metabolismo de propafenona es mediado por CYP2D6. Su principal vía metabólica es la hidroxilación del anillo de 5-OH-propafenona, siendo principalmente mediado por este complejo.

Una ruta adicional es la N-desmetilación a N-despropilpropafenona, por la vía de CYP3A4 y CYP1A2. (Figura 2)

En más del 90% de los pacientes, el fármaco es metabolizado de forma rápida y extensa con una semivida de eliminación de 2 a 10 horas, y puede ser hasta de 10 a 32 horas en personas con metabolismo lento (menos del 10% de los pacientes).

En los metabolizadores rápidos, la vía de hidroxilación saturable (CYP2D6) produce una farmacocinética no lineal. Mientras que en metabolizadores lentos, la farmacocinética del clorhidrato de propafenona es lineal.

El clorhidrato de propafenona presenta un grado considerable de variabilidad individual en la farmacocinética, que se debe principalmente al efecto hepático de primer paso y a la farmacocinética no lineal en los metabolizadores rápidos.

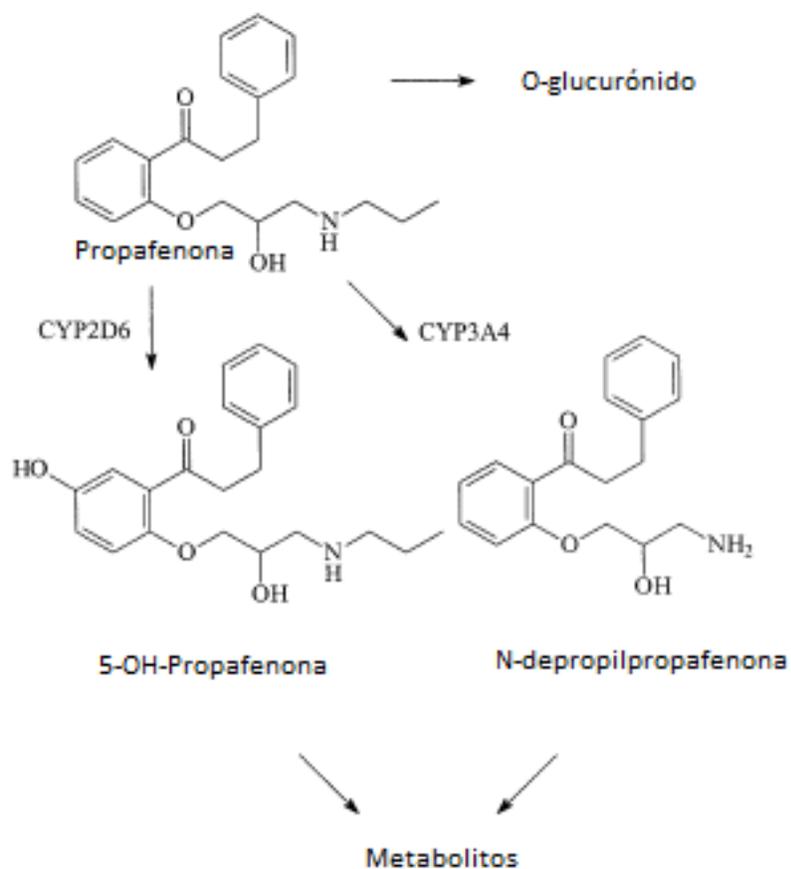


Fig. 2 Vía metabólica de propafenona.

### 3.2.4 Constantes farmacocinéticas.<sup>1,8,10,25</sup>

Biodisponibilidad: 50%

Vida media en plasma: 2 a 32 horas

Depuración plasmática: 11 mL/min/kg

Volumen de distribución:  $3.6 \pm 2.1$  L/kg



Unión a proteínas: 85-95% (Se une en el 95% a la  $\alpha$ -1 glucoproteína ácida)

Cmáx. 189.9 +/- 20.92 ng/mL

Tmáx: 1.5 h

Dosis:

Adultos: 150 mg/8 horas o 300 mg/12 horas, eventualmente puede ser necesario elevar la dosis a intervalos de tres o cuatro días hasta alcanzar un máximo de 300 mg tres veces al día.

Ancianos y pacientes por debajo de 70 Kg de peso requieren dosis inferiores.

En niños: 10-20 mg/kg/día, repartidos en 3-4 tomas.

### **3.2.5 Interacciones medicamentosas.**<sup>3,11</sup>

- Amiodarona: posible potenciación de la toxicidad, arritmias por adición de sus efectos sobre la prolongación del intervalo QT.
- Se ha registrado aumento de los niveles plasmáticos de ciertos fármacos con posible potenciación de su acción y/o toxicidad por inhibición de su metabolismo hepático, ejemplo: betabloqueantes (metoprolol y propranolol), ciclosporina, digoxina, teofilina, warfarina, etc.
- Inductores enzimáticos (fenobarbital, rifampicina): descenso en los niveles plasmáticos de propafenona.
- Ketoconazol: potenciación de la toxicidad del antiarrítmico.
- Lidocaína: potenciación de la toxicidad de ambos fármacos.



- Piridostigmina: posible inhibición del efecto antimastéxico de piridostigmina, por antagonismo con la acción anticolinérgica de propafenona.
- Quinidina, cimetidina: aumento de los niveles plasmáticos de propafenona, principalmente en acetiladores rápidos.

### 3.2.6 Efectos adversos.<sup>12</sup>

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, infrecuentes aunque moderadamente importantes.

**Frecuentemente (10-25%):** mareos, alteraciones del gusto, náuseas, vómitos, estreñimiento y bloqueo auriculoventricular.

**Ocasionalmente (1-9%):** alteraciones cardiovasculares (alteraciones de la conducción cardíaca, angina de pecho, insuficiencia cardíaca, palpitaciones, taquicardia ventricular), alteraciones digestivas (dolor en el abdomen, sequedad de boca, estreñimiento o diarrea, flatulencia), visión borrosa, disnea, cefalea, astenia y tinnitus (zumbido, susurro o sensación pulsátil en los oídos), vómito, resequedad de boca, erupciones cutáneas, etc.

**Raramente (<1%):** ictericia colestática, hepatitis, agranulocitosis y trombocitopenia, temblor, hipotensión arterial, bradicardia, taquiarritmias supraventriculares, agranulocitosis, etc.

**Excepcionalmente (<<1%):** lupus eritematoso sistémico con títulos positivos de anticuerpos antinucleares.



La medición de la concentración plasmática puede ser fundamental para reducir al mínimo el riesgo de toxicidad del analito. En general, se prefiere la utilización de métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución, debido a que estos son selectivos y capaces de discernir el compuesto de interés de sustancias endógenas; existen métodos analíticos reportados en la literatura para cuantificar propafenona, sin embargo, se pretende contar con una técnica robusta; con estabilidad suficiente y tiempos de retención que permitan analizar un mayor número de muestras.

### **3.2.7 Métodos analíticos para cuantificar propafenona en plasma.**

2,10,23,24

En la literatura se encuentran reportados varios métodos analíticos para cuantificar propafenona, las condiciones de algunos de ellos se resumen en la tabla 1.



Tabla 1. Condiciones cromatográficas de algunos métodos por CLAR para cuantificar propafenona.

Detección	Matriz biológica	Método de extracción y estándar interno utilizado	Condiciones cromatográficas	Tiempo de retención	Referencia
CLAR con detector fluorescencia	Plasma	Se alcaliniza con 150 $\mu$ L de NaOH 0.25M, se adiciona 3.5 mL de éter dietílico: diclorometano (50:50% v/v), mezcla durante 2 min, centrifuga 800g 5 min y evapora con nitrógeno, reconstituyendo con 200 $\mu$ L fase móvil.  (Estándar interno) Clorhidrato de propranolol 25 $\mu$ L de 10 $\mu$ g/mL	Fase móvil: Fosfato de potasio monobásico 50 mM (pH 3.2): acetonitrilo (70:30 %v/v). Flujo 1 mL/ min. Temperatura (21°C ) $\lambda$ 200 nm (longitud de onda de excitación) y 210 nm (longitud de onda de emisión). Columna C18 de fase inversa (5 $\mu$ m, 150 x 3.9 mm)	Propranolol 2.6 min Propafenona 6.8 min	2
CLAR con detector fluorescencia	Plasma	Se utiliza mezcla de disolventes: éter dietílico y diclorometano (50:50 % v/v). Reconstitución con 200 $\mu$ L de fase móvil.  Estándar externo propranolol (3 $\mu$ g/mL).	Fase móvil: Fosfatos de potasio monobásico 50 mM pH de 3.2 y acetonitrilo (70:30 % v/v). Flujo de 1 mL/min. Volumen de inyección 100 $\mu$ L. Columna Symmetry C18 de fase reversa de 5 $\mu$ m, 150 x 3.9 mm. $\lambda$ 200 nm y 210 nm	No reportado	10,23
CLAR detección UV	Suero	Se añade 0.5 mL 0.1 M tampón Tris (pH 12.0) Se adicionan 7 mL de cloruro de metileno, se agita durante 1000 g 10 min y transfiere la fase orgánica a un tubo cónico evaporándolo a 40°C. Reconstitución en 200 $\mu$ L	Fase móvil: Fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH 2.5: ACN (63:37% v/v). Flujo 2 mL/min Columna Altex ID C18 , 25 cm x 4 mm, 5 $\mu$ m Columna 45°C. $\lambda$ 210	No reportado	24



### 3.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).<sup>14,15,16,17,18,19</sup>

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, ya que, posee una fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, sensibilidad y capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles.

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

#### 3.3.1 Reservorio de la fase móvil.<sup>14,16,17</sup>

Es el recipiente que contiene la fase móvil, este puede ser cualquier frasco de buena calidad (vidrio o polímero resistente); en general se encuentra algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad mantenga llenas las conexiones.

A menudo, el sistema está equipado con un sistema degasificador que elimina los gases disueltos, ya que, estos pueden ocasionar flujos inestables y ensanchamiento de bandas; también es necesario evitar partículas ambientales en los líquidos, por lo que las soluciones se hacen pasar al vacío a través de un filtro millipore antes de ser introducidas en el equipo, con el mismo fin, al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero que impide el ingreso de partículas a la bomba.



### **3.3.2 Sistemas de bombeo.** <sup>16,17,18</sup>

Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil del reservorio del solvente hacia el inyector, y desde allí hasta la columna.

Cuentan con las siguientes características:

Operan con tasas de flujo de 0.1 a 10 mL/min con reproducibilidad de 0.5% relativo o mejor, generando presiones de hasta 6000 psi (lb/in<sup>2</sup>), y tienen componentes resistentes a la corrosión debido a los solventes utilizados.

En cromatografía de líquidos se utilizan dos tipos de bombas: la de tipo jeringa accionada por tornillo (desplazamiento continuo) y las de pistón (reciprocante).

#### **3.3.2.1 Bombas de desplazamiento.**

Consisten en grandes cámaras donde el solvente contenido es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón; la ventaja de estas bombas es la ausencia de pulsos ya que la cámara no requiere ser recargada, aunque cuando lo requiere presenta dificultades para hacerlo.

#### **3.3.2.2 Bombas reciprocantes.**

Proporcionan un flujo constante de fase móvil a la columna cromatográfica; consisten en una pequeña cámara en la que el disolvente es impulsado por el vaivén de un pistón, el flujo del solvente se controla mediante dos válvulas de globo unidireccionales que se abren y cierran de manera alternada. Existen varios tipos de bombas reciprocantes: de uno, dos o tres pistones, bomba tándem, bomba pistón y diafragma. Este tipo de bomba tiene dificultades con la presión e impulsos de flujo que pueden manifestarse como ruido en la línea base.



### 3.3.3 Inyector.<sup>16</sup>

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal a través del sistema, lo cual resulta ser un factor importante para obtener una buena resolución en la separación; este debe ser preciso además de ser fácil de operar, inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.

Los volúmenes que se emplean deben ser muy pequeños (de unas decimas de 1 $\mu$ L hasta 500  $\mu$ L), ya que de existir sobrecarga de inyección se puede dar un ensanchamiento de banda.

La mayor parte de los cromatógrafos actuales cuentan con autoinyectores con dispositivos para colocar las muestras a inyectar (carruseles), algunos de ellos poseen medios controlados por temperatura facilitando el almacenamiento de la muestra.

### 3.3.4 Detector.<sup>16</sup>

Es la parte del equipo cromatográfico que permite revelar en tiempo y espacio las sustancias eluidas a la salida de la columna.

Pueden ser de dos tipos:

- a) Generales. Detectores que se basan en la medición de alguna propiedad de la fase móvil, como el detector de índice de refracción, conductividad y densidad.
- b) Selectivos. Detectores sensibles a alguna propiedad del soluto, como la señal que proporciona la absorbancia en el UV, fluorescencia, electroquímico, masas.



Características:

- Sensibilidad apropiada.
- Cumplir linealidad.
- Poseer buena relación señal/ruido.
- Conservación de la muestra (no destrucción del soluto).
- No contribuir al ensanchamiento de banda.
- No ser afectado por cambios de temperatura y flujo de la fase móvil.

#### **3.3.4.1 Detector UV.**

Opera en el rango de 190 a 350 nm o es posible extenderse a la zona UV/visible (350 a 700 nm), poseen volúmenes de celda de 1 a 10  $\mu\text{L}$  para evitar el ensanchamiento de banda extracolumnar, tienen forma de Z y generalmente son de doble haz.

Existen dos tipos:

- Fotométricos o de onda fija: operan a longitudes de onda prefijadas, y utilizan lámparas de deuterio y mercurio de baja presión.
- Detectores de onda variable o espectrofotométricos: cuentan con una red de difracción que permite seleccionar libremente la longitud de onda y emplean una lámpara de emisión continua de deuterio o de xenón.

#### **3.3.4.2 Detectores de fluorescencia.**

Se basan en la detección de sustancias que presentan fluorescencia natural o por derivatización, presentan alta sensibilidad y selectividad; podrían presentarse inconvenientes incluso debido al oxígeno disuelto en la fase móvil que puede amortiguar la fluorescencia.



Los cromatogramas resultantes se obtienen representando la intensidad de la emisión de fluorescencia frente al tiempo de retención.

#### **3.3.4.3 Detector electroquímico.**

Este tipo de detector es más sensible que el UV, detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, emplea un electrodo de referencia y uno de trabajo. Se basa en la amperometría, voltamperometría, coulombimetría y conductimetría.

#### **3.3.4.4 Detector de índice de refracción.**

Mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es muy poco sensible y puede ser afectado por cambios de temperatura.

#### **3.3.4.5 Detector de absorción en el infrarrojo.**

Puede tratarse de un instrumento de filtro o transformada de Fourier, las celdas son semejantes a los de UV excepto que las ventanas son de cloruro de sodio o fluoruro de calcio, con volúmenes de 1.5 a 10  $\mu\text{L}$ .

#### **3.3.4.6 Detector de masas.**

Se trata de un instrumento de análisis que determina la masa molecular de compuestos químicos de acuerdo con su relación masa/carga. Se basa en la ionización de las moléculas de soluto en una fuente iónica y en la separación de los iones generados. El acoplamiento con este detector tiene alta selectividad porque es posible diferenciar entre dos analitos que tengan el mismo tiempo de retención ya que se puede detectar solo una masa seleccionada. Proporciona masa molecular, información estructural y análisis cuantitativo exacto.



### 3.3.5 Columna.<sup>15,16,17</sup>

Es la parte fundamental de la separación, está constituida por un tubo angosto relleno con un sólido inerte finamente dividido que mantiene la fase estacionaria en su superficie, contiene partículas generalmente sólidas de 3, 5 o 10  $\mu\text{m}$  con una superficie microporosa.

En fase reversa la fase estacionaria es apolar, principalmente hidrocarburos; mientras que la fase móvil es un disolvente relativamente polar como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

### 3.3.6 Selección de fase móvil.<sup>14</sup>

Las interacciones de las moléculas de la muestra con la fase móvil o la fase estacionaria son el resultado de interacciones hidrofóbicas, dipolo, puentes de hidrógeno o interacciones dieléctricas, definiendo las mismas la afinidad de cada uno de los componentes de la muestra, de tal forma que el más afín a la fase estacionaria se retiene y tardará más en eluir; es por ello que, es de vital importancia la correcta elección de la fase móvil de acuerdo a las propiedades del analito.

Para que un solvente se considere apropiado para CLAR debe contar con las siguientes características: baja reactividad, alto grado de pureza, compatibilidad con el detector (longitud de onda de absorción), viscosidad y punto de ebullición bajos. Asimismo, se debe considerar la solubilidad, miscibilidad, y polaridad.

Los disolventes utilizados en CLAR pueden ser desde agua, soluciones amortiguadoras, hasta solventes orgánicos como, acetonitrilo, metanol o mezcla los mismos.



El sistema de elución puede ser de dos tipos:

- Isocrático: La composición de la fase móvil permanece constante durante todo el análisis.
- Gradiente: Cuando se cambia la composición de la fase móvil durante el análisis, por lo que la polaridad cambia sistemáticamente.

### **3.3.7 Registrador de señales.**<sup>16</sup>

La señal que se emite del compuesto separado por la columna es registrada por un graficador que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y, o bien, un integrador donde se obtiene un cromatograma para su tratamiento matemático y el cálculo de concentraciones.

Hay computadoras con un software apropiado para llevar a cabo el registro gráfico y cálculo de concentraciones.

#### **3.3.7.1 Cromatograma.**<sup>17,18</sup>

Se define como un gráfico que responde a la señal de la concentración del soluto representada por un pico, el cual puede dar información cualitativa y cuantitativa.

Cualitativamente: el tiempo de retención del componente en cuestión se mantiene constante bajo las mismas condiciones cromatográficas, de tal manera que es posible su identificación.

Cuantitativamente: el área del pico es proporcional a la cantidad del componente inyectado por lo que podemos llevar a cabo su cuantificación.



La figura 3 representa una separación cromatográfica de dos analitos;  $t_0$  representa el tiempo muerto,  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención de los analitos en cuestión,  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de los picos,  $h$  la altura,  $h/2$  la mitad de la altura y  $W_{h/2}$  el ancho a la altura media.

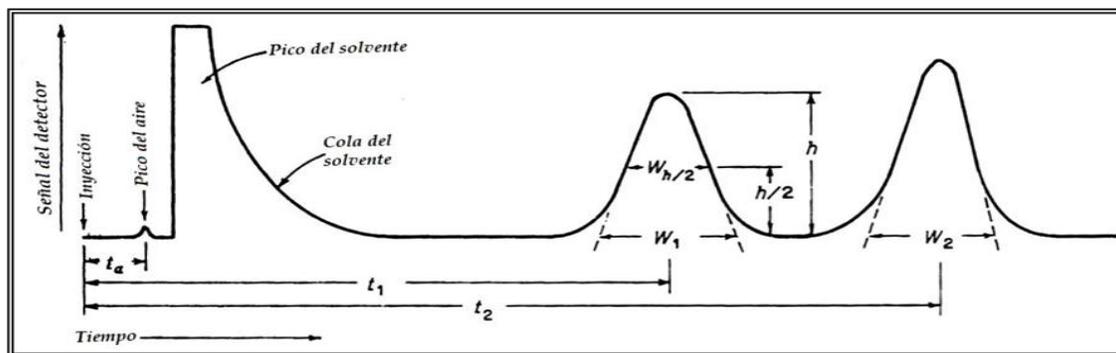


Fig. 3 Representación de un cromatograma.

### 3.3.7.2 Parámetros cromatográficos. <sup>15,18</sup>

#### Constante de distribución (Kc).

Se debe a la transferencia del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil.



$$K_c = [A] E / [A] M$$

[A] E = Actividad del soluto en la fase estacionaria.

[A] M = Actividad del soluto en la fase móvil.

#### Tiempo de retención (tr).

Tiempo que transcurre desde la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto.

**Tiempo muerto ( $t_0$ ).**

Tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector (solvente que se encuentra en la muestra problema).

**Tiempo de retención neto o relativo ( $t'_r$ ).**

Diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$t'_r = t_r - t_0$$

**Factor de capacidad ( $k'$ ).**

Parámetro experimental que no depende de la forma de la columna o de la tasa de flujo volumétrico, se define como:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

El factor de retención menor que la unidad se debe a que el soluto emerge de la columna en un tiempo cercano al tiempo muerto.

**Factor de selectividad (siempre es mayor que 1).**

Define el grado de separación de los picos

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$K_B$  = Constante de distribución para la especie más fuerte retenida.

$K_A$  = Constante de distribución para la especie menos retenida.

**Número de platos teóricos.**

Proporciona una idea sobre la eficacia separativa de una columna, plato teórico puede definirse como la región en que la concentración de soluto en las dos fases es la misma equivalente al número de equilibrios entre el soluto y el ligando.

A mayor valor de N mejor es la calidad del pico.

Para los picos gaussianos se calcula:

$$N = 16 (t / W)^2$$

W = magnitud de la base del triángulo.

t = tiempo de retención.

**Resolución cromatográfica.**

Este parámetro señala que tan separadas están dos bandas en relación con sus anchos; proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos, un valor de 1.5 permite una separación esencialmente completa.

$$R_s = 2[(t_R)_B - (t_R)_A] / W_A + W_B$$

**Simetría.**

Factor de simetría o simetría se define como el cociente del ancho del pico W, entre dos veces la distancia (f) del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico.

(Ver figura 4)

$$T = W_{0.05} / 2f$$

$W_{0.05}$  = Semianchura del pico tomada al 5% de la altura del pico, por encima de la línea base.

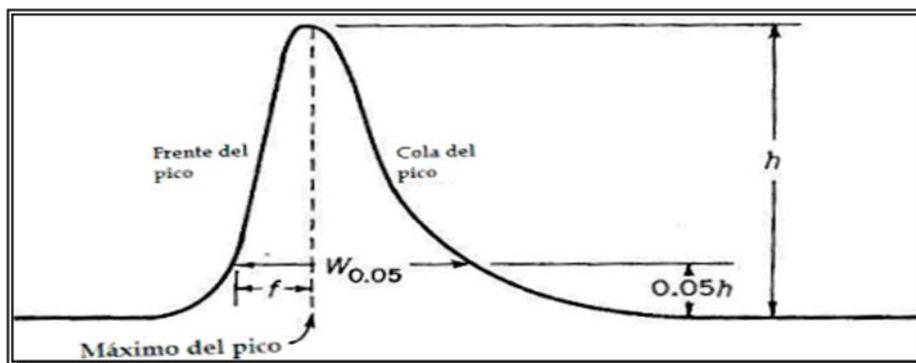


Fig. 4 Representación del factor de coleo.

### 3.4 Optimización de métodos analíticos.<sup>16</sup>

El primer paso en el proceso de optimización de métodos es el ajuste de parámetros cromatográficos descritos anteriormente. Se busca la separación de los componentes de la muestra a evaluar, lo cual se ve reflejado en la resolución; en este parámetro están inmersos el factor de selectividad, factor de capacidad y eficiencia.

La selectividad del sistema depende de la naturaleza de los componentes, fase móvil, columna y muestra, de tal manera que se realizan modificaciones en los mismos para conseguir la mejor resolución.

El factor de capacidad es un parámetro que se varía ajustando la fuerza de la fase móvil, por ejemplo a mayor proporción de agua, mayor retención por lo tanto mayor  $k'$ .

La regulación de la eficiencia depende del número de platos teóricos, los cuales pueden aumentarse de diversas formas como: aumentando la temperatura, empleando columnas más largas, usando partículas de menor diámetro, empleando columnas nuevas o regeneradas, etc.



### **3.5 Validación de métodos analíticos.**<sup>20,21</sup>

La validación se define como la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y deben incluir, como mínimo, los parámetros que se describen a continuación:

#### **3.5.1 Selectividad.**

Este parámetro determina si el método es capaz de diferenciar al analito de interés de otras sustancias que puedan interferir en su cuantificación, por ejemplo: compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante.

#### **3.5.2 Curva de calibración.**

Conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar, se establece en función de las concentraciones esperadas.

#### **3.5.3 Linealidad.**

Se define como la relación matemática existente entre la concentración a evaluar con respecto a la respuesta observada.

#### **3.5.4 Puntos de control de calidad**

Concentraciones baja, media y alta diferentes a los puntos de la curva de calibración pero dentro del rango establecido en la misma.



Sirven como criterio de aceptación o rechazo de una corrida analítica: 2 de 6 muestras control, pueden estar fuera de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal.

### **3.5.5 Recuperación absoluta.**

Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

### **3.5.6 Precisión.**

Nos indica que tan variable es el método cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

#### **3.5.6.1 Repetibilidad.**

Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

#### **3.5.6.2 Reproducibilidad intralaboratorio.**

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 o analistas.

### **3.5.7 Exactitud.**

Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.



### **3.5.8 Límite de cuantificación y detección.**

Límite de cuantificación: concentración más baja del compuesto que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Límite de detección: concentración mínima cuya señal puede distinguirse de la basal, nos indica que tan sensible es el método.

### **3.5.9 Estabilidad de la muestra.**

Propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características; en función de su estabilidad se establecen las condiciones de almacenamiento y de trabajo desde el momento del muestreo hasta su análisis.

### **3.5.10 Tolerancia del método.**

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante la ejecución del método variando algunas condiciones operacionales como: modificaciones en pH, fase móvil, longitud de onda, temperatura, cambio de equipo cromatográfico, etc.



## **4. Parte experimental.**

### **4.1 Equipos, materiales y reactivos.**

#### **4.1.1 Equipos e instrumentos.**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, que consta de :

Bomba Waters 600, No. Serie: L026CE699T

Detector UV Waters 486, No. Serie: MX6BM6066M

Automuestreador Waters 717 plus, No. Serie: B0371P86AM

Degasser Jasco DG-2080-54

Horno Metalox Modelo 200C High tem column oven

- Balanza analítica Sartorius TE214S.
- Balanza granataria Sartorius TE3135.
- Centrífuga refrigerada Rotina 35R.
- Sistema Generador de agua grado cromatográfico Millipore Elix 5.
- Vórtex Maxi mix.
- Vórtex Multireax.
- Baño de ultrasonido CREST.
- Micropipetas Eppendorf de volumen variable 200  $\mu$ L y 1 mL.
- Repetidora electrónica Eppendorf.
- Refrigerador vertical Nieto.
- Ultracongelador. New Brunswick Scientific, U410 Premium



#### 4.1.2 Materiales.

- Matraces volumétricos de 10,20, 50, 1000 y 2000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 3 y 4 mL.
- Vasos de precipitados de 250, 500mL.
- Frascos reservorios de 1 y 2 L.
- Tubos Eppendorf de 2 mL.
- Puntas para micropipeta.
- Combitips diferentes volúmenes para repetidora Eppendorf.
- Criocajas, Gradillas.
- Probetas de 500,1000, 2000 mL.

#### 4.1.3 Reactivos y disolventes.

- Fosfato monobásico de potasio, J.T Baker, grado reactivo.
- Metanol, J.T. Baker, grado cromatográfico.
- Acetonitrilo J.T. Baker, grado cromatográfico.
- Agua grado CLAR. Obtenida del sistema Milli Q.
- Acido fosfórico J.T Baker, grado reactivo.
- Diclorometano J.T Baker, grado cromatográfico.
- Hexanos J.T Baker, grado cromatográfico.

#### 4.1.4 Sustancias de referencia.

- Propafenona clorhidrato. Sustancia de referencia secundaria  
Lote SEC-26-10-001. Fecha de caducidad: Ene-11
- Fenitoina Sódica. Sustancia de referencia de trabajo  
Lote DHS-050707-1S. Fecha de caducidad: 13 Oct 2011



#### 4.1.5 Preparación de soluciones.

- Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 10 mM pH 2.5  $\pm$  0.05.

Pesar 1.3609 g de fosfato de potasio monobásico y colocar en un matraz volumétrico de 1 L. Disolver y llevar a volumen con agua grado cromatográfico. Ajustar a pH de 2.5  $\pm$  0.05 con ácido fosfórico concentrado. Filtrar en membrana de 0.4  $\mu$ m.

- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 10 mM pH 2.5  $\pm$  0.05 : ACN (65:35 %v/v).

Mezclar en frasco reservorio de 1 L, 650 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 10 mM pH 2.5  $\pm$  0.05 con 350 mL de acetonitrilo, previamente filtrado en membrana de 0.4  $\mu$ m. Sonicar durante 5 min.

- Solución de lavado de inyector Agua: Acetonitrilo (30:70%v/v).

Mezclar en un frasco reservorio de 1 L, 300 mL de agua y 700 mL de acetonitrilo filtrar a través de una membrana de 0.40  $\mu$ m y sonicar durante 5 min.

- Mezcla de solventes Diclorometano:Hexanos (70:30 %v/v).

Mezclar en frasco reservorio de 1 L, 700 mL de Diclorometano y 300 mL de Hexanos.



- Solución de referencia de propafenona, 500 µg/mL (solución A).

Pesar el equivalente a 10.0 mg de sustancia de referencia de propafenona, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de propafenona, 100 µg/mL (solución B).

Transferir 4.0 mL de la solución A de propafenona (500 µg/mL) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de propafenona, 10 µg/mL (solución C).

Transferir 0.4 mL de la solución A de propafenona (500 µg/mL) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de propafenona, 5 µg/mL (solución D). Utilizar en sistema.

Transferir 0.5 mL de la solución B de propafenona (100 µg/mL) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de propafenona, 1 µg/mL (solución E).

Transferir 1.0 mL de la solución C de propafenona (10 µg/mL) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.



- Solución de referencia de propafenona, 0.5 µg/mL (solución F).

Transferir 0.5 mL de la solución C de propafenona (10 µg/mL) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de fenitoina, 1000 µg/mL (solución I).

Pesar el equivalente a 10.0 mg de sustancia de referencia de fenitoina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de fenitoina, 100 µg/mL (solución II).

Transferir 1 mL de la solución I de fenitoina (1000 µg/mL) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de referencia de fenitoina, 10 µg/mL (solución III).

Transferir 0.5 mL de la solución I de fenitoina (1000 µg/mL) a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

- Solución de adecuabilidad del sistema (propafenona, fenitoina 1.5 µg/mL respectivamente).

Transferir con micropipeta repetidora 3 mL de la solución C de propafenona (10 µg/mL) y 0.03 mL de la solución I de fenitoina (1000 µg/mL) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con fase móvil. Dividir la solución en alícuotas de aproximadamente 2 mL en tubos eppendorf y almacenar en congelación (-40° a -80°C).



## 4.2 Optimización de método analítico.<sup>2,10,22,23,24</sup>

Para iniciar con la optimización del método analítico se hizo uso de la información de la tabla 1 pág. 15. Basándose en los métodos reportados en bibliografía se realizaron pruebas para obtener las mejores condiciones en: simetría del pico, tiempo de retención, eficiencia de la columna y selectividad.

### 4.2.1 Selección de columna.

Se encontró reportado en la literatura la utilización de columnas C18 para la cuantificación de propafenona, de manera tal que se probaron las siguientes:

- Xterra RP18, 5 $\mu$ m, 150 x 4.6 mm.

Columna de tecnología de partícula híbrida que contiene un grupo polar embebido para compuestos básicos.

- Zorbax eclipse XDB C18, 5 $\mu$ m, 100 x 4.6 mm

Este tipo de columna se caracteriza por tener base desactivada y doble endcapping que evita los silanoles libres que puedan interaccionar coleando las bases.

- Pursuit C18, 5 $\mu$ m, 150 x 4.6 mm.

Columna de sílica pura que tiene mínima actividad silanólica debido al endcapping de grupos residuales.

Dichas columnas fueron elegidas de acuerdo a sus características esperando obtener parámetros cromatográficos aceptables tales como picos simétricos y platos teóricos mayores a 2000.



#### **4.2.2 Fase móvil.**

Tomando en cuenta lo reportado en la literatura se preparó una solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico a una concentración de 10 mM pH 2.5 para preparar fase móvil con acetonitrilo variando la proporción con la finalidad de obtener un tiempo de corrida donde el método fuera selectivo. Cada fase móvil probada se filtro por membrana de 0.4  $\mu\text{m}$  y sonicó por 5 minutos.

#### **4.2.3 Selección de la longitud de onda.**

Se realizaron inyecciones de una solución de propafenona 1  $\mu\text{g/mL}$  estableciendo longitudes de onda reportadas en la literatura (200, 210, 220 nm). Se definió aquella donde se obtuvo la mayor área para el analito.

#### **4.2.4 Definición de rango de trabajo.<sup>2</sup>**

Basándose en el  $C_{\text{max}}$  189.9 +/- 20.92 ng/mL para una dosis de 150 mg (reportado en bibliografía), se define el rango de la curva tomando como límite de cuantificación el 10% del valor inferior reportado (170.0 ng/mL) que da un valor de 17.0 ng/mL y como límite superior, se toma en cuenta el 200 % del valor superior reportado (210.0 ng/mL) que equivale a 500.0 ng/mL de tal forma que el rango de la curva se define de 15 a 600 ng/mL (0.015 - 6.0  $\mu\text{g/mL}$ ).



#### **4.2.5 Selección del Estándar Interno (E.I.)**

Para la selección del E.I. se probaron varios analitos: primidona, diclofenaco, cefalexina, fenitoína. Su elección dependió de la obtención de pico simétrico y un tiempo de retención donde no se presentaran interferencias.

#### **4.2.6 Temperatura de columna y automuestreador.**

Se estableció una temperatura de 30° C para la columna cromatográfica y 5° C para el automuestreador. Ambas temperaturas se mantuvieron constantes durante la optimización.

#### **4.2.7 Volumen de inyección, velocidad de flujo.**

El volumen a inyectar fue de 20 µL con una velocidad de flujo de 1mL/min para realizar pruebas.

#### **4.2.8 Método de extracción.**

En primera instancia se probó el método de extracción por precipitación de proteínas, realizándolo con disolventes como: metanol, sulfato de zinc y mezcla de los mismos.

También se llevo a cabo una extracción líquido- líquido probando solventes como: Diclorometano, Hexanos, Éter: Hexanos 30:70 %v/v, Diclorometano: Hexanos 70: 30 % v/v, mencionados en las referencias descritas (Tabla 1 pág. 15). El método y solvente de extracción se eligieron con base en la selectividad del blanco de plasma y al recobro del analito de interés.

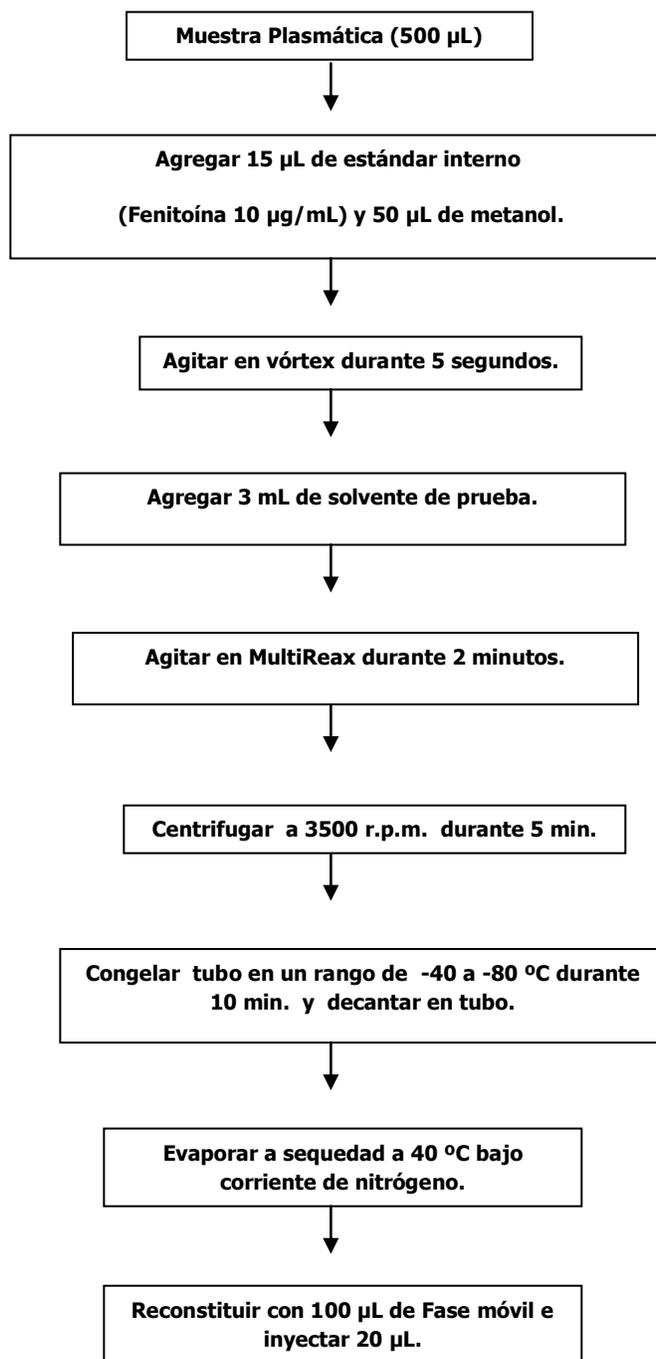


Fig. 5 Método de extracción de prueba.



### 4.3 Validación del método analítico.<sup>20</sup>

#### 4.3.1 Preparación de las curvas de calibración y muestras de control de calidad.

Depositar en tubos con tapón de rosca las alícuotas de la solución de propafenona, fenitoína (estándar interno) y el volumen necesario de metanol para ajustar el volumen de las muestras en sistema o método, según corresponda.

Para la preparación de los puntos control de calidad en sistema realizarla de acuerdo a la tabla 2, adicionando 900  $\mu\text{L}$  de fase móvil.

Para la preparación de las curvas y puntos control de calidad del método realizarla de acuerdo a la tabla 3, adicionando 500  $\mu\text{L}$  de plasma y proceder con el método de extracción.

- Blanco de reactivos: fase móvil.
- Blanco de plasma: en un tubo con tapón de rosca agregar 500  $\mu\text{L}$  de plasma ,65  $\mu\text{L}$  de metanol. Agitar y proceder con el método de extracción.
- Blanco de plasma con estándar interno: en un tubo con tapón de rosca agregar 500  $\mu\text{L}$  de plasma, 50  $\mu\text{L}$  de metanol y 15  $\mu\text{L}$  de la solución de referencia de fenitoina de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Agitar y proceder con el método de extracción.



Tabla 2. Preparación de puntos control de sistema para evaluar recobro.

<b>μL Solución D propafenona (5 μg/mL)</b>	<b>μL Solución C propafenona (10 μg/mL)</b>	<b>μL Solución B propafenona (100 μg/mL)</b>	<b>μL Solución II fenitoína (100 μg/mL)</b>	<b>Metanol (μL)</b>	<b>Concentración propafenona (μg/mL)</b>
45	-	-	15	5	0.225*
-	45	-	15	5	0.450 *
-	-	25	15	25	2.500 *

\*Puntos de Control de calidad

Los puntos control en sistema se encuentran concentrados 5 veces de acuerdo al método de extracción ya que se parte de una muestra de 500 μL y se reconstituye en 100 μL.



Tabla 3. Preparación de curva de calibración y puntos control de Método.

<b>µL Solución F propafenona (0.5 µg/mL)</b>	<b>µL Solución E propafenona (1 µg/mL)</b>	<b>µL Solución C propafenona (10 µg/mL)</b>	<b>µL Solución III fenitoína (10 µg/mL)</b>	<b>Metanol (µL)</b>	<b>Concentración propafenona (µg/mL)</b>
10	-	-	15	40	0.010 ***
15	-	-	15	35	0.015 **
30	-	-	15	20	0.030
45	-	-	15	5	0.045*
-	30	-	15	20	0.060
-	40	-	15	10	0.080
-	45	-	15	5	0.090*
-	50	-	15	-	0.1000
-	-	10	15	40	0.200
-	-	15	15	35	0.300
-	-	25	15	25	0.500*
-	-	30	15	20	0.600

\*\*\*Límite de Detección \*\*Límite de Cuantificación \*Control Bajo, Medio y Alto



#### 4.3.2 Descripción del método analítico.

La cuantificación de propafenona se realizó haciendo uso de las condiciones cromatográficas anteriores y el método de extracción líquido-líquido que se describe a continuación:

Depositar las alícuotas en tubos con tapón de rosca y agregar a cada tubo 500  $\mu\text{L}$  de plasma. Agitar cuidadosamente en vórtex durante 5 segundos y procesar las muestras plasmáticas de acuerdo a lo descrito en el siguiente diagrama de extracción.

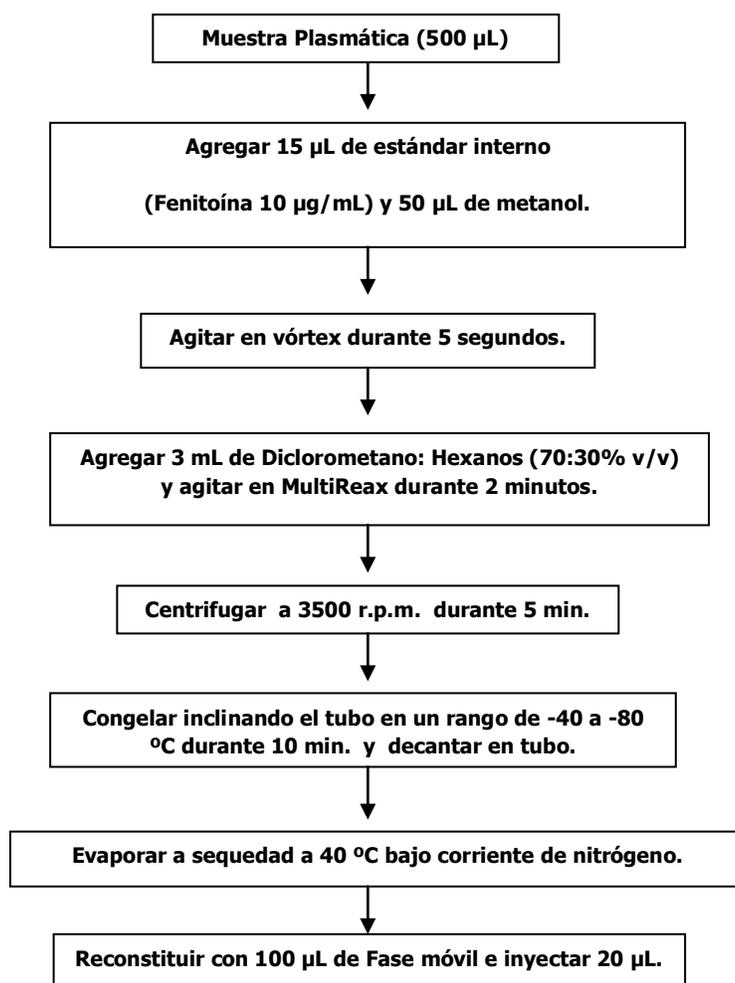


Fig. 6 Diagrama de extracción



### 4.3.3 Corrida analítica.

Las muestras de la curva patrón y los puntos control de calidad (bajo, medio y alto) se prepararon cada día en función de las actividades señaladas en el cronograma de acuerdo a los parámetros de validación establecidos.

### 4.3.4 Adecuabilidad del Sistema.

Con el fin de evaluar la adecuabilidad del sistema y llevar un monitoreo de la columna cromatográfica, se realizaron un mínimo de seis inyecciones consecutivas de 20  $\mu$ L de la solución de adecuabilidad, mismas que fueron procesadas de acuerdo al método de integración empleado para cuantificar las muestras plasmáticas.

El sistema se consideró adecuado al cumplir con los criterios de cada uno de los siguientes parámetros:

Tabla 4. Parámetros de aceptación para adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Criterio
Repetibilidad (área de pico)	C.V. $\leq$ 2.0%
Repetibilidad (tiempo de retención)	C.V. $\leq$ 2.0%
Resolución	$\geq$ 1.5
Simetría del pico (USP)	Promedio $\leq$ 2.0
Platos teóricos	Promedio $\geq$ 2000



Antes de cada corrida se evaluó: la selectividad del sistema: inyectando un blanco de plasma, plasma con estándar interno y un blanco de reactivos.

También se realizó la prueba de acarreo, para la cual se inyectó un blanco de reactivos, la concentración más alta de la curva seguida de un blanco de reactivos. No debían presentarse interferencia en ninguno de los blancos de reactivos.

#### **4.3.5 Método de Procesamiento.**

El integrador computacional Empower, fue utilizado para determinar el área de propafenona y fenitoina para obtener la relación de áreas (y), la cual fue ajustada a la concentración de propafenona correspondiente (x), por medio de un análisis de regresión  $y = mx + b$ , donde b es la ordenada y m es la pendiente de la curva de calibración, con ponderación  $1/X$ . La concentración experimental (recuperada) fue obtenida introduciendo la relación de áreas de propafenona/fenitoina en la ecuación de la línea recta generada.

#### **4.3.6 Descripción de la muestra biológica.**

El fluido biológico utilizado en la validación del método fue plasma humano fresco congelado (anticoagulante citratos), proporcionado por Servicios Hematológicos S. A. que resultó negativo a las pruebas siguientes: VIH, HCV, VDRL y AgsHb.

Una muestra blanco individual de cada una de las 6 diferentes matrices biológicas provenientes de seis donadores y almacenadas en congelación fue descongelada, y procesada para evaluar la selectividad del método.



Los parámetros de la validación se muestran a continuación:

#### 4.3.7 Selectividad.

Se evaluó la selectividad del método realizando:

- Una muestra blanco de cada una de las 6 diferentes matrices biológicas a utilizar como mínimo (muestra de la matriz procesada sin analito) fue procesada mediante el método propuesto. Una vez establecida la selectividad (respuesta cromatográfica sin ningún pico que interfiera en el tiempo de retención del analito buscado) de la matriz individual se preparó la mezcla de las diferentes matrices y obteniendo una respuesta igual a la obtenida en plasmas individuales; la mezcla de plasma se utilizó cada día de trabajo.
- Se prepararon por duplicado muestras de fármacos de uso común a las concentraciones plasmáticas reportadas (ácido acetilsalicílico, paracetamol, cafeína, naproxeno y anticoagulantes como heparina y EDTA), de manera que se evaluó el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de propafenona y del estándar interno. (Tabla 5).

Tabla 5. Selectividad fármacos.

Fármaco	Concentración
ácido acetilsalicílico	50.0 µg/mL
paracetamol	25.0 µg/mL
cafeína	15.0 µg/mL
naproxeno	60.0 µg/mL



- Se prepararon por triplicado blancos con plasma lipémico y hemolizado, sin adición y con adición de los analitos de interés (propafenona y fenitoina), a la concentración del punto control bajo ( $0.045\mu\text{g/mL}$ ).

No debían presentarse interferencias en los tiempos de retención de los analitos de interés.

#### **4.3.8 Linealidad del método.**

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de una solución de referencia única, tal y como se describe en la tabla 3 (pág. 41), en el rango de concentraciones de  $0.015$  a  $0.60\mu\text{g/mL}$ .

Se considera que el método cumple con este parámetro, si al realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración, con una ponderación  $1/X$ , se obtiene un coeficiente de correlación mayor o igual a  $0.99$  y las diferencias entre los valores de concentración recuperada y el valor nominal en términos porcentuales, no es mayor al  $15\%$  en cada nivel de concentración, a excepción del límite de cuantificación que no debe exceder el  $20\%$ .

#### **4.3.9 Precisión y exactitud del método.**

La precisión del método fue evaluada como repetibilidad (precisión intradía) y reproducibilidad (precisión interdía)

#### **4.3.10 Repetibilidad.**

A partir de una solución de referencia se procesaron y cuantificaron por quintuplicado las muestras plasmáticas de propafenona de  $0.045$ ,  $0.090$  y  $0.500\mu\text{g/mL}$  tal como se describe en la tabla 3 (pág. 41), estas muestras no pertenecen a la curva pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido.



Con los resultados se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada). El coeficiente de variación no debió ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

#### **4.3.11 Reproducibilidad.**

Se evaluó la reproducibilidad entre días y entre analistas, para lo cual:

Se preparó una curva de calibración de propafenona en plasma y puntos de control de calidad (0.045, 0.090, 0.500  $\mu\text{g/mL}$ ) por triplicado, se cuantificaron mediante el método ya descrito y se realizó este procedimiento por tres días, y empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente.

Un segundo investigador preparó una curva de calibración de propafenona en plasma y puntos de control de calidad (0.045, 0.090, 0.500  $\mu\text{g/mL}$ ) por triplicado, los cuales fueron cuantificados mediante el método ya descrito. Se realizó este procedimiento por tres días, empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente.

Se calculó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), tomando en cuenta las determinaciones de los tres días y de ambos Investigadores. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.



#### 4.3.12 Exactitud del método.

Para determinar si el método era exacto, el valor promedio en cada nivel de concentración de las determinaciones realizadas para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  de su valor nominal correspondiente, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Desviación absoluta \%} = \frac{(\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración recuperada})}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

#### 4.3.13 Limite de cuantificación y limite de detección.

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD).

Para determinar estos parámetros se prepararon por quintuplicado las concentraciones de propafenona: 0.010, 0.015  $\mu\text{g/mL}$ , de acuerdo a la tabla 3 (pág. 41)

La sensibilidad del método se define como la concentración mínima cuantificable (CMC) ó límite de cuantificación (LC). El LC será la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio se encuentre dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal, con un coeficiente de variación no mayor al 20%. El límite de detección (LD) será aquella concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica sea tres veces mayor que el nivel del ruido.



#### **4.3.14 Recobro.**

El recobro absoluto fue definido como el área de la respuesta del analito obtenida después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico, entre la respuesta obtenida con un estándar no extraído a concentraciones equivalentes.

Se preparó y procesó por quintuplicado los puntos control de calidad de propafenona en sistema y método.

Se comparó la respuesta cromatográfica (área de propafenona) promedio en método obtenida contra sus correspondientes muestras de control de calidad de propafenona en sistema a las mismas concentraciones de acuerdo a la tabla 2 (pág. 40).

Se determinó el recobro del estándar interno (fenitoína), utilizando el mismo método analítico.

El recobro no es necesariamente del 100%, pero debió ser constante en los niveles de concentración evaluados. Los valores promedio individuales no debieron desviarse del promedio total en más del 15%.

#### **4.3.15 Anticoagulantes (heparina).**

Se evaluó el efecto del anticoagulante sobre el recobro preparando una curva de calibración y puntos control por quintuplicado de propafenona, en plasma heparinizado de acuerdo a lo establecido en la tabla 3 (pág. 41). Además, dichos puntos control se reinyectaron para evaluar el efecto del anticoagulante sobre la estabilidad de la muestra procesada.



Al comparar las concentraciones recuperadas promedio entre cada anticoagulante (tomando como anticoagulante de referencia a citratos), la desviación absoluta no debe ser mayor al 15 %.

#### **4.3.16 Estabilidad.**

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo que el compuesto de interés (propafenona) permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta del compuesto de interés en la matriz biológica (concentración). Así como la estabilidad del analito en solución, para ello se debe cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad (estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración y %C.V menor a 15%)

##### **4.3.16.1 Estabilidad de muestra procesada plasma con citratos y heparina.**

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se prepararon por triplicado muestras de propafenona en plasma a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción establecido (ver figura 6) y se inyectaron en el sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras permanecieron en el autoinyector del sistema a 5°C y fueron inyectadas nuevamente a las 23 horas después del tiempo cero (primeras inyecciones).

De igual forma se evaluó la estabilidad de muestra en plasma heparinado reinyectando las muestras a las 35 horas.



#### **4.3.16.2 Estabilidad temperatura ambiente.**

Para determinar la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente se prepararon por triplicado muestras de propafenona en plasma a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), las cuales permanecieron a temperatura ambiente por 46 horas, después de las cuales fueron procesadas de acuerdo al método de extracción descrito.

#### **4.3.16.3 Estabilidad refrigeración.**

Para determinar la estabilidad de la muestra en condiciones de refrigeración se prepararon por triplicado muestras de propafenona en plasma a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), las cuales permanecieron almacenadas en refrigeración 46 horas, después de las cuales fueron procesadas de acuerdo al método de extracción descrito.

#### **4.3.16.4 Ciclos congelación – descongelación.**

Se evaluó el efecto de los cambios de temperatura (congelar/descongelar) en un rango de  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  sobre la estabilidad de propafenona. Se prepararon nueve series de muestras de control de calidad conteniendo en analito a evaluar, las cuales fueron almacenadas en congelación y sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación.

#### **4.3.16.5 Estabilidad a largo plazo (congelación a $-40^{\circ}\text{C}$ a $-80^{\circ}\text{C}$ ).**

La estabilidad a largo plazo fue evaluada preparando las muestras de control de calidad (bajo, medio y alto) por triplicado, en un volumen suficiente, para separar en alícuotas y almacenarlas en un rango de  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  y evaluarse a los 9, 44, 87 y 98 días.



#### **4.3.16.6 Estabilidad en solución (refrigeración).**

Para determinar la estabilidad en solución de propafenona y fenitoína bajo condiciones de refrigeración, se realizaron cinco inyecciones de 5  $\mu\text{L}$ ; de la solución de referencia de propafenona 0.050  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución F) y fenitoína 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución III), las cuales permanecieron en refrigeración a 4° C y se evaluaron a los 36 y 17 días respectivamente.

#### **4.3.17 Efecto de la dilución.**

Se evaluó el efecto de la dilución preparando por triplicado una concentración de propafenona por arriba del rango de la curva de calibración.

Se validó el efecto de la dilución (factor 2 y factor 4) preparando muestras de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de propafenona, realizando la dilución correspondiente; para el caso de dilución 1:2 se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de solución de propafenona 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 250  $\mu\text{L}$  de plasma libre de fármaco, para el caso de 1:4 se tomaron 125  $\mu\text{L}$  de propafenona 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 375  $\mu\text{L}$  de plasma y fueron procesadas de acuerdo al método de extracción descrito.

El coeficiente de variación de las tres repeticiones debió ser menor del 15% y su desviación absoluta es menor del 15 % con respecto a su valor original.

#### **4.3.18 Tolerancia.**

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas. Para ello el analista debe preparar por triplicado muestras de propafenona en plasma a las concentraciones de 0.045, 0.090, 0.500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las cuales debían inyectarse en las condiciones originales del método. La evaluación de la tolerancia se realizó modificando el equipo cromatográfico y el anticoagulante utilizado. El método sería tolerante a estos cambios si la desviación absoluta con respecto a las condiciones originales no es mayor al 15%.



## 5. Resultados y análisis.

### 5.1 Optimización de método analítico.

#### 5.1.1 Selección de columna.

De las fases estacionarias evaluadas la columna Pursuit C18, 5 $\mu$ m, 150 x 4.6 mm fue la que cumplió criterios de aceptación obteniendo platos teóricos mayores a 10000 y simetría del pico de 0.989.

#### 5.1.2 Fase móvil.

De acuerdo con las pruebas realizadas se estableció como fase móvil una solución de fosfato de potasio monobásico 10mM pH 3.5: Acetonitrilo %v/v, ya que se obtuvo un tiempo de retención sin interferencias para los analitos, cumpliendo con una resolución mayor a 1.5.

#### 5.1.3 Selección de la longitud de onda.

De las longitudes evaluadas se observó una mayor respuesta y mejor simetría del pico en 210 nm, misma que se definió para trabajar. Ver tabla 6, donde se ejemplifican áreas obtenidas.

Tabla 6. Área de propafenona a diversas longitudes de onda.

Longitud de onda (nm)	Área obtenida
200	36522
210	380759
220	228549



#### **5.1.4 Selección del Estándar Interno (E.I.).**

De los analitos evaluados para ser utilizados como estándar interno, fenitoína presentó simetría de pico de 1.01, tiempo de retención libre de interferencias y fue posible extraerlo mediante el método propuesto para propafenona obteniendo un recobro constante; a diferencia de los demás analitos que no fue posible visualizarlos bajo las condiciones cromatográficas establecidas inicialmente.

#### **5.1.5 Método de extracción.**

Una vez identificado el pico de propafenona se evaluaron métodos de extracción, comenzando por una extracción por precipitación de proteínas ya que esta resulta ser más sencilla, por lo general requiere menor empleo de material y genera menor cantidad de desechos, sin embargo, el límite de cuantificación no permitió su empleo ya que no fue posible visualizarlo (0.015 µg/mL) debido a la dilución propia del método, por lo que se optó por una extracción líquido-líquido que permite concentrar la muestra; de los disolventes empleados para llevarla a cabo Diclorometano: Hexano 70: 30 % v/v presentó mejor resultado en cuanto a limpieza de blanco de plasma e intensidad de respuesta de propafenona y fenitoína (recobro).

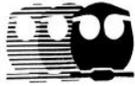


### 5.1.6 Condiciones cromatográficas finales.

Con base en los resultados obtenidos se definieron las siguientes condiciones:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para cuantificar propafenona en plasma.

<b>Columna</b>	Pursuit C18, 4.6 x 150 mm, 5 $\mu$ m
<b>Cromatógrafo</b>	Waters
<b>Detector</b>	UV/VIS
<b>Longitud de onda</b>	210 nm
<b>Fase Móvil:</b>	Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 10 mM pH 2.5 $\pm$ 0.05 : ACN (65:35% v/v)
<b>Solución de lavado del inyector</b>	Agua: Acetonitrilo 30:70 % v/v
<b>Velocidad de flujo</b>	1.0 mL/min
<b>Volumen de inyección:</b>	20 $\mu$ L
<b>Temperatura de la columna:</b>	30°C
<b>Temperatura del autoinyector:</b>	5 °C
<b>Tiempos de retención aproximados:</b>	
<b>Propafenona</b>	7.8 min
<b>Fenitoína</b>	6.4 min
<b>Tiempo de corrida:</b>	9 min



## 5.2 Validación.

### 5.2.1 Selectividad.

En la figura 7 se presentan las muestras blanco individuales de cada una de las 6 diferentes matrices biológicas (plasma con citratos) para crear mezcla utilizada en la validación, dichas muestras no presentaron señal para tiempos de retención de propafenona y fenitoína (se incluye cromatograma de solución de adecuabilidad del sistema para identificar tiempos de retención de analitos de interés).

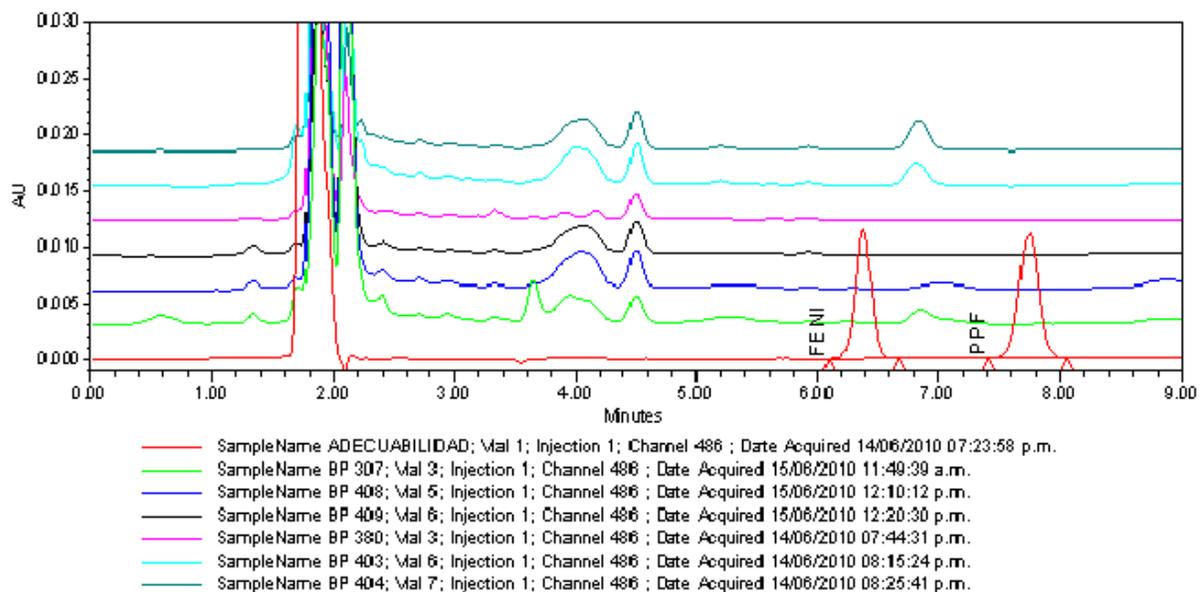


Fig. 7. Selectividad de folios de plasma



La selectividad del método fue determinada analizando la muestra blanco de la matriz biológica (plasma con citratos), plasma hemolizado, plasma lipémico y muestras de plasma conteniendo fármacos, como ácido acetilsalicílico, paracetamol, cafeína, naproxeno y anticoagulantes como heparina, sin obtener interferencia en tiempos de retención de analitos de interés a excepción de EDTA donde se presentó interferencia en tiempo de retención de fenitoína (área 1801.000) comparada con área del estándar interno (100099.500) equivale al 1.8% de la señal, por lo cual no se recomienda ser utilizado EDTA como anticoagulante. (Ver figuras 8, 9, 10).

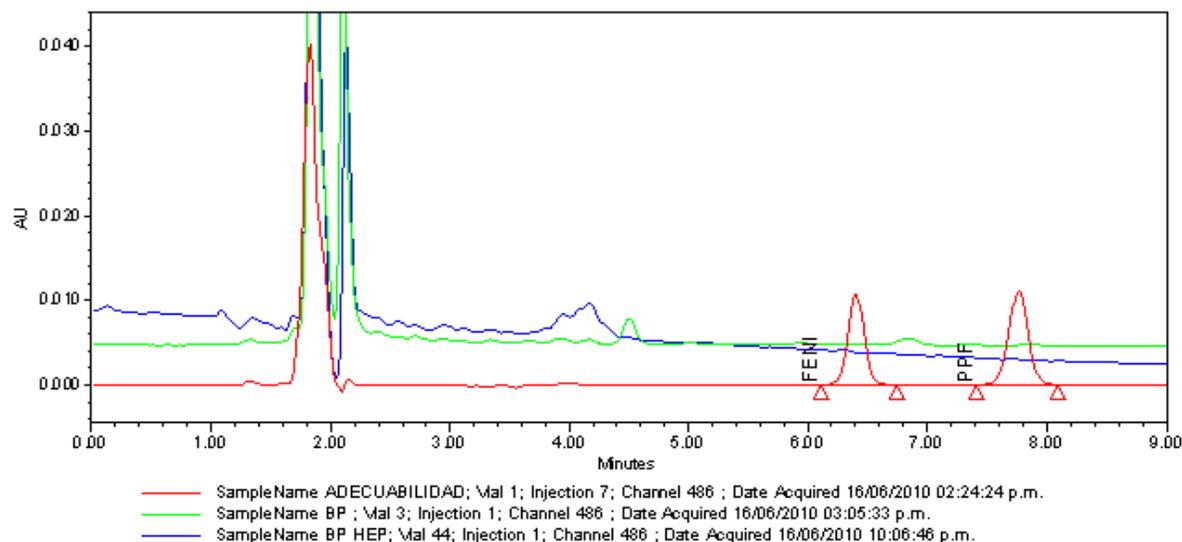


Fig. 8. Blanco de plasma de citratos (BP) y heparinizado (BP HEP).

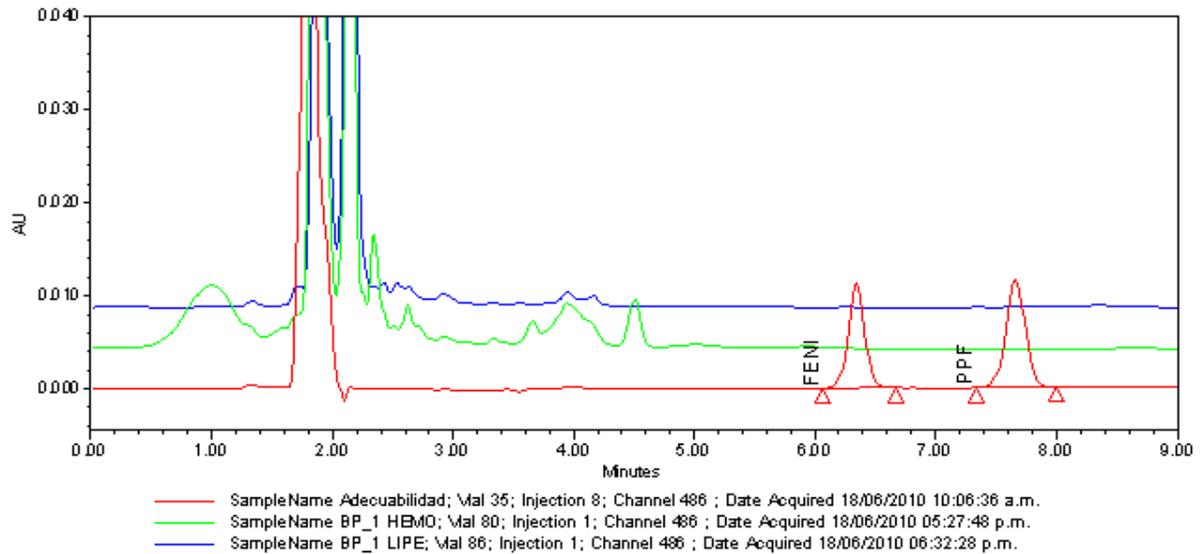
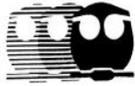


Fig. 9. Blanco de plasma hemolizado (BP\_1 HEMO) y plasma lipémico (BP\_1 LIPE).

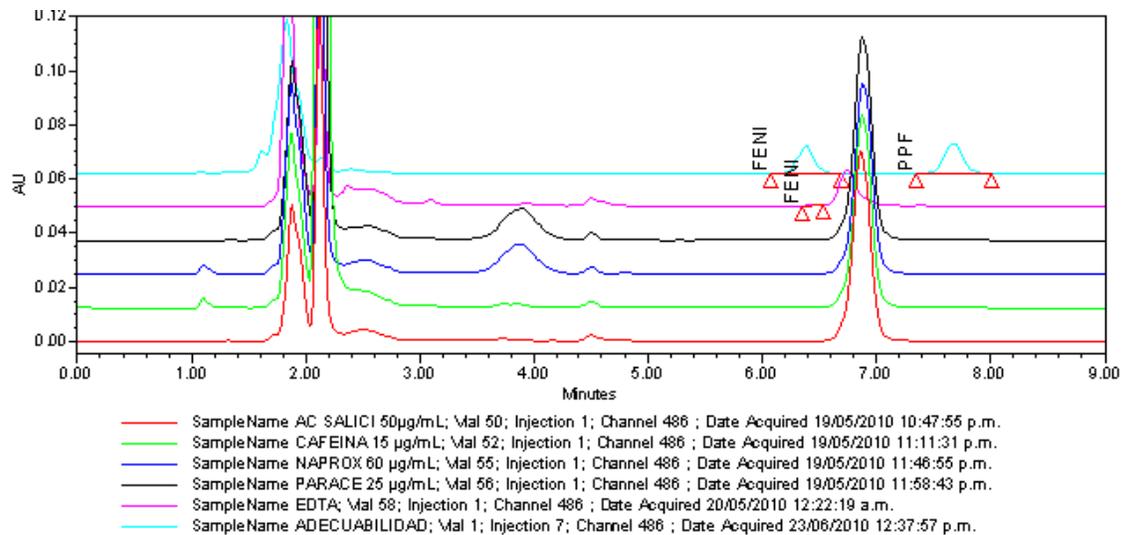


Fig. 10. Selectividad a fármacos y anticoagulante (EDTA).



En las tablas 8 y 9 se aprecian los valores obtenidos de controles bajos en plasma lipémico y hemolizado, que comparados con plasma de citratos (condición normal) cuentan con una desviación absoluta de 10.95 % y 10.22 % respectivamente, demostrando así que no afecta la lipemia y hemolisis para la cuantificación de propafenona al obtenerse valores menores al 15%.

Tabla 8. Controles bajos en plasma lipémico.

Control	Condición Original
	Control Bajo
1	0.047
2	0.047
3	0.043
Promedio	0.046
Desv. Estándar	0.002
% C.V.	5.057
Control	Plasma Lipémico
	Control Bajo
1	0.050
2	0.051
3	0.051
Promedio	0.051
Desv. Estándar	0.001
% C.V.	1.147
Desv. Abs. (%)	10.949

Tabla 9. Controles bajos en plasma hemolizado.

Control	Condición Original
	Control Bajo
1	0.047
2	0.047
3	0.043
Promedio	0.046
Desv. Estándar	0.002
% C.V.	5.067
Control	Plasma Hemolizado
	Control Bajo
1	0.050
2	0.050
3	0.051
Promedio	0.050
Desv. Estándar	0.001
% C.V.	1.147
Desv. Abs. (%)	10.219



### 5.2.2 Linealidad del método.

El método fue lineal para propafenona en el rango de concentraciones de 0.015 a 0.600  $\mu\text{g/mL}$ ; todos los valores de "r" obtenidos fueron igual o mayor a 0.9997, y porcentajes de desviación menores al 15% en todos los niveles de la curva de calibración.

Tablas 10 y 11 muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de propafenona en plasma, mientras que la figura 11 ilustra la curva patrón promedio correspondiente. (En el anexo I se presentan las 3 curvas de manera independiente).

Tabla 10. Curvas de linealidad del método.

Concentración Recuperada			Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio ( $\mu\text{g/mL}$ )
Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0.014	0.015	0.014	0.015	0.014
0.031	0.029	0.030	0.030	0.030
0.059	0.061	0.060	0.060	0.060
0.081	0.081	0.083	0.080	0.082
0.102	0.098	0.100	0.100	0.100
0.201	0.203	0.208	0.200	0.204
0.304	0.301	0.293	0.300	0.299
0.594	0.596	0.596	0.600	0.595



Tabla 11. Linealidad del método analítico.

Curva	Concentración Nominal	Áreas	Concentración Recuperada	% Desviación	Pendiente	Ordenada al Origen	Coeficiente de Correlación r
	µg/mL		µg/mL				
1	0.015	5181.5	0.014	-3.810	4.4224	-0.0039	0.9999
	0.030	11589.0	0.031	1.721			
	0.060	22176.0	0.059	-1.186			
	0.080	32181.5	0.081	0.845			
	0.100	40776.5	0.102	1.761			
	0.200	83176.5	0.201	0.517			
	0.300	118594.5	0.304	1.204			
0.600	242907.0	0.594	-1.053				
2	0.015	6453.0	0.015	-0.155	4.4494	-0.0014	0.9999
	0.030	11417.5	0.029	-1.971			
	0.060	25896.0	0.061	1.011			
	0.080	31822.0	0.081	1.535			
	0.100	38226.0	0.098	-1.547			
	0.200	83036.0	0.203	1.273			
	0.300	131535.0	0.301	0.449			
0.600	253664.0	0.596	-0.594				
3	0.015	6147.0	0.014	-4.651	4.3469	0.0040	0.9997
	0.030	13323.0	0.030	-0.882			
	0.060	25448.0	0.060	0.368			
	0.080	37130.0	0.083	3.966			
	0.100	45665.0	0.100	0.142			
	0.200	86077.5	0.208	3.977			
	0.300	125116.0	0.293	-2.331			
0.600	293759.5	0.596	-0.589				

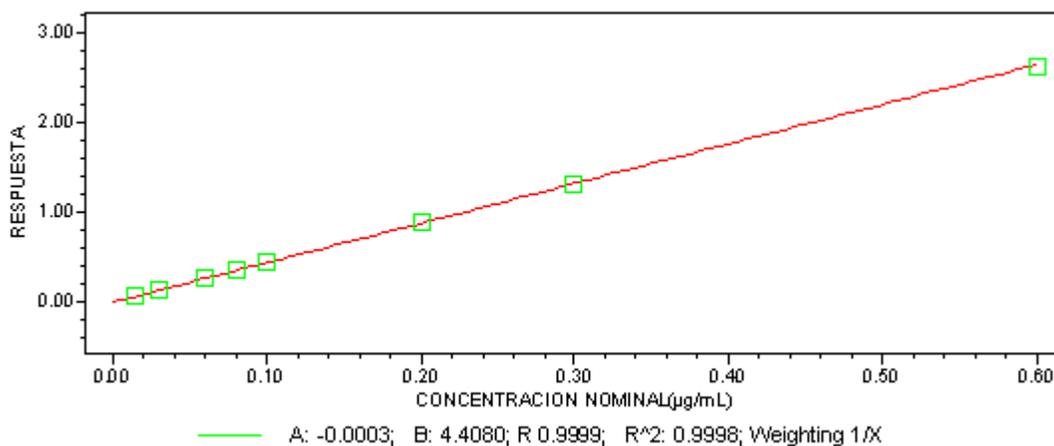


Fig. 11. Curva de calibración promedio del método de propafenona.



### 5.2.3 Precisión y exactitud del método.

#### 5.2.3.1 Repetibilidad.

En la tabla 12 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados para propafenona fue menor a 3.07 %; mientras que la exactitud en los niveles de concentración evaluados fue igual o menor a 4.76 %. (% Desviación absoluta).

El método se considera repetible; ya que el coeficiente de variación para los datos es menor del 15%, y es exacto ya que la desviación absoluta para cada nivel de concentración es menor al 15%.

Tabla 12. Repetibilidad del método para cuantificar propafenona en plasma.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración recuperada</b>		
1	0.043	0.090	0.529
2	0.041	0.088	0.533
3	0.043	0.095	0.536
4	0.044	0.092	0.525
5	0.044	0.092	0.496
<i>Promedio</i>	0.043	0.091	0.524
<i>D.E.</i>	0.001	0.003	0.016
<i>C.V. (%)</i>	2.848	2.853	3.071
<i>Concentración adicionada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>	0.045	0.090	0.500
<i>Desv.abs. (%)</i>	4.444	1.556	4.760



### 5.2.3.2 Reproducibilidad del primer analista.

En la tabla 13 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método para el primer investigador, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo para propafenona fue menor a 3.24 %, mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 2.96 % de las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 13. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma (primer analista).

<i>Día</i>	<i>Concentración recuperada (µg/mL)</i>		
	<i>Control Bajo</i>	<i>Control Medio</i>	<i>Control Alto</i>
1	0.047	0.097	0.496
	0.047	0.089	0.493
	0.043	0.087	0.497
2	0.046	0.090	0.486
	0.047	0.088	0.494
	0.045	0.088	0.499
3	0.047	0.091	0.510
	0.047	0.091	0.510
	0.048	0.089	0.52
<i>Promedio</i>	<i>0.046</i>	<i>0.090</i>	<i>0.501</i>
<i>D.E.</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0.011</i>
<i>C.V.(%)</i>	<i>3.237</i>	<i>3.287</i>	<i>2.124</i>
<i>Concentración adicionada (µg/mL)</i>	0.045	0.090	0.500
<i>Desv.abs. (%)</i>	<i>2.963</i>	<i>0.000</i>	<i>0.111</i>



### 5.2.3.3 Reproducibilidad del segundo analista.

En la tabla 14 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método para el segundo investigador, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo para propafenona fue menor o igual a 6.43 % mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 1.24 % en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 14. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma (segundo analista)

Día	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.049	0.092	0.488
	0.045	0.088	0.456
	0.045	0.090	0.498
2	0.039	0.089	0.519
	0.047	0.091	0.541
	0.046	0.086	0.474
3	0.045	0.088	0.519
	0.042	0.089	0.542
	0.044	0.087	0.472
Promedio	0.045	0.089	0.501
D.E.	0.003	0.002	0.031
C.V.(%)	6.430	2.138	6.193
Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.045	0.090	0.500
Desv.abs. (%)	0.741	1.235	0.200



### 5.2.3.4 Reproducibilidad entre analistas.

En la tabla 15 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método entre investigadores, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo e Investigadores fueron de 2.77 - 5.24 % mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 1.11 %, en las diferentes concentraciones evaluadas.

De acuerdo con los resultados generados por cada investigador, el método se consideró preciso y exacto ya que cumplió con el criterio especificado del  $\pm 15\%$  en el coeficiente de variación y desviación absoluta.

Tabla 15. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar propafenona en plasma.

Día	Réplica	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
1	1 INV1	0.047	0.097	0.496
	2 INV1	0.047	0.089	0.493
	3 INV1	0.043	0.087	0.497
2	1 INV1	0.046	0.090	0.486
	2 INV1	0.047	0.088	0.494
	3 INV1	0.045	0.088	0.499
3	1 INV1	0.039	0.089	0.519
	2 INV1	0.047	0.091	0.541
	3 INV1	0.046	0.086	0.474
1	1 INV2	0.049	0.092	0.488
	2 INV2	0.045	0.088	0.456
	3 INV2	0.045	0.090	0.498
2	1 INV2	0.047	0.091	0.510
	2 INV2	0.047	0.091	0.510
	3 INV2	0.048	0.089	0.520
3	1 INV2	0.045	0.088	0.519
	2 INV2	0.042	0.089	0.542
	3 INV2	0.044	0.087	0.472
Promedio		0.046	0.089	0.501
D.E.		0.002	0.002	0.023
C.V. (%)		5.236	2.771	4.493
Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )		0.045	0.090	0.500
Desviación absoluta (%)		1.111	0.617	0.156



#### 5.2.4 Limite de cuantificación y limite de detección.

La sensibilidad del método (ver tabla 16 y 17), fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD). Figura 12.

El límite de cuantificación del método evaluado para propafenona fue de 0.015  $\mu\text{g/mL}$ ; en este nivel, el coeficiente de variación fue de 2.83 % para propafenona y la exactitud (desviación absoluta) de 5.33 %.

El LD para propafenona fue de 0.010  $\mu\text{g/mL}$  y presentó una relación señal ruido de aproximadamente 30.43; por lo que se considera válido de acuerdo a criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-1998.

Tabla 16. Límites de detección y límite de cuantificación para el método analítico.

Réplica	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Límite de Detección	Límite de Cuantificación
1	0.011	0.016
2	0.010	0.015
3	0.012	0.016
4	0.011	0.016
5	0.011	0.016
Promedio	0.011	0.016
Desviación Estándar	0.001	0.000
Coeficiente de variación (%)	6.428	2.830
Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.010	0.015
Desviación Absoluta (%)	10.000	5.333

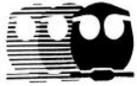


Tabla 17. Límites de detección para el método analítico.

Réplica	Área (L.D.)	Ruido
1	4247.000	135.500
2	4235.000	
3	4364.000	
4	3988.500	
5	3786.000	
Promedio	4123.9	
Relación señal ruido		30.435

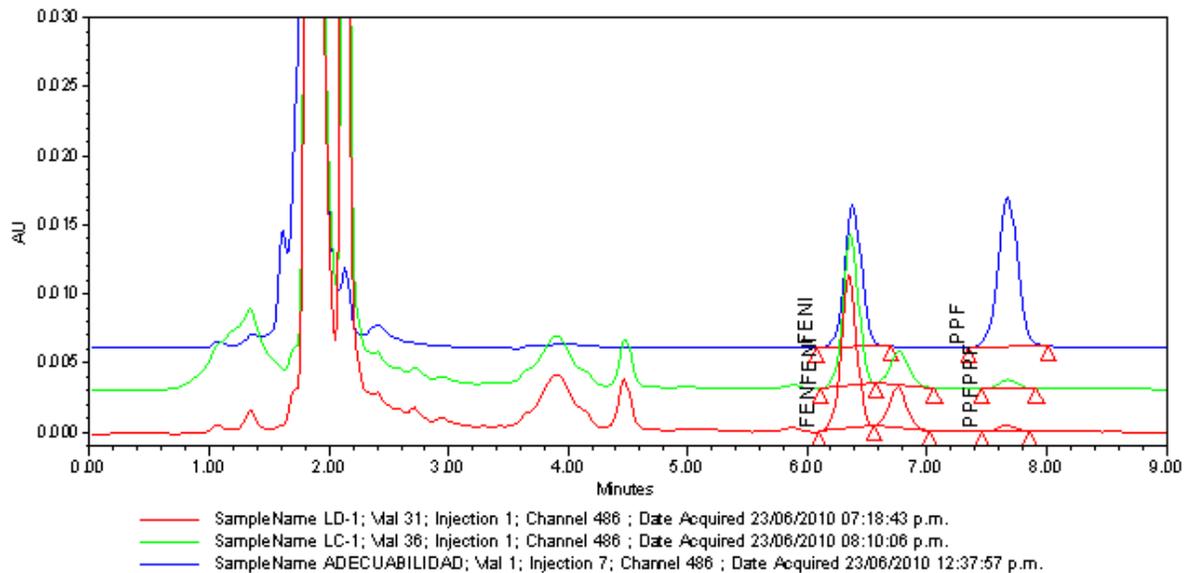


Fig. 12. Cromatograma de Límite de cuantificación (LC-1) y detección (LD-1) del método de propafenona.



## 5.2.5 Recobro.

### 5.2.5.1 Propafenona.

El recobro del método analítico para cuantificar propafenona en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro promedio del 97.26 % para propafenona (ver tabla 18) y una desviación igual o menor a 2.08 %, siendo consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración.

Tabla 18. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar propafenona en plasma de citratos.

<b>Control</b>	<b>Área Plasma con citratos</b>	<b>Área Sistema</b>	<b>Recobro (%)</b>	<b>Desviación (%)</b>
<i>Bajo</i> <i>0.045</i> <i>µg/mL</i>	18941.5	18065.0	99.279	2.080
	18486.0	18781.5		
	16199.0	18806.0		
	17309.0	18457.0		
	20957.0	18450.0		
<i>Promedio</i>	<i>18378.5</i>	<i>18511.9</i>		
<i>Medio</i> <i>0.0 09</i> <i>µg/mL</i>	34637.0	39237.0	96.180	1.107
	33474.0	38568.5		
	39555.0	37543.5		
	35588.0	36971.0		
	38865.0	37032.0		
<i>Promedio</i>	<i>36423.8</i>	<i>37870.4</i>		
<i>Alto 0.5</i> <i>µg/mL</i>	180097.0	206667.0	96.310	0.973
	211928.0	223763.0		
	210470.0	206914.0		
	209759.0	228266.0		
	228321.0	214836.5		
<i>Promedio</i>	<i>208115.0</i>	<i>216089.3</i>		
	<i>Recobro Promedio Global</i>		<i>97.256</i>	



De igual forma el recobro del método analítico para cuantificar propafenona en plasma heparinizado resulto ser constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro promedio del 117.55 % para propafenona (ver tabla 19) y una desviación igual o menor a 1.63 %

Tabla 19. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar propafenona en plasma heparinizado.

Control	Área Plasma heparinizado	Área sistema	Recobro (%)	Desviación (%)
Bajo 0.045 µg/mL	21557.0	18065.0	118.471	0.783
	20526.0	18781.5		
	25480.0	18806.0		
	19096.5	18457.0		
	22997.0	18450.0		
Promedio	21931.3	18511.9		
Medio 0.09 µg/mL	42331.0	39237.0	118.539	0.841
	41290.5	38568.5		
	43479.0	37543.5		
	46109.0	36971.0		
	51247.0	37032.0		
Promedio	44891.3	37870.4		
Alto 0.5 µg/mL	231283.0	206667.0	115.641	1.625
	237412.0	223763.0		
	256955.0	206914.0		
	273242.0	228266.0		
	250545.5	214836.5		
Promedio	249887.5	216089.3		
	Recobro Promedio Global		117.550	



### 5.2.5.2 Fenitoína (Estándar interno).

El recobro del estándar interno utilizado para cuantificar propafenona en plasma con citratos fue constante en las concentraciones evaluadas, obteniéndose un recobro promedio del 88.69 % para fenitoína (ver tabla 20) y una desviación igual o menor a 4.87 %.

Tabla 20. Recobro de fenitoína en plasma con citratos.

<b>Control</b>	<b>Área Plasma con citratos</b>	<b>Área Sistema</b>	<b>Recobro (%)</b>	<b>Desviación (%)</b>
<i>Bajo 0.045 µg/mL</i>	98372.5	102833.5	93.012	4.871
	102278.0	104330.0		
	84573.5	103877.0		
	89405.0	103447.5		
	108033.0	104438.0		
<i>Promedio</i>	96532.4	103785.2		
<i>Medio 0.09 µg/mL</i>	87341.0	108819.0	87.382	1.476
	86859.5	106168.0		
	94797.0	100667.0		
	88440.0	99663.0		
	95724.0	103279.5		
<i>Promedio</i>	90632.3	103719.4		
<i>Alto 0.5 µg/mL</i>	78136.0	101897.0	85.680	3.395
	91299.0	110532.0		
	90118.0	102512.5		
	91729.0	112190.5		
	105754.5	106288.0		
<i>Promedio</i>	91407.3	106684.0		
	<i>Recobro Promedio Global</i>		88.691	



El recobro del estándar interno utilizado para cuantificar propafenona en plasma heparinizado fue constante en las concentraciones evaluadas, obteniéndose un recobro promedio del 80.53 % para fenitoína (ver tabla 21) y una desviación igual o menor a 2.41%

Tabla 21. Recobro de fenitoína en plasma heparinizado.

<b>Control</b>	<b>Área Plasma heparinizado</b>	<b>Área sistema</b>	<b>Recobro</b>	<b>Desviación (%)</b>
<i>Bajo 0.045 µg/mL</i>	83177.0	102833.5	80.996	0.583
	78222.0	104330.0		
	94530.0	103877.0		
	73943.5	103447.5		
	90435.5	104438.0		
<i>Promedio</i>	84061.6	103785.2		
<i>Medio 0.09 µg/mL</i>	83555.0	108819.5	81.996	1.825
	79447.5	106168.0		
	90122.0	100667.0		
	84025.0	99663.0		
	88078.0	103279.5		
<i>Promedio</i>	85045.5	103719.4		
<i>Alto 0.5 µg/mL</i>	77543.0	101897.0	78.588	2.408
	80353.5	110532.0		
	87212.0	102512.5		
	91435.0	112190.5		
	82658.5	106288.0		
<i>Promedio</i>	83840.4	106684.0		
	<i>Recobro Promedio Global</i>		80.526	



### 5.2.5.3 Anticoagulantes.

En la tabla 22 se muestra la comparación de anticoagulantes utilizados (citratos y heparinizado) obteniéndose un recobro promedio de 120.88 y una desviación igual o menor a 1.96%

Tabla 22. Recobro anticoagulantes.

Control	Área Plasma heparinizado	Área plasma citratos	Recobro (%)	Desviación (%)
Bajo 0.045 µg/mL	21557.0	18941.5	119.331	1.284
	20526.0	18486.0		
	25480.0	16199.0		
	19096.5	17309.0		
	22997.0	20957.0		
Promedio	21931.3	18378.5		
Medio 0.09 µg/mL	42331.0	34637.0	123.247	1.955
	41290.5	33474.0		
	43479.0	39555.0		
	46109.0	35588.0		
	51247.0	38865.0		
Promedio	44891.3	36423.8		
Alto 0.5 µg/mL	231283.0	180097.0	120.072	0.671
	237412.0	211928.0		
	256955.0	210470.0		
	273242.0	209759.0		
	250545.5	228321.0		
Promedio	249887.5	208115.0		
	Recobro Promedio Global		120.883	



## 5.2.6 Estabilidades

### 5.2.6.1 Estabilidad de muestra procesada.

Los resultados de estabilidad muestra procesada se presentan en la tabla 23, en la cual se puede observar que las muestras de propafenona fueron estables 23 horas 21 min al permanecer este tiempo en el automuestreador del sistema cromatográfico ya que su desviación absoluta y el % C.V no fueron mayores del  $\pm 15$  % con respecto al tiempo cero. (8.07% y 2.90% respectivamente).

En cuanto a los controles de plasma heparinizado permanecieron en el autoinyector del sistema a 5°C y fueron inyectados nuevamente a las 35 horas 29 min después del tiempo cero (primera inyección). Los resultados se presentan en la tabla 24, cumpliendo criterios de aceptación ya que se obtuvo una desviación igual o menor a 9.95% y un coeficiente de variación menor a 2.22%.



Tabla 23. Estabilidad de propafenona en plasma con citratos (muestra procesada).

	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Tiempo Cero		
<i>Control</i>	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.043	0.090	0.529
2	0.043	0.088	0.533
3	0.044	0.095	0.536
<i>Promedio</i>	0.043	0.091	0.533
<i>Desv. Estándar</i>	0.001	0.004	0.004
<i>% C.V.</i>	1.332	3.962	0.659
	23 HORAS 21 min		
<i>Control</i>	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.044	0.087	0.488
2	0.044	0.084	0.489
3	0.044	0.089	0.492
<i>Promedio</i>	0.044	0.087	0.490
<i>Desv. Estándar</i>	0.000	0.003	0.002
<i>% C.V.</i>	0.000	2.904	0.425
<i>Desv. Abs. (%)</i>	1.538	4.762	8.073

Tabla 24. Estabilidad de propafenona en plasma heparinizado (muestra procesada).

	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Tiempo Cero		
<i>Control</i>	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.046	0.090	0.530
2	0.046	0.092	0.525
3	0.045	0.085	0.523
<i>Promedio</i>	0.046	0.089	0.526
<i>Desv. Estándar</i>	0.001	0.004	0.004
<i>% C.V.</i>	1.264	4.051	0.685
	35 HORAS 29 min		
<i>Control</i>	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.046	0.083	0.483
2	0.045	0.085	0.470
3	0.044	0.082	0.468
<i>Promedio</i>	0.045	0.083	0.474
<i>Desv. Estándar</i>	0.001	0.002	0.008
<i>% C.V.</i>	2.222	1.833	1.719
<i>Desv. Abs. (%)</i>	1.460	6.367	9.949



### 5.2.6.2 Estabilidad temperatura ambiente.

Los resultados de muestras que permanecieron 46 horas a temperatura ambiente se presentan en la tabla 25, en la cual se puede observar que propafenona es estable durante este tiempo ya que su desviación absoluta y el C.V% fueron menores del  $\pm 15\%$ , 10.77% y el 13.41% respectivamente, por lo que es posible procesar la muestras durante un periodo de 46 horas a temperatura ambiente.

Tabla 25. Estabilidad de propafenona en plasma (temperatura ambiente).

	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Tiempo Cero (CONTROLES FRESCOS)		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.047	0.097	0.496
2	0.047	0.089	0.493
3	0.043	0.087	0.497
Promedio	0.046	0.091	0.495
Desv. Estándar	0.002	0.005	0.002
% C.V.	5.057	5.815	0.420
	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	46 HORAS		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.041	0.102	0.454
2	0.041	0.081	0.435
3	0.042	0.082	0.437
Promedio	0.041	0.088	0.442
Desv. Estándar	0.001	0.012	0.010
% C.V.	1.397	13.411	2.362
Desv. Abs. (%)	9.489	2.930	10.767



### 5.2.6.3 Estabilidad refrigeración.

Los resultados se presentan en la tabla 26, en la cual se puede observar que propafenona es estable en condiciones de refrigeración hasta 46 horas ya que su desviación absoluta es menor del  $\pm 15\%$  con respecto a controles frescos y el %C.V es menor del  $\pm 15\%$ .

Tabla 26. Estabilidad de propafenona en plasma (refrigeración)

	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Tiempo Cero (CONTROLES FRESCOS)		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.047	0.097	0.496
2	0.047	0.089	0.493
3	0.043	0.087	0.497
Promedio	0.046	0.091	0.495
Desv. Estándar	0.002	0.005	0.002
% C.V.	5.057	5.815	0.420
	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	46 HORAS		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.044	0.084	0.468
2	0.044	0.083	0.467
3	0.044	0.085	0.477
Promedio	0.044	0.084	0.471
Desv. Estándar	0.000	0.001	0.006
% C.V.	0.000	1.190	1.170
Desv. Abs. (%)	3.650	7.692	4.980



#### 5.2.6.4 Ciclos congelación descongelación.

En la tabla 27 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación. Se puede observar que los valores obtenidos de % C.V y desviación absoluta, cumplen con el límite de  $\pm 15\%$ , por lo que se concluye que propafenona en plasma es estable en un rango de  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  bajo tres ciclos de congelación-descongelación.(ver en anexo II segundo y tercer ciclo).

Tabla 27. Tercer ciclo congelación/descongelación.

	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Tiempo Cero (Controles frescos)		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo</b>	<b>Control Medio</b>	<b>Control Alto</b>
1	0.046	0.090	0.486
2	0.047	0.088	0.494
3	0.045	0.088	0.499
<i>Promedio</i>	0.046	0.089	0.493
<i>Desv. Estándar</i>	0.001	0.001	0.007
<i>% C.V.</i>	2.174	1.302	1.330
	3er CICLO CONGELACION /DESCONGELACION		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo</b>	<b>Control Medio</b>	<b>Control Alto</b>
1	0.046	0.078	0.482
2	0.045	0.087	0.506
3	0.043	0.084	0.498
<i>Promedio</i>	0.045	0.083	0.495
<i>Desv. Estándar</i>	0.002	0.005	0.012
<i>% C.V.</i>	3.420	5.521	2.467
<i>Desv. Abs. (%)</i>	2.899	6.391	0.473



### 5.2.6.5 Estabilidad a largo plazo (congelación a - 40° a - 80 °C)

Después de almacenar las muestras plasmáticas de propafenona en congelación (- 40 °C a - 80 °C) por 9, 44,87 y 98 días, se encontró que la propafenona es estable en la matriz biológica hasta 98 días (tabla 28), ya que los valores encontrados de % de coeficiente de variación y desviación absoluta, se encuentran dentro de especificaciones. Se muestran resultados de cada una de las evaluaciones (anexo III).

Tabla 28. Estabilidad largo plazo 98 días.

	Concentración recuperada (µg/mL)		
	Tiempo Cero (CONTROLES FRESCOS)		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.043	*	0.518
2	0.048	0.095	0.525
3	0.045	0.092	0.498
Promedio	0.045	0.094	0.514
Desv. Estándar	0.003	0.002	0.014
% C.V.	5.551	2.269	2.728
Concentración nominal	0.045	0.090	0.500
% Desv abs	0.741	3.889	2.733
	Concentración recuperada		
	98 DIAS		
Control	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.040	0.083	0.470
2	0.041	0.080	0.488
3	0.040	0.084	0.479
Promedio	0.040	0.082	0.479
Desv. Estándar	0.001	0.002	0.009
% C.V.	1.431	2.528	1.879
% Desv abs	11.029	11.943	6.749

\*Control fuera de especificaciones.



A pesar de tener un control fuera de especificaciones se acepta la prueba ya que se cumplen criterios establecidos en la norma 177 que establece que 2 de 6 muestras control, que no sean de la misma concentración, pueden estar fuera de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal respectiva para métodos cromatográficos.

#### 5.2.6.6 Estabilidad en solución (refrigeración).

Los resultados se presentan en la tabla 29 y 30 en las cuales se puede observar que la solución de propafenona es estable al menos durante 36 días y la de fenitoína al menos 17 días.

Tabla 29. Estabilidad de propafenona en solución. Refrigeración.

Solución de referencia propafenona 0.5 $\mu\text{g/mL}$	Área recuperada Tiempo Cero
1	9959.0
2	9921.5
3	9885.5
4	9828.0
5	10027.0
Promedio	9924.2
Desv. Estándar	75.064
% C.V.	0.756
	<b>36 días</b>
1	8768.0
2	8734.0
3	8815.0
4	8567.5
5	8874.5
Promedio	8751.8
Desv. Estándar	115.753
% C.V.	1.323
Desv. Abs. (%)	11.814

Tabla 30. Estabilidad de fenitoína (estándar interno).Refrigeración.

Solución de referencia fenitoína 10 $\mu\text{g/mL}$	Área recuperada Tiempo Cero
1	164227.5
2	169074.0
3	169958.0
4	165587.5
5	166516.5
Promedio	167072.7
Desv. Estándar	2394.812
% C.V.	1.433
	<b>17 días</b>
1	182266.5
2	183788.0
3	183270.5
4	182130.0
5	183624.5
Promedio	183015.9
Desv. Estándar	771.001
% C.V.	0.421
Desv. Abs. (%)	9.543



### 5.2.6 Efecto de la dilución.

Se validó el efecto de la dilución (factor 2 y factor 4) donde el coeficiente de variación de las tres repeticiones es menor del 15% y su desviación absoluta es menor del 15 % con respecto a su valor original. El resultado se muestra en la tabla 31 para dilución 1:2 y tabla 32 para dilución 1:4.

Tabla 31 Efecto de la dilución 1:2 para propafenona.

Factor de Dilución	Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
2.0	1.0	0.913
		0.909
		0.938
<i>Promedio</i>		<i>0.920</i>
<i>Desv. Estándar</i>		<i>0.016</i>
<i>C.V</i>		<i>1.708</i>
<i>Desv. Abs. (%)</i>		<i>8.000</i>

Tabla 32. Efecto de la dilución 1:4 para propafenona.

Factor de Dilución	Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
4.0	1.0	0.969
		0.873
		0.905
<i>Promedio</i>		<i>0.916</i>
<i>Desv. Estándar</i>		<i>0.049</i>
<i>C.V</i>		<i>5.338</i>
<i>Desv. Abs. (%)</i>		<i>8.433</i>



### 5.2.7 Tolerancia.

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporcionan una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. Para ello se prepararon por triplicado y a partir de las soluciones estándar independientes, muestras de concentraciones de 0.045, 0.09 y 0.50 µg/mL, las cuales se inyectaron modificando:

a) El equipo cromatográfico:

HPLC WATERS 1, que consta de:

Bomba waters 600, No. Serie: L026CE699T.

Detector UV waters 486, No. Serie: MX6BM6066M.

Automuestreador waters 717 plus, No. Serie: B0371P86AM.

Degasser Jasco DG-2080-54.

Horno Metalox Modelo 200C High tem column oven.

HPLC WATERS 2, constituido por:

Bomba waters 1525, No. Serie: A01259190M.

(Horno adaptado a la bomba ).

Detector UV waters 486, No. Serie: L0048734M.

Automuestreador waters 717 plus, No. Serie: M0071P352.

Degasser degasys populaire.



La diferencia entre los equipos utilizados se encuentra en el tipo de bomba, la del equipo 1 es una bomba cuaternaria apta para gradiente, a diferencia de el equipo 2 que tiene una bomba binaria, sin embargo, la fase móvil utilizada fue una mezcla isocrática por lo que no hubo diferencia en la utilización de cualquiera de ellas.

b) El uso de plasma con citratos o con heparina.

El método fue tolerante a los cambios realizados, ya que la desviación absoluta con respecto a las condiciones originales no fue mayor al 15%.(ver tabla 33 y 34).

Tabla 33. Cambio de equipo cromatográfico.

	<b>Condición Original</b>		
	<b>WATERS equipo 1</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Alto (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
1	0.047	0.097	0.496
2	0.047	0.089	0.493
3	0.043	0.087	0.497
<i>Promedio</i>	<i>0.046</i>	<i>0.091</i>	<i>0.495</i>
<i>Desv. Estándar</i>	<i>0.002</i>	<i>0.005</i>	<i>0.002</i>
<i>% C.V.</i>	<i>5.057</i>	<i>5.815</i>	<i>0.420</i>
	<b>Condición a Evaluar</b>		
	<b>WATERS equipo 2</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
1	0.045	0.089	0.485
2	0.047	0.087	0.477
3	0.043	0.092	0.487
<i>Promedio</i>	<i>0.045</i>	<i>0.089</i>	<i>0.483</i>
<i>Desv. Estándar</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0.005</i>
<i>% C.V.</i>	<i>4.444</i>	<i>2.817</i>	<i>1.096</i>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<i>1.460</i>	<i>1.832</i>	<i>2.490</i>



Tabla 34. Cambio de anticoagulante (plasma de citratos y heparina).

	<b>Condición Original</b>		
	<b>Plasma con citratos</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Alto (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0.043	0.090	0.529
2	0.041	0.088	0.533
3	0.043	0.095	0.536
Promedio	0.042	0.091	0.533
Desv. Estándar	0.001	0.004	0.004
% C.V.	2.728	3.962	0.659
	<b>Condición a Evaluar</b>		
	<b>Plasma con heparina</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0.046	0.089	0.530
2	0.046	0.087	0.525
3	0.047	0.092	0.523
Promedio	0.046	0.089	0.526
Desv. Estándar	0.001	0.003	0.004
% C.V.	1.246	2.817	0.685
Desv. Abs. (%)	9.449	1.832	1.252



### 5.2.8 Resumen de la validación del método analítico para propafenona.

Tabla 35. Resumen de la validación para propafenona.

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad del método	Coefficiente de correlación ( $r$ ) $\geq 0.99$	$>0.9997$
Repetibilidad	Coefficiente de variación $\leq 15\%$	2.848 – 3.071%
Exactitud intradía	Desviación absoluta % $\leq 15\%$	1.556 – 4.760%
Reproducibilidad	Coefficiente de variación $\leq 15\%$	Analista 1. (2.124 – 3.287%) Analista 2. (2.138 – 6.430%)
Exactitud interdía	Desviación Absoluta % $\leq 15\%$	Analista 1. (0.000 – 2.963%) Analista 2. (0.200 – 1.235%)
Reproducibilidad entre analistas .2	Coefficiente de variación $\leq 15\%$	2.771 – 5.236%
Exactitud entre analistas	Desviación Absoluta % $\leq 15\%$	0.617 - 1.111%
Límite de cuantificación	Coefficiente de variación $\leq 20\%$ y Desviación Absoluta % $\leq 20\%$	0.015 $\mu\text{g/mL}$ 2.830% C.V. 5.333 % D.A.
Límite de detección	Señal ruido mayor a 3	0.010 $\mu\text{g/mL}$ señal ruido 30.435



Continuación tabla 35

Selectividad	La respuesta debida a las sustancias presentes en las muestras plasmáticas analizadas no interfiere con el pico de interés.	Selectivo para: Acido salicílico 300 µg/mL Heparina 100 USP  Naproxeno 50 µg/mL  Paracetamol 20 µg/mL  Cafeína 25 µg/mL  No selectivo para:  EDTA
Selectividad plasma lipémico y hemolizado	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto a las condiciones originales	Plasma Lipémico 10.949 % Plasma Hemolizado 10.219 %
Recobro propafenona en plasma con citratos	Recobro constante en todo el intervalo	96.180 – 99.279 % Global 97.256%
Recobro fenitoina en plasma con citratos	Recobro constante en todo el intervalo	85.680 – 93.012 % Global 88.691%
Recobro propafenona en plasma heparinizado	Recobro constante en todo el intervalo	115.641 – 118.539 % Global 117.550%
Recobro Fenitoina en plasma con heparina	Recobro constante en todo el intervalo	78.588 – 81.996 % Global 80.526%
Estabilidad ciclos congelación-descongelación	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	Estable durante tres ciclos congelación-descongelación.  D.A. < 6.391 %
Estabilidad de la muestra procesada plasma citratos	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	D.A. <4.762 % Estable durante 23 horas 21 min
Estabilidad de la muestra procesada en plasma heparinizado	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	D.A. <9.949 % Estable durante 35 horas 31 min.



Continuación tabla 35

Estabilidad en plasma a temperatura ambiente citratos	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	D. A. <10.762 % Estable hasta 46 horas.
Estabilidad en plasma bajo condiciones de refrigeración citratos	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	D.A. <7.692 % Estable hasta 46 horas
Estabilidad en plasma en congelación a largo plazo (-40°C a 80°C)	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto a controles frescos	D.A. <11.943 % Estable durante 98 días
Efecto de la dilución	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto a las condiciones originales	Efecto de la dilución 1:2 D.A.< 8.000% Efecto de la dilución 1:4 D.A.< 8.433%
Estabilidad en solución de la solución stock en refrigeración propafenona	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	propafenona Estable 36 días 0.50 µg/mL D.A. <11.814 %
Estabilidad en solución de la solución stock en refrigeración fenitoína	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto al tiempo cero	fenitoína Estable 17 días 10.0 µg/mL D.A. <9.544 %
Tolerancia Cambio de sistema cromatográfico	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto a las condiciones originales	D.A.<2.490 %
Tolerancia plasma citratos y heparina	Desviación Absoluta % $\leq$ 15% con respecto a las condiciones originales	Cumple D.A< 9.449

**D.A. = Desviación absoluta    C.V. = Coeficiente de Variación**



## 6. Conclusiones:

Se realizó la optimización de un método analítico aplicando cromatografía de líquidos con detección UV para la cuantificación de propafenona en plasma humano utilizando fenitoina como estándar interno; mediante extracción líquido-líquido, obteniendo parámetros cromatográficos aceptables.

Se llevó a cabo la validación del método analítico, demostrando que es selectivo, lineal en el rango de 0.015 a 0.600 µg/mL, preciso y exacto; cumpliendo con los parámetros de validación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, siendo confiable para el análisis de propafenona en plasma para su aplicación en un estudio de biodisponibilidad.

Las muestras de propafenona son estables 46 horas en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración, cuentan con una estabilidad de muestra procesada en plasma con citratos de 23 horas 21 min y 35 horas 31 min en plasma heparinizado, estable a tres ciclos de congelación/descongelación, y 98 días bajo condiciones de congelación (-40°C a -80°C).

Las soluciones de referencia de propafenona son estables hasta 36 días en condiciones de refrigeración y fenitoína (EI) 17 días.



## 7. Bibliografía.

1. Eunice Sandoval-Ramírez et al. Evaluation of anti-arrhythmic effect of propafenone in children with supraventricular paroxistic tachycardia. *Medigraphic*.2008; 65:121-125.
2. C. Flores-Pérez, et al. A Simple Method to Measure Plasma Levels of Propafenone with Fluorescence Detection. *Cromatographia*. 2005; 62(7/8): 373–377.
3. Barbara T.Mcvan . Índice de medicamentos. El manual moderno, S.A de C.V. 1995. Pp. 1296- 1297.
4. Información sobre arritmias cardiacas, documento en línea, <http://www.clinicadam.com/salud/videos/arritmias.htm>. Fecha de consulta: Abril 2010.
5. Información de salud sobre arritmias cardiacas en línea. Medline Plus <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001101.htm>. Fecha de consulta: Mayo 2010.
6. Artículo en línea : Heart Disease and Abnormal Heart Rhythm (Arrhythmia), [http://www.medicinenet.com/arrhythmia\\_irregular\\_heartbeat/article.htm](http://www.medicinenet.com/arrhythmia_irregular_heartbeat/article.htm). Fecha de consulta : Abril 2010.
7. Palmira Vanzini et al. Avance en el tratamiento de las arritmias cardiacas: ablación por radiofrecuencia. *Rev med Uruguay*. 1994; 10:60-65 1995 May;45(5):542-5.
8. Jesús Flores.Farmacología Humana. 4ª edición. Editorial Masson. 2003. pp. 681-689.
9. A.F.Merrick et al. Comparison of propafenone to atenolol for the prophylaxis of postcardiotomy supraventricular tachyarrhythmias: a prospective trial. *Cardiothoracic surgery*. 1995; 9:146-149.
10. Juárez Olguín et al. Bioavailability of an extemporaneous suspension of propafenone made from tablets. *Biopharm. Drug Dispos*. 2006; 27: 241–245.
11. Información de medicamentos de la FDA (documento en línea) <http://www.drugs.com/pro/propafenone.html>. Fecha de consulta: Abril 2010
12. Francisco Femenia et al. Proarrhythmia Induced by Propafenone: What is the Mechanism? *Indian pacing and electrophysiology Journal*. 2010; 10 (6): 278-280.



13. Mino Afshar et al. A rapid HPLC Assay for the simultaneous determination of propafenone and its major metabolites in human serum. *Analytical science*. 2004; 20( 9): 1307-1311.
14. Hernández Abad Vicente. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el análisis farmacéutico. D.F. Facultad de estudios superiores Zaragoza. UNAM. 2008. Pp. 46-47, 52-56, 68-70.
15. Adrian García de Marina Benito del Castillo. Cromatografía líquida de alta resolución. 4ª edición. Editorial Limusa. 1988. Pp 37-47.
16. Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Inés Abelaira, Raúl Felipe Laba. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Artes graficas farro. 1992. Pp. 9-36.
17. Gary T. Bender. Métodos instrumentales de análisis en Química Clínica. Editorial Acribia, 1992. Pp 187-205.
18. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentos de química analítica. 8ª Edición. México: Cengage Learning. 2005. Pp.763- 776, 816- 827.
19. K.Robards, P.R.Haddad, P.E. Jac Robards, Kevin. Principles and practices of modern chromatography. Elsevier Academic press. 1994.
20. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y los procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación. Tomo DXLVIII No. 4. Mayo de 1999.
21. Flores Murrieta, Francisco Javier. Biodisponibilidad y bioequivalencia en los medicamentos genéricos: bases clínicas, analíticas y estadísticas. Ed Roberto medina Santillán. 2002.Pp 39-51.
22. Sadek PC. The HPLC solvent guide. EUA: John Wiley & Sons Inc. 1996. Pp. 1-5.
23. Juárez O. et al. Desarrollo y evaluación de una formulación extemporánea de propafenona para uso pediátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2009; 40(1): 42-45.
24. GL Hoyer et al. A HPLC method for the quantitation of propafenone and 5-hydroxy propafenone- *Chromatographia*. 1988; 25(12):1034-1037
25. Juárez Olguín H, et al. Comparative bioavailability of propafenone after administration of a magistral suspension vs. commercial tablets in healthy volunteers. 2009; 59 (3): 117-20.

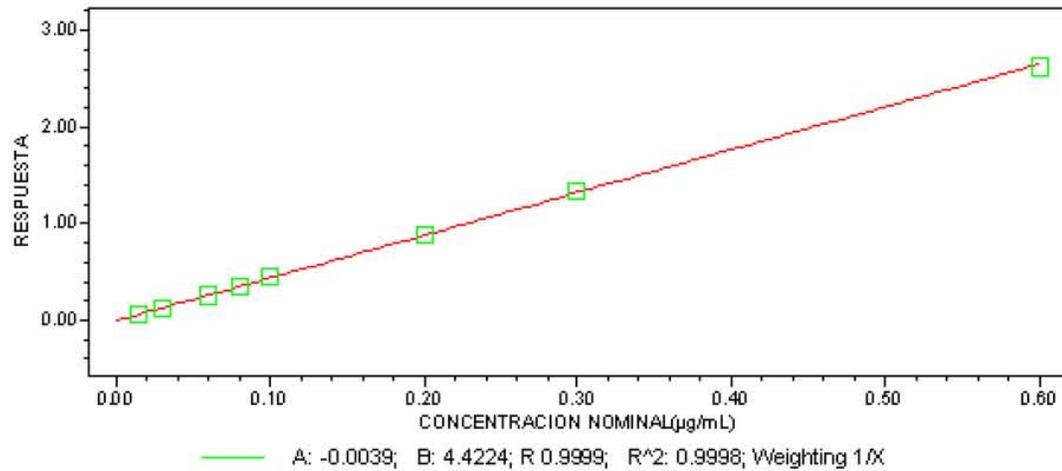
**8. Anexo.****GLOSARIO DE TÉRMINOS**

CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
UV	Ultravioleta
EI	Estándar interno
BP	Blanco de plasma
BP HEP	Blanco de plasma heparinizado
BP HEMO	Blanco de plasma hemolizado
BP LIPE	Blanco de plasma lipemico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
TSV	Taquicardias supraventriculares
WPW	Síndrome de Wolff-Parkinson-White
QT	Sístole Eléctrica
D.A	Desviación absoluta
C.V.	Coefficiente de Variación
DE	Desviación estándar
$\lambda$	Longitud de onda
R	Coefficiente de correlación
$R^2$	Coefficiente de determinación
$\beta$	Beta, receptores beta adrenérgicos
Cmax	Concentración plasmática máxima
$\mu\text{g}$	microgramos
Kg	kilogramos
$\mu\text{m}$	micrómetros

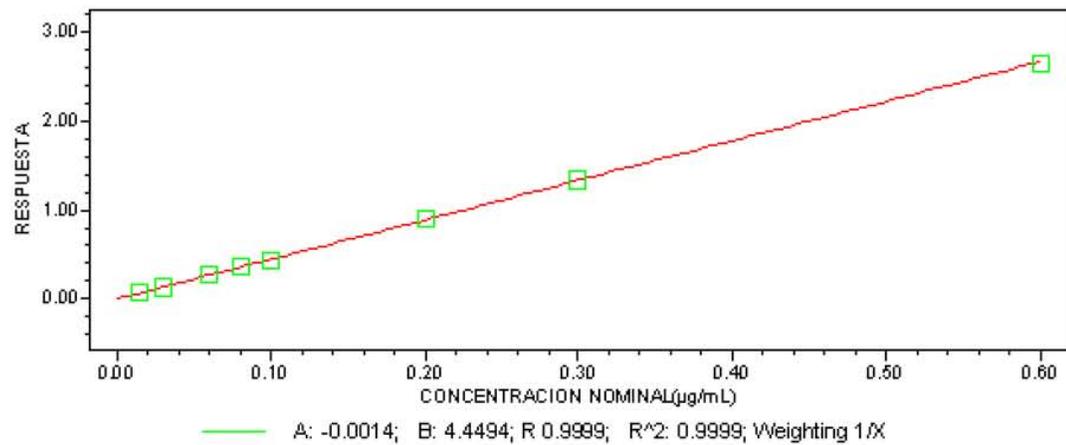


## Anexo I. Curvas de calibración linealidad

CURVA DE CALIBRACIÓN 1

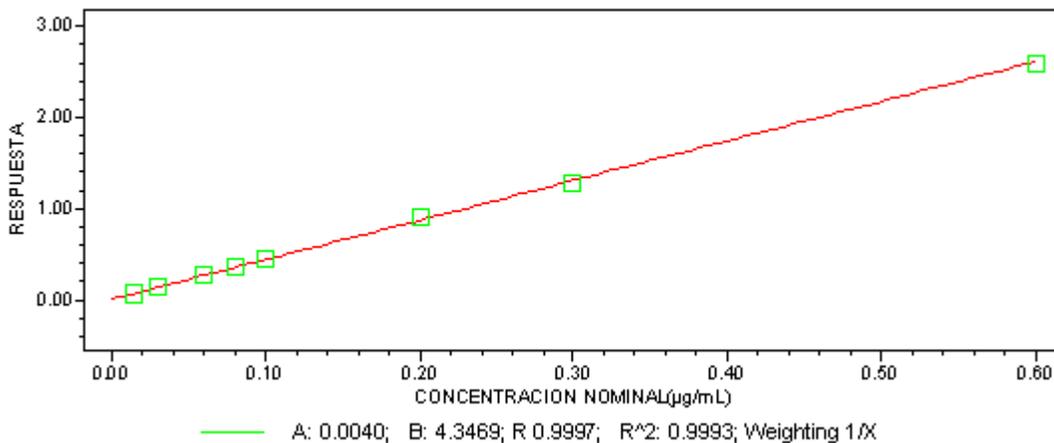


CURVA DE CALIBRACIÓN 2





## CURVA DE CALIBRACIÓN 3



Anexo II. Ciclos de congelación/descongelación.

Primer ciclo congelación/descongelación.

	Concentración recuperada		
	Tiempo Cero (Controles frescos)		
Control	Control Bajo (µg/mL)	Control Medio (µg/mL)	Control Alto (µg/mL)
1	0.043	0.090	0.529
2	0.041	0.088	0.533
3	0.043	0.095	0.536
Promedio	0.042	0.091	0.533
Desv. Estándar	0.001	0.004	0.004
% C.V.	2.728	3.962	0.659
	1er CICLO CONGELACION /DESCONGELACION		
Control	Control Bajo (µg/mL)	Control Medio (µg/mL)	Control Alto (µg/mL)
1	0.047	0.088	0.522
2	0.045	0.092	0.535
3	0.046	0.090	0.522
Promedio	0.046	0.090	0.526
Desv. Estándar	0.001	0.002	0.008
% C.V.	2.174	2.222	1.426
Desv. Abs. (%)	8.661	1.099	1.189



Segundo ciclo congelación/descongelación.

	Concentración recuperada		
	Tiempo Cero (Controles frescos)		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(µg/mL)</b>	<b>Control Medio(µg/mL)</b>	<b>Control Alto(µg/mL)</b>
1	0.047	0.097	0.496
2	0.047	0.089	0.493
3	0.043	0.087	0.497
<i>Promedio</i>	0.046	0.091	0.495
<i>Desv. Estándar</i>	0.002	0.005	0.002
<i>% C.V.</i>	5.057	5.815	0.420
	<b>2do CICLO CONGELACION /DESCONGELACION</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo (µg/mL)</b>	<b>Control Medio (µg/mL)</b>	<b>Control Alto (µg/mL)</b>
1	0.044	0.080	0.465
2	0.042	0.081	0.454
3	0.042	0.078	0.468
<i>Promedio</i>	0.043	0.080	0.462
<i>Desv. Estándar</i>	0.001	0.002	0.007
<i>% C.V.</i>	2.706	1.917	1.594
<i>Desv. Abs. (%)</i>	6.569	12.454	6.662



## Anexo III Estabilidad a largo plazo (congelación a -40°C a - 80 °C)

<b>Concentración recuperada</b>			
<b>(CONTROLES FRESCOS)</b>			
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0.047	0.091	0.510
2	0.047	0.091	0.510
3	0.048	0.089	0.520
Promedio	0.047	0.090	0.513
Desv. Estándar	0.001	0.001	0.006
% C.V.	1.220	1.278	1.125
Concentración nominal	0.045	0.090	0.500
% Desv abs	5.185	0.370	2.667
<b>Concentración recuperada</b>			
<b>9 DIAS</b>			
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0.044	0.085	0.469
2	0.043	0.088	0.453
3	0.044	0.085	0.478
Promedio	0.044	0.086	0.467
Desv. Estándar	0.001	0.002	0.013
% C.V.	1.322	2.014	2.713
% Desv abs	7.746	4.797	9.091



	Concentración recuperada		
	Tiempo Cero (CONTROLES FRESCOS)		
Control	Control Bajo( $\mu\text{g/mL}$ )	Control Medio( $\mu\text{g/mL}$ )	Control Alto( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.047	0.089	0.515
2	0.047	0.096	0.520
3	0.048	0.095	0.531
Promedio	0.047	0.093	0.522
Desv. Estándar	0.001	0.004	0.008
% C.V.	1.220	4.056	1.568
Concentración nominal	0.045	0.090	0.500
% Desv abs	5.185	3.704	4.400
	Concentración recuperada		
	44 DIAS		
Control	Control Bajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Control Medio ( $\mu\text{g/mL}$ )	Control Alto ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.040	0.087	0.496
2	0.044	0.089	0.494
3	0.046	0.089	0.500
Promedio	0.043	0.088	0.497
Desv. Estándar	0.003	0.001	0.003
% C.V.	7.050	1.307	0.615
% Desv abs	8.451	5.357	4.853



	<b>Concentración recuperada</b>		
	<b>Tiempo Cero (CONTROLES FRESCOS)</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
1	0.047	0.089	0.515
2	0.047	0.096	0.520
3	0.048	0.095	0.531
Promedio	0.047	0.093	0.522
Desv. Estándar	0.001	0.004	0.008
% C.V.	1.220	4.056	1.568
Concentración nominal	0.045	0.090	0.500
% Desv abs	5.185	3.704	4.400
	<b>Concentración recuperada</b>		
	<b>87 DIAS</b>		
<b>Control</b>	<b>Control Bajo (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Medio(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Control Alto(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
1	0.046	0.092	0.552
2	0.048	0.096	0.533
3	0.050	0.093	0.557
Promedio	0.048	0.094	0.547
Desv. Estándar	0.002	0.002	0.013
% C.V.	4.167	2.222	2.313
% Desv abs	1.408	0.357	4.853