



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR PARA
CUANTIFICACIÓN DE QUINFAMIDA EN MATRICES BIOLÓGICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA ALEJANDRA FLORES GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F. 2015



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: Helgi Helene Jung Cook

VOCAL: Profesor: Lauro Misael Del Rivero Ramírez

SECRETARIO: Profesor: Juan Manuel Rodríguez

1er. SUPLENTE: Profesor: Kenneth Rubio Carrasco

2° SUPLENTE: Profesor: María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CONJUNTO E, LABORATORIO 112

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Helgi Helene Jung Cook

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

SUSTENTANTE:

Diana Alejandra Flores González

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. Introducción y objetivos	1
2. Generalidades	3
2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución	3
2.2. Cuantificación en matrices biológicas y métodos de extracción	5
2.3. Validación de métodos analíticos	6
2.4. Quinfamida	10
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	10
2.4.2. Farmacodinamia	11
2.4.3. Farmacocinética	11
2.4.4. Métodos analíticos para la cuantificación de Quinfamida en fluidos biológicos	11
3. Parte experimental	13
3.1. Material, equipo, instrumentos y reactivos	13
3.1.1. Material	13
3.1.2. Equipo e instrumentos	14
3.1.3. Reactivos	14
3.2. Selección de longitud de onda	15
3.3. Preparación de fase móvil	15
3.4. Selección de columna cromatográfica	15
3.5. Preparación de soluciones	16
3.5.1. Solución stock de Quinfamida en Metanol	16
3.5.2. Solución de trabajo de Quinfamida en Metanol	16
3.5.3. Solución de trabajo de Quinfamida en plasma humano	16
3.5.4. Solución stock de Diazepam	16
3.5.5. Preparación de la curva de calibración	17
3.5.5.1. Preparación de la curva de calibración en Metanol	18

3.5.5.2. Preparación de la curva de calibración en plasma humano	19
3.5.5.3. Preparación de la curva de calibración en heces de pollo	20
3.6. Método de extracción	22
3.6.1. Método de extracción para muestras en plasma humano	22
3.6.2. Método de extracción para muestras de heces de pollo	23
3.7. Validación del método analítico	24
3.7.1. Selectividad	24
3.7.2. Límite inferior de cuantificación	24
3.7.3. Linealidad del sistema	25
3.7.4. Curva de calibración	25
3.7.5. Precisión y exactitud	26
3.7.5.1. Repetibilidad	26
3.7.5.2. Reproducibilidad	27
3.7.5.3. Exactitud	27
3.7.6. Estabilidad	28
3.7.6.1. Estabilidad a corto y largo plazo	28
3.8. Recuperación absoluta	29
4. Aplicación del método analítico	30
4.1. Muestras en plasma de pollo	30
4.2. Muestras en heces de pollo	30
5. Resultados y análisis	31
5.1. Método analítico	31
5.1.1. Fase móvil	31
5.1.2. Selección de la longitud de onda	31
5.1.3. Selección de la columna cromatográfica	31
5.2. Validación del sistema	33
5.2.1. Linealidad del sistema	33
5.3. Validación del método analítico	33
5.3.1. Curva de calibración en plasma humano	35

5.3.2. Precisión	40
5.3.2.1. Repetibilidad del método analítico	40
5.3.2.2. Reproducibilidad del método analítico	41
5.3.3. Límite de cuantificación	42
5.3.4. Estabilidad	43
5.3.5. Curva de calibración en heces de pollo	44
5.3.6. Precisión y exactitud	49
5.3.6.1. Repetibilidad del método analítico	49
5.3.6.2. Reproducibilidad del método analítico	50
5.3.7. Estabilidad	51
5.3.8. Recobro	53
5.4. Aplicación del método	54
5.4.1. Muestras en plasma de pollo	54
5.4.2. Muestras en heces de pollo	55
Conclusiones	56
Bibliografía	57
Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Método analítico reportado para matrices biológicas.	12
Tabla 2. Curva de Calibración de Quinfamida en Metanol.	18
Tabla 3. Curva de calibración de Quinfamida en plasma humano	19
Tabla 4. Curva de calibración de Quinfamida en heces de pollo	20
Tabla 5. Tiempo de retención del analito en diferentes columnas y flujo.	32
Tabla 6. Condiciones cromatográficas	32
Tabla 7. Resultados de la linealidad del sistema de Quinfamida en Metanol.	33
Tabla 8. Curva de calibración del método analítico para la cuantificación de Quinfamida en plasma humano.	35
Tabla 9. Parámetros de linealidad del método para cuantificar Quinfamida en Plasma	37
Tabla 10. Concentración experimental de Quinfamida en plasma extrapolada en la curva de calibración preparada en la misma matriz biológica.	38
Tabla 11. % de la cantidad recuperada respecto a la concentración nominal, la cual debe estar dentro del 15% para cada nivel de concentración, excepto para el LIC que puede ser menor o igual que 20 %	39

Tabla 12. Concentraciones de Quinfamida experimental resultado de extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración	40
Tabla 13. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.	41
Tabla 14. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.	42
Tabla 15. Resultados de concentraciones recuperada a las 24h después de congelación a -20 °C.	43
Tabla 16. Valores de respuesta de Quinfamida en el rango de concentración De 0.1 a 0.2 mg/g heces.	44
Tabla 17. Curva de calibración para cuantificar Quinfamida en heces de pollo	46
Tabla 18. Valores de concentración adicionada en comparación con la concentración recuperada en heces de pollo	47
Tabla 19. % de la cantidad recuperada respecto a la concentración nominal, la cual debe estar dentro del 15% para cada nivel de concentración, excepto para el LIC que puede ser menor o igual que 20%.	48
Tabla 20. Concentraciones de Quinfamida experimental resultado de extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.	49

Tabla 21. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.	50
Tabla 22. Concentraciones de Quinfamida experimental a las 24 h	51
Tabla 23. Concentraciones de Quinfamida experimenta a 1 mes después de congelación.	52
Tabla 24. % Recobro de Quinfamida en heces	53
Tabla 25. Respuesta de Quinfamida en muestras de plasma de pollo	54
Tabla 26. Cálculos para determinar la cantidad de Quinfamida en heces de Pollo.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 Estructura química de la Quinfamida	10
Fig. 2. Método de extracción de Quinfamida en plasma.	22
Fig. 3. Método de extracción en heces de pollo.	23
Fig. 4. Linealidad del sistema	34
Fig. 5. Curva de calibración del método analítico para cuantificar Quinfamida en plasma.	36
Fig. 6. Curva de calibración del método analítico para cuantificar Quinfamida en heces de pollo	45

1. Introducción y objetivos (1, 2, 3, 4, 6, 7, 15)

Las infecciones por parásitos y helmintos son cada vez más frecuentes tanto en humanos como en animales, lo que representa un riesgo a la salud. Los parásitos más frecuentes en aves provienen de protozoos del *Phylum Apicomplexa*, familia *Eimeriidae*. Aunque afecta a diversas especies de aves, es en la gallina ponedora donde alcanza la mayor repercusión económica. Este protozoario produce la coccidiosis aviar, que es una enfermedad parasitaria producida mediante la ingestión de ooquistes esporulados, que dan lugar a un proceso de carácter clínico, caracterizado por diarrea y descenso de las producciones.

La destrucción de las células epiteliales es el principal mecanismo de patogenicidad que subyace en la pérdida de la productividad de los animales infectados. Como consecuencia, se desencadena un síndrome de malabsorción lo que determina la pérdida de peso, el descenso de la puesta y alteraciones en la calidad de la carne y de los huevos.

En humanos, la Quinfamida está indicada para el tratamiento y profilaxis de la amebiasis intestinal tanto aguda activa como en portador asintomático causada por amebas patógenas como *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad está caracterizada por producir diarrea mucosa con sangre, dolor abdominal, pérdida de peso, úlceras en colón que pueden complicarse a peritonitis y megacolon tóxico.

En veterinaria se ha usado en hámster como medida preventiva para la re-infección contra *Eimeria criceti* y *Trichinella spiralis* así como en hurón y oveja para el tratamiento de la coccidiosis y giardiasis.

Considerando que a la fecha no se ha estudiado la eficacia anti protozoaria ni la farmacocinética de la Quinfamida en las aves de corral, se desarrolló el presente trabajo cuyo objetivo fue:

- Validar un método analítico para cuantificar Quinfamida en plasma y heces de pollo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV-Vis.

2. GENERALIDADES

2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución ^(18.8)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una antigua técnica instrumental que ha evolucionado en los últimos años. Se caracteriza por ser un método altamente sensible y específico para un analito en particular debido a que tanto las fases previas de extracción como los procedimientos cromatográficos son llevados a cabo en función de la molécula de interés.

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla que es disuelta en una fase móvil (líquido). Esta fase móvil es impulsada a través de una fase estacionaria en la cual es inmisible (sólida). Estas dos fases se eligen de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas que presenten los analitos de interés como solubilidad, tamaño, polaridad, afinidad etc. Con esto se determina el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en la mezcla. Esto es debido a que si un componente interactúa más con la fase estacionaria, eluirá más lento, en cambio, si interactúa más con la fase móvil, eluirá más rápido y por lo tanto su separación será más rápida.

La cromatografía de líquidos de alta resolución se puede emplear como técnica preparativa y/o analítica, permitiendo así la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado.

La señal detectada del analito de interés es transmitida en un gráfico llamado cromatograma a través de picos que pueden identificarse por su ancho, altura o área. Para cuantificar se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada del analito.

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución cuenta con un sistema de bombeo, un sistema de inyección de muestra, un detector, y columnas analíticas.

Detector

Son de dos tipos básicos. Los que se basan en la propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil como lo es el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en la propiedad del soluto responden a alguna de sus propiedades como su absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión.

En relación a las polaridades relativas de la fase móvil y estacionaria se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto, la llamada fase normal en la que la fase estacionaria es polar mientras que la fase móvil es no polar, y la de fase reversa en la que la fase estacionaria es no polar mientras que la fase móvil es polar. De esta manera en la cromatografía de fase reversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.

La mayor parte de los empaques con fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida. La superficie de ésta se encuentra totalmente hidrolizada y está constituida por grupos silanoles (SiOH). En la cromatografía de líquidos de fase normal se utilizan fases estacionarias de elevada polaridad como agua o trietilenglicol colocadas sobre partículas de sílice o alúmina. Por el contrario, en la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria no polar con frecuencia es un hidrocarburo, mientras que la fase móvil polar suele ser agua, metanol o acetonitrilo. De igual manera los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido tiene carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento es polar. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C8 (n-octilo) o C18 (n-octadecilo), y cuando son fase normal, R es un grupo funcional como los grupo Ciano (C_2H_4CN), diol ($D_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$), amino ($C_3H_6NH_2$) o dimetilamino ($C_3H_6N(CH_3)_2$). El grupo ciano es el menos polar y el tipo amino es el más polar.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria debe ser similar a la del analito y para la elución se usa una fase móvil con una polaridad distinta a la del analito.

Algunos parámetros importantes que indican la calidad de la separación del analito en la mezcla son: eficiencia, selectividad y resolución. La eficiencia está dada por el número de platos teóricos (N), los cuales representan el número de veces en que el analito está en contacto con los platos. Es decir, cuántos más platos teóricos hayan, mayor será la eficiencia. La selectividad (α) es la capacidad de separación de dos analitos en la columna y la resolución indica la calidad de una separación entre dos compuestos.

2.2 Cuantificación en matrices biológicas y métodos de extracción ^(10,5)

Las matrices biológicas más empleadas son sangre, plasma, suero, orina, saliva y heces.

Entre las técnicas de extracción de fármacos de fluidos biológicos, las más utilizadas son por precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida. La extracción en fase sólida requiere de diferentes etapas:

- Etapa de acondicionamiento: en donde se lleva a cabo la activación del adsorbente y de los grupos funcionales haciendo pasar un volumen de disolvente apropiado a través del cartucho. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa por lo general metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o diclorometano.
- Etapa de carga de muestra: es en la que se aplica la muestra en la parte superior del lecho adsorbente. De esta manera los contaminantes de la matriz pasan a través de la columna sin ser retenidos, mientras que componentes como el analito pueden retenerse en la superficie del adsorbente.

- Etapa de lavado: en la que se permite eliminar cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos unidos al adsorbente.
- Etapa de secado: en la que trazas del disolvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2-10 min lo cual mejora el rendimiento de la extracción.
- Etapa de la elución: se hace pasar un disolvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-disolvente y así eluir el compuesto de interés. Para esto el disolvente debe tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas. Para mantener alto el factor de concentración, el volumen de elución debe ser el menor posible.
- Etapa de concentración: el analito de interés puede o no concentrarse evaporando el disolvente y reconstituirse posteriormente o bien, inyectar directamente del eluido obtenido.

La extracción asistida por baño de ultrasonidos, también conocida como sonicación, es una técnica que utiliza ondas de ultrasonidos para agitar la muestra sumergida en el disolvente orgánico. Después de la extracción, se separa por centrifugación y/o filtración del disolvente orgánico con los compuestos extraídos. Con esta técnica se acorta el tiempo de extracción debido a que se produce un incremento en la presión, que favorece la penetración y el transporte de los compuestos, y un incremento de la temperatura que aumenta la solubilidad y favorece la difusividad. Como la temperatura que se alcanza no es muy elevada, la sonicación es adecuada para extraer sustancias termolábiles.

2.3 Validación de métodos analíticos ^(11,17)

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, la validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Para esto se tienen que cumplir como mínimo los siguientes parámetros. Estos son: selectividad, límite inferior de cuantificación, curva de calibración, precisión, exactitud y estabilidad.

Selectividad

Este parámetro sirve para demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de ésta. Se deben considerar las posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz biológica.

La respuesta analítica si es que hubiera de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y 5% para el estándar interno cuando aplique.

Límite inferior de cuantificación

Es la concentración mínima de analito que puede ser cuantificada cumpliendo con la precisión y exactitud. Se debe determinar con base en el 5% del $C_{\text{máx}}$ reportado para el analito de interés a menos que las necesidades del estudio requieran otra cosa.

Curva de calibración

Se debe establecer el intervalo de la curva de calibración en función a las concentraciones esperadas del (os) analito (s) a cuantificar durante el análisis de las muestras. Se deben caracterizar por lo menos seis concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco. Se debe definir un modelo matemático que describa adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración. Deben evaluarse como mínimo tres curvas de calibración e incluir los resultados de la concentración recuperada y el por ciento de desviación.

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que éste puede ser del 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración deben cumplir con este criterio.

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

Se debe tener un coeficiente de correlación (r) igual o mayor a 0.99

Precisión

Mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Se mide a través de la repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad consiste en que en una misma corrida analítica se analicen al menos por quintuplicado se analicen las muestras control: límite inferior de cuantificación (LIC), muestra control bajo (MCB), muestra control medio (MCM) y muestra control alto (MCA).

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos.

Para evaluar la reproducibilidad se deben analizar al menos por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos dos días, las muestras control: LIC, MCB, MCM y MCA.

Para cada muestra control (MC) se debe calcular la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

Exactitud

Indica la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia nominal. Se obtiene a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad calculando la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

Estabilidad

Es la capacidad de un fármaco de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, la Norma indica estabilidad a corto y largo plazo, así como estabilidad de muestra procesada (a temperatura ambiente o bajo condiciones de almacenamiento a ser usadas durante el estudio), en el automuestreador, ciclos de congelación-descongelación y en solución.

2.4 QUINFAMIDA

La Quinfamida es un derivado del dicloroacetilquinolinol, el cual es empleado para tratamientos de amebiasis intestinal en humanos.

2.4.1 Propiedades fisicoquímicas ^(12,14)

Fórmula molecular: $C_{16}H_{13}Cl_2NO_4$

Peso molecular: 354.184692 Da

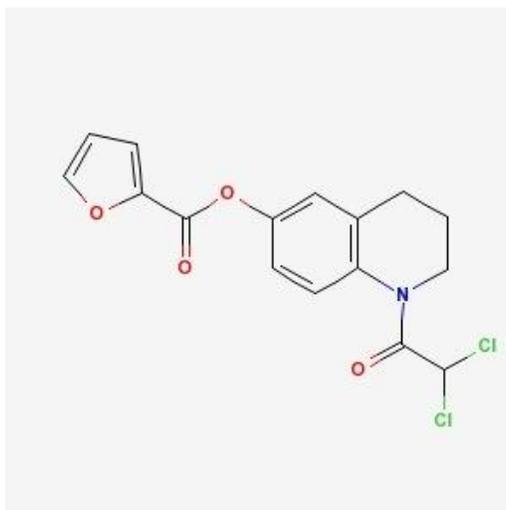


Fig.1 Estructura química de la Quinfamida

Nombre IUPAC: 1 - (dicloroacetilo) -1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil 2-furoato

Nombre común: Quinfamida

Índice de refracción: 1.6

Densidad: 1.428 g/cm³

Temperatura de ebullición: 551.3°C 760mmHg

Temperatura de fusión: 145-146 °C

Solubilidad: Poco soluble en agua y soluble en cloroformo.

2.4.2 Farmacodinamia ^(13,15)

La Quinfamida es un amebicida intraluminal, con alta eficacia terapéutica en humanos y baja toxicidad. Su mecanismo de acción consiste en la inmovilización intraluminal del trofozoito de *Entamoeba histolytica*.

Estudios *in vitro* han demostrado que la Quinfamida a concentración de 20 ug/ml inhibe el crecimiento y la motilidad del parásito. El fármaco controla también la propagación de la amibiasis.

2.4.3 Farmacocinética ^(10, 13,15)

Se ha reportado que después de la administración por vía oral se absorbe poco e irregularmente del tracto gastrointestinal. Adicionalmente se ha reportado en estudios *in vitro* que en sangre total humana, una pequeña fracción de dosis de este fármaco que se llega a absorber se hidroliza en metabolitos menos activos al cabo de minutos.

La farmacocinética para uso veterinario no ha sido completamente descrita. Se sabe que se excreta en mayor porcentaje en heces.

2.4.4 Métodos analíticos para la cuantificación de Quinfamida en fluidos biológicos.

La información en la literatura es escasa, lo cual puede estar asociado a su baja absorción del tracto gastrointestinal. Morales y colaboradores ⁽⁹⁾ reportan una técnica de extracción en fase sólida para la cuantificación en plasma y una técnica de extracción por centrifugación para el caso de heces.

La técnica de extracción en fase sólida para plasma fue la que se empleó en este trabajo para la cuantificación de Quinfamida en plasma.

Por otro lado, la técnica de liofilización para heces reportada por Morales y colaboradores ⁽⁹⁾, tuvo algunas modificaciones. A continuación se muestra la técnica original:

-Etapa de disolución: Se pesan 10 mg de muestra fecal liofilizada y se transfiere a un tubo de ensayo de 25mL. Se añaden 10 mL de Acetonitrilo y se somete a baño de ultrasonido durante 30 min.

-Etapa de separación: Se centrifuga a 3000 rpm durante 20 min.

Después del tiempo transcurrido, la fase orgánica (Acetonitrilo) se concentra en baño maría bajo atmósfera de nitrógeno a sequedad

-Etapa de reconstitución: Se añade 1mL de Acetonitrilo y 1mL del estándar interno (10ug/mL). Se agita la muestra y se inyectan 20uL al cromatógrafo.

Tabla 1. Método analítico reportado para matrices biológicas. (9 ,10)

Parámetros	Plasma Humano	Heces de humano
Estándar interno	Diazepam	Diazepam
Columna analítica	Fase reversa, Zorbax SB-CN 250X4.6 mm	Fase reversa, Zorbax SB-CN 250X4.6 mm
Fase móvil	Agua: Metanol: Acetonitrilo (40:50:10)v/v	Agua: Metanol: Acetonitrilo (40:50:10)v/v
Rango de trabajo	0.08 – 2.0 ug / mL	N/A
Instrumento de detección	UV-Vis 269 nm	UV-Vis 269 nm
Flujo	0.7 mL/min	0.7 mL/min

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material, equipo, instrumentos y reactivos

3.1.1 Material

Matraces volumétricos de 10 y 100mL.

Micropipetas de 100 - 1000uL Eppendorf Research

Puntas para micropipeta

Membrana de filtración de nylon HNWP 0.45 um de diámetro marca Waters

Viales para automuestreador

Pipetas Pasteur

Vasos de precipitados de 100 mL y 250 mL

Frasco con tapa de rosca de 100 mL

Guantes

Tubos de ensayo

Viales para evaporador 1.5mL Eppendorf

Gradilla para tubos

Gradilla para viales

Cartuchos Sep-Pak Vac 3cc (500mg) C18 Fase sólida Waters

Probetas volumétricas de 100 y 500 mL

Columnas cromatográficas fase reversa C18

-XSELECT TM HSS CYANO 5um 4.6x250mm PN186005946 LN104333441

-AGILENT ZORBAX SB-CN 4.6X150mm PN 863953-905 LN B11058

3.1.2 Equipo, instrumentos

Espectro UV-Vis Shimadzu UV-Vis 1601

Centrífuga Eppendorf 5416

Baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Shimadzu que consta de:

Sistema de bombeo LC-10AD VP (bomba binaria)

Automuestreador SIL—10A (con control de temperatura)

Detector SCL-10A VP (con UV variable)

Agitador tipo Vórtex Science MED MX-S

Congelador

Sistema de Purificación de agua Millipore 0.22 μ m

Refrigerador

Concentrador Vacufuge plus Eppendorf con vacío.

Manifold (Sistema de separación fase sólida con vacío) con 24 posiciones

Balanza analítica Sartorius A9

3.1.3 Reactivos

Agua grado cromatográfico

Metanol J.T Baker, grado HPLC

Acetonitrilo J.T Baker, grado HPLC

Quinfamida (sustancia de referencia) Laboratorio Aranda salud animal,

Pureza: 98.0 %, Lote: 0040307

Diazepam (sustancia de referencia secundaria) Laboratorios Silanes S.A de C.V

pureza 98.4% Lote: 0812001269

Plasma Humano procedentes de donadores.

Plasma de pollo proporcionada por Facultad de veterinaria CU.

Heces de pollo liofilizadas proporcionadas por Facultad de veterinaria CU.

3.2 Selección de longitud de onda

Se realizó un barrido en el espectro UV para establecer la longitud de onda con máxima absorción y por lo tanto de detección.

3.3 Preparación de fase móvil

Agua: Metanol: Acetonitrilo (40- 50 – 10) v/v %.

Medir cuantitativamente 400 mL de Agua grado cromatográfico obtenida del Sistema de purificación de Agua Milli-Q; 500 mL de Metanol y 100 mL de Acetonitrilo. Mezclar, filtrar a través de membrana de nylon 0.45 μ m y desgasificar 30 min en un baño de ultrasonido.

3.4 Selección de la columna cromatográfica

Con la finalidad de encontrar la separación más adecuada, se evaluaron las siguientes columnas cromatográficas

- XSELECT TM HSS CYANO 5 μ m 4.6x250mm
- ZORBAX SB-CN 3.5 μ m 4.6x150mm

Para ambas columnas se inyectó un volumen de muestra de 20 μ L, mientras que los flujos de trabajo probados fueron 0.6 mL/min, 0.8 mL/min, 0.9 mL / min y 1.2 mL/min.

3.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

3.5.1 Solución Stock de Quinfamida en metanol.

Pesar y transferir cuantitativamente lo equivalente a 10 mg de Quinfamida a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 50 mL de Metanol grado HPLC y colocar en el baño de ultrasonido durante 15 min para disolver. Enfriar y llevar al aforo con el mismo disolvente. Se obtiene una concentración de 100 ug /mL.

3.5.2. Solución de trabajo de Quinfamida en metanol.

Transferir cuantitativamente 1 mL de la Solución Stock de Quinfamida a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con Metanol grado HPLC. Se obtiene una concentración de 10 ug / mL.

3.5.3 Solución de stock de Quinfamida en Plasma Humano.

Transferir cuantitativamente 1 mL de la Solución Stock de Quinfamida en metanol a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con plasma humano. Se obtiene una concentración de 10 ug / mL.

3.5.4 Solución stock de Diazepam

Pesar y transferir cuantitativamente 5 mg de Diazepam a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 50 mL de Metanol grado HPLC y sonicar por 15 min para disolver. Enfriar y llevar al aforo con el mismo disolvente. Se obtiene una concentración de 50 ug / mL. Con esta solución se realizó una dilución tomando una alícuota de 1mL y aforar a 10mL con Metanol grado HPLC para obtener una concentración de 5 ug/ mL.

Nota: El Diazepam no se empleó para la validación como estándar interno debido a que el %recobro no era consistente.

3.5.5 Preparación de la curva de calibración

Se establece el intervalo de la curva de calibración en función a las concentraciones esperadas del analito a cuantificar. En el trabajo de Morales (10) se establecen las concentraciones de 0.08 ug/mL – 2.0 ug /mL. Se decide aceptar este intervalo de concentraciones ya que se ha reportado que muy bajo porcentaje de Quinfamida llega al torrente sanguíneo después de ser administrada vía oral por lo que las muestras pueden ser cuantificadas. Adicionalmente se hicieron adecuaciones al intervalo, estableciendo el límite inferior de cuantificación como 0.1 ug /mL, el cual se reporta más adelante. Finalmente las concentraciones de la curva de calibración en plasma son: 0.1 ug/mL, 0.2 ug/mL, 0.4 ug/mL, 0.6 ug /mL, 1.0 ug/mL y 2.0 ug/mL.

Nota: El proceso de validación se realizó en plasma humano y no en plasma de pollo debido a que no se contó con suficiente muestra de plasma de pollo.

Para el caso de la curva de calibración en heces se parte de una curva de Quinfamida en metanol con las siguientes concentraciones: 0.1 ug/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg /mL, 1.0 mg/mL y 2.0 mg/mL que al ser adicionadas a 10mg de heces las concentraciones finales quedan de la siguiente manera: 0.01 mg/g heces, 0.02 mg/ g heces, 0.04 mg / g heces, 0.06 mg/ g heces, 0.1 mg/ g heces y 0.2 mg / g heces.

En total se tienen seis niveles de concentraciones distintas para cada curva de calibración sin incluir la muestra blanco.

3.5.5.1 Preparación de la curva de calibración en metanol

Transferir cuantitativamente los siguientes volúmenes de la solución de trabajo de Quinfamida en metanol a matraces volumétricos de 10 mL y aforar con el mismo disolvente grado HPLC.

Tabla 2. Curva de Calibración de Quinfamida en Metanol.

Sol. de trabajo de Quinfamida en metanol [10 ug / mL]	Aforo en Metanol	Conc. Quinfamida en Metanol
100 uL	10 mL	0.1 ug/mL
200 uL	10 mL	0.2 ug/mL
400 uL	10 mL	0.4 ug/mL
600 uL	10 mL	0.6 ug/mL
1000 uL	10 mL	1.0 ug/mL
2000 uL	10 mL	2.0 ug/mL

3.5.5.2 Preparación de la curva de calibración en plasma humano

Transferir cuantitativamente los siguientes volúmenes de la solución de trabajo de Quinfamida en plasma humano (10 ug /mL) a matraces volumétricos de 10 mL cada uno y aforar con plasma humano.

Tabla 3. Curva de calibración de Quinfamida en plasma humano.

Alícuota de solución de trabajo de Quinfamida en plasma humano [10 ug / mL]	Aforo con Plasma humano	Conc. Quinfamida en plasma humano
100 uL	10 mL	0.1 ug/mL
200 uL	10 mL	0.2 ug/mL
400 uL	10 mL	0.4 ug/mL
600 uL	10 mL	0.6 ug/mL
1000 uL	10 mL	1.0 ug/mL
2000 uL	10 mL	2.0 ug/mL

El porcentaje del disolvente utilizado no es mayor al 5% del volumen final preparado.

3.5.5.3 Preparación de la curva de calibración en heces de pollo

Pesar y transferir cuantitativamente 10 mg de heces liofilizadas de pollo a 6 tubos de ensayo de 10 mL. Añadir 1 mL de cada solución de la curva de calibración de Quinfamida en metanol en el rango de [0.1 – 2.0 ug / mL].

Tabla 4. Curva de calibración de Quinfamida en heces de pollo

mg de heces de pollo liofilizadas	Concentraciones [ug/mL] de Quinfamida en la curva de calibración en Metanol	Alícuota (µL) de las soluciones de Quinfamida en Metanol	Concentración final [mg/g heces]
10	0.1	1000	0.01
10	0.2	1000	0.02
10	0.4	1000	0.04
10	0.6	1000	0.06
10	1.0	1000	0.10
10	2.0	1000	0.20

Proceso de extracción:

A 1mL de la solución de heces se agrega 1mL de Acetonitrilo y 2mL de Metanol.

Ejemplo de cálculo para obtener las concentraciones finales de la curva de calibración de Quinfamida en Metanol:

$$1\text{mL} \left(\frac{0.1\text{ug Quinfamida}}{\text{mL}} \times \frac{1}{0.01\text{g heces}} \times \frac{1\text{mg Quinfamida}}{1000\text{ug Quinfamida}} \right) = \frac{\text{mg Quinfamida}}{\text{g heces liofilizadas}}$$

1mL = 1000 uL de alícuota de la solución de Quinfamida en metanol

(0.1 µg Quinfamida /mL) = concentración de la solución de Quinfamida en metanol

0.01 g heces = 10mg de heces liofilizadas de pollo

3.6 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

3.6.1 Método de extracción para muestras de plasma humano

El método a seguir fue el siguiente: se activaron los cartuchos C18 con 3mL de metanol y 2mL de agua grado cromatográfico. Se añadió 1mL de muestra plasmática y se lavó con 12 mL de agua. Se eluyó la Quinfamida con 1mL de Acetonitrilo empleando un flujo de 1mL / min a través de un sistema de vacío. Se inyectaron 20uL al cromatógrafo. En la figura 2 se resume el proceso utilizado.

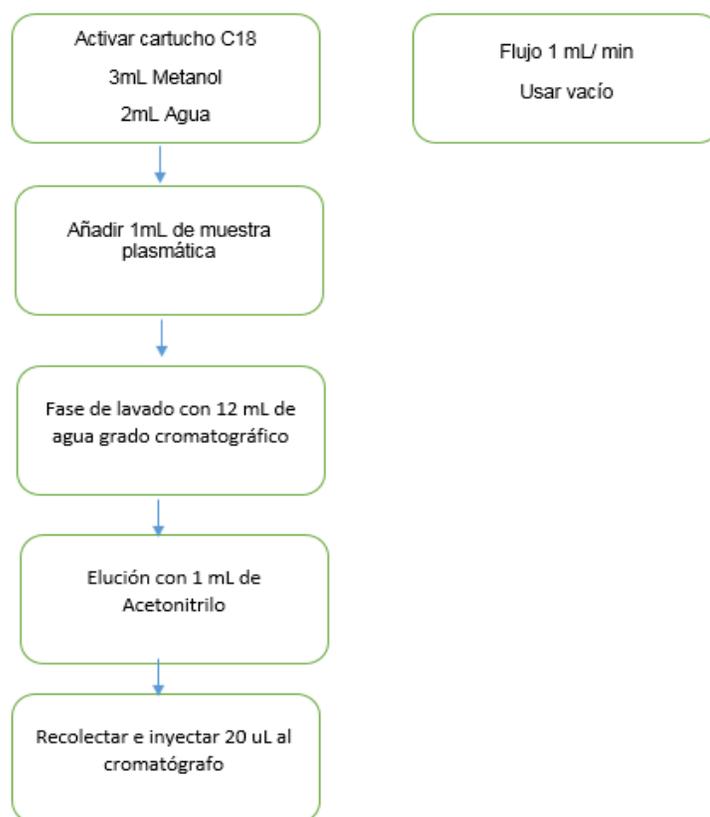


Fig. 2. Método de extracción de Quinfamida en plasma.

3.6.2 Método de extracción para muestras de heces de pollo.

A las muestras (1mL de heces en metanol de la curva de calibración) se les añadió 1mL de Acetonitrilo y 2 mL de Metanol fase orgánica) para disolver. Se colocaron en baño de ultrasonido por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. Se transfirió la fase orgánica a tubos eppendorf y se evaporaron los disolventes (Metanol y Acetonitrilo) en un concentrador a 60°C. Finalmente las muestras se reconstituyeron con 1mL de Metanol. En la figura 3 se resume el proceso utilizado.

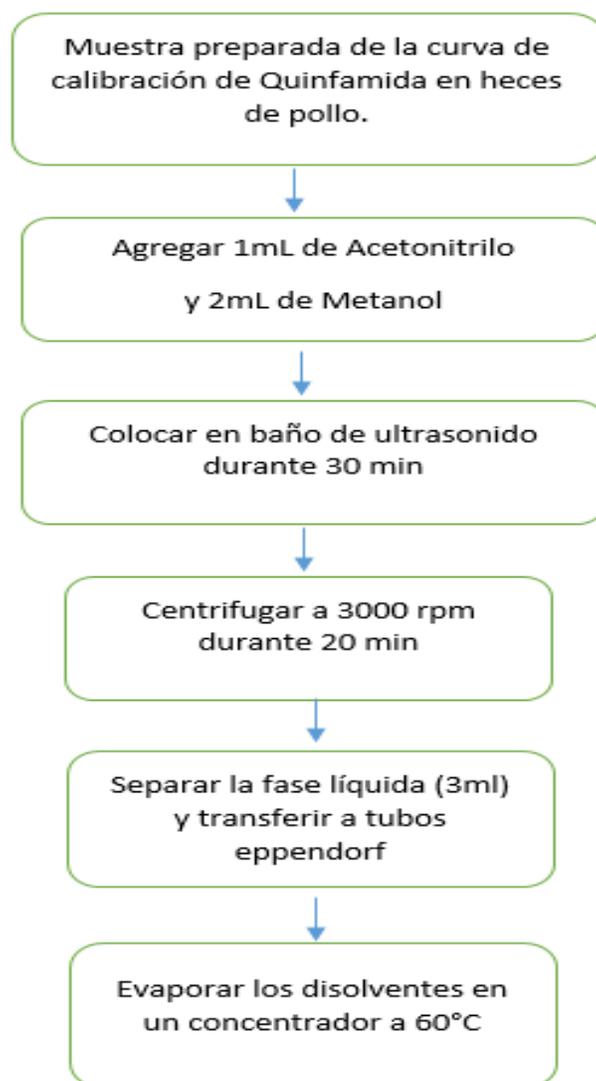


Fig. 3. Método de extracción en heces de pollo.

3.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para demostrar que el método analítico era consistente, se validó siguiendo algunos de los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 en lo referente a los criterios y requisitos para realizar pruebas de bioequivalencia en humanos, a pesar de que el método no esté destinado para realizar pruebas de bioequivalencia en humanos. Los parámetros a evaluar fueron: selectividad, límite inferior de cuantificación, curva de calibración, precisión, exactitud y estabilidad.

3.7.1 Selectividad

Se analizaron las muestras blanco de la matriz biológica, (plasma y heces de pollo sin adicionar el analito) se realizó el procedimiento de extracción establecido en las secciones 3.6.1 y 3.6.2 y se inyectó al cromatógrafo la muestra correspondiente al límite inferior de cuantificación.

Parámetro: El método se considera selectivo cuando la respuesta analítica de las posibles interferencias próximas al tiempo de retención de Quinfamida es menor al 20 % para el límite inferior de cuantificación.

3.7.2 Límite inferior de cuantificación

Para determinar el límite inferior de cuantificación (LIC), se preparó por quintuplicado la concentración de 0.01 ug/mL en plasma humano. Se llevó a cabo el método de extracción descrito en la sección 3.6.1 y con las respuestas de alturas de los picos, se calculó el % Desviación para cada nivel de concentración. El límite de cuantificación en heces se estableció 0.01 mg/g por ser la concentración inferior en la curva de calibración.

Parámetro: El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor o igual que 20 %.

3.7.3 Linealidad del sistema

La NOM-177-SSA1-2013 no solicita este parámetro, no obstante, se documenta de la siguiente manera: se prepararon tres curvas de calibración de Quinfamida independientes en metanol en el rango de concentración de [0.1 ug/mL-2.0 ug/mL]. Se transfirieron en viales para cromatografía, y se inyectaron al sistema HPLC 20 uL. Se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

Criterios de aceptación: El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.99

3.7.4 Curva de calibración

Para el caso del plasma humano, se prepararon tres curvas de calibración de Quinfamida en el rango de concentración de 0.1ug/mL-2.0ug/mL. Se llevó a cabo el método de extracción descrito en la figura 2. A partir de los resultados de altura y concentración, se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

Para el caso de las heces de pollo, se prepararon cinco curvas de calibración de Quinfamida en un rango de concentración de [0.01 – 0.2 mg / g heces]. Se llevó a cabo el método de extracción descrito en la figura 3. A partir de los resultados de altura y concentración, se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

Criterios de aceptación:

- a. El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.99
- b. La desviación absoluta (%DEA en cada nivel de concentración deberá ser menor o igual que el 15%, excepto para el LIC, que puede ser hasta del 20%.
- c. Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual

que el 20 %. Al menos el 75 % de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

d. Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15 % de la concentración nominal y 20 % para el límite inferior de cuantificación.

3.7.5 Precisión y exactitud

Para determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento varias ocasiones, se evaluó la repetibilidad en la misma corrida analítica y la reproducibilidad en diferentes corridas analíticas. De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación).

3.7.5.1 Repetibilidad

Se analizaron en la misma corrida analítica por quintuplicado los puntos control, MCB, MCM y MCA (0.5, 1.3 y 1.6 ug/mL en muestras de plasma) y MCB, MCM y MCA (0.05, 0.13 y 0.16 mg/g muestras de heces). Los valores de respuesta se interpolaron en la curva de calibración correspondiente y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El Coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

3.7.5.2 Reproducibilidad

Se analizaron en tres corridas analíticas diferentes las muestras control MCB, MCM y MCA, (0.5, 1.3 y 1.6 ug/mL en muestras de plasma) y MCB, MCM y MCA (0.05, 0.13 y 0.16 mg/g muestras de heces). El análisis se realizó por quintuplicado el primer día, por triplicado el segundo día y por duplicado el tercer día. Los valores de respuesta se interpolaron en la curva de calibración correspondiente y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El Coeficiente de variación del valor promedio no debe ser mayor que el 15%.

3.7.5.3 Exactitud

A partir los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

Criterio de aceptación: El % de Desviación para cada réplica debe ser menor al 20% en el punto más bajo y menor el 15% en los otros dos puntos.

3.7.7 Estabilidad

Para determinar las condiciones en que la Quinfamida permanece estable en la matriz biológica se evaluaron por triplicado las muestras control, los cuales fueron analizados a corto y largo plazo.

3.7.7.1 Estabilidad a corto y largo plazo

Para el método en plasma se prepararon por sextuplicado los puntos control bajo y alto (0.5 y 1.6 ug/mL). Los primeros tres se analizaron. Los otros tres, se guardaron en el congelador a -20°C por 24h y al término de éste periodo se analizaron junto a una curva de calibración preparada ese día.

Para el caso del método en heces, se prepararon por sextuplicado los puntos control bajo, medio y alto (0.05, 0.13 y 0.16 mg/ g) los cuales guardaron en congelación a -20 °C por 24 h y al término de este periodo se sacaron y solo se analizaron tres puntos control bajo y medio (0.05 y 0.13 mg/ g heces), mientras que los otros tres se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el término del análisis de los primeros tres. Para analizar la estabilidad a largo plazo y ciclo de congelación-descongelación, los restantes tres puntos control, bajo y alto (0.05 y 0.16 mg / g heces) se volvieron a introducir al congelador a -20 °C durante 1 mes y se analizaron al término de este periodo.

Los valores de respuesta (altura) se interpolaron en la curva de calibración correspondiente y se calculó la concentración de Quinfamida experimental. Para cada nivel se calculó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

3.7.8 Recuperación absoluta

Se compararon los resultados de las soluciones de Quinfamida en metanol, con los resultados obtenidos en heces.

Para cada nivel de concentración, se calculó el porcentaje de recobro empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \frac{\text{Respuesta de la muestra}}{\text{Respuesta de la solución}} \times 100$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no debe ser del 100%, pero debe ser reproducible en los diferentes niveles de concentración. La norma no lo exige como parámetro a evaluar, sin embargo se reporta para el método en heces.

4. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.1 Muestras en plasma de pollo

Con el fin de evidenciar la aplicación del método para estudios de farmacocinética de Quinfamida, se determinó la concentración de Quinfamida muestras de plasma de pollo a los cuales se les administró una dosis de 30 y 60 mg/kg de peso.

Para cada dosis, se tomaron muestras a las 1 y 4 h.

Las muestras se procesaron, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.6.1 y se interpolaron en una curva de calibración preparada el mismo día del análisis.

4.2 Muestras en heces de pollo

Para el estudio en heces, Se administró una dosis de Quinfamida de 30mg/kg de peso (75 mg de Quinfamida por cada 2.5 kg de pollo); se colectaron las heces de dos pollos durante 24 horas, a las cuales se les asignaron los códigos: Muestra A y B. De la muestra A se obtuvo un peso de 145 g de heces sin liofilizar y la muestra B 95 g de heces sin liofilizar. 60 g de heces sin liofilizar equivale a 27.8 g de heces liofilizadas. (El factor se obtuvo al pesar las heces antes y después de liofilizar).

Se procesaron las muestras con el método de extracción descritos en la sección 3.6.2 y se interpolaron en una curva de calibración preparada el mismo día del análisis. (La muestra final se reconstituye con 6mL de Metanol antes de inyectarse 20 uL al cromatógrafo).

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante la validación para evidenciar que el método cumple con los requisitos indispensables para lo cual está diseñado.

5.1 Método Analítico

5.1.1 Fase móvil

La fase móvil reportada en la Tesis de Maestría de J.Morales. (1997), “Evaluación biofarmacéutica de la Quinfamida”, fue Agua: Metanol: Acetonitrilo (40:50:10) v/v. Con estas proporciones la señal cromatográfica del analito presentó un tiempo de retención aproximado de 7.2 min.

5.1.2 Selección de la longitud de onda

Al hacer el barrido, se encontró que la longitud de onda de máxima absorción fue 269 nm, por lo que se seleccionó esta longitud de onda para el estudio.

5.1.3 Selección de la columna cromatográfica

En la tabla 5 se muestran los resultados de tiempos de retención de la Quinfamida al emplear las 2 columnas cromatografías. Se eligió la columna ZORBAX SB-CN 3.5 μm 4.6x150 mm debido a que el tiempo de corrida fue de 10 minutos empleando un flujo de 0.6 mL/min. En esta columna, el tiempo de retención del analito fue menor en contraste con la columna XSELECT TM HSS CYANO 5 μm 4.6x250mm.

Tabla 5. Tiempo de retención del analito en diferentes columnas y flujo.

Flujo mL / min	XSELECT TM HSS CYANO 5um 4.6x250mm	ZORBAX SB-CN 3.5um 4.6x150 mm
0.6	tr Quinfamida 11.5 min	tr Quinfamida 7.2 min
0.8	tr Quinfamida 10.6 min	
0.9	tr Quinfamida 9 min	
1.2	tr Quinfamida 6.7 min	

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron las siguientes condiciones cromatográficas para llevar a cabo la validación del método.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas

Detector	UV
Longitud de onda	269 nm
Columna	ZORBAX SB-CN 3.5um 4.6x150 mm
Fase móvil	Agua:Metanol:Acetonitrilo(40-50-10) % v/v/v
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de columna	T ambiente (25°C)
Tiempo de retención aproximado	Quinfamida 7.2 (+/- 5%)

Como estándar interno se probó al Diazepam 5ug/mL, sin embargo no se logró buena precisión ni repetibilidad por lo que se eliminó del ensayo.

5.1.4 Método de extracción

De acuerdo a la bibliografía consultada, se reporta en el método de extracción lavar con 12mL de agua para eliminar restos de plasma y eluir el analito de interés con 1mL de Acetonitrilo. Adicionalmente se probó eluir con 1mL de fase móvil y 1mL de Metanol con los cuales no se obtuvo un % de recobro mayor al obtenido con el acetonitrilo.

5.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

5.2.1 Linealidad del sistema

En la tabla 7 se muestran los resultados de respuesta de la Quinfamida en metanol en donde se puede observar que el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99 cumpliendo así la linealidad.

Tabla 7. Resultados de la linealidad del sistema de Quinfamida en Metanol.

Conc. Nominal	Altura (Abs)	Altura (Abs)	Promedio	C.V (%)
(ug/mL)	Curva 1	Curva 2		
0.1	305	342	324	8.1
0.2	675	703	689	2.9
0.4	1440	1407	1424	1.6
0.6	2360	2162	2261	6.2
1.0	3812	3755	3784	1.1
2.0	7481	7640	7561	1.5
r	0.9996	0.9998		

En la figura 4 se muestra el gráfico de la respuesta cromatográfica vs la concentración nominal de Quinfamida.

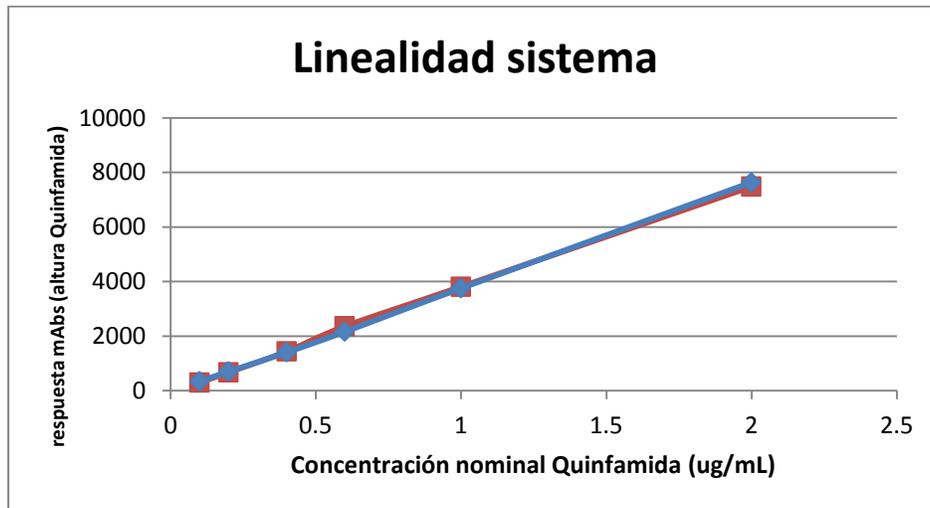


Fig 4. Linealidad del sistema

5.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.3.1 Curva de calibración en plasma humano

En la Tabla 8 se muestran los resultados de respuesta (altura) de la Quinfamida en plasma, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 8. Curva de calibración del método analítico para la cuantificación de Quinfamida en plasma humano. (Alturas)

Concentración nominal ug/mL	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0	2.0
Curva 1	459	759	1563	2454	3987	7180
Curva 2	402	792	1588	2572	3905	7863
Curva 3	557	932	1811	2838	4637	9199
Curva 4	437	869	2012	2809	4934	9630
Curva 5	404	717	1652	2395	4621	8814
Promedio	452	814	1725	2614	4417	8537
DE	63.45	86.41	187.15	202.19	448.43	1000.67
%CV	14.04	10.62	10.85	7.74	10.15	11.72
Desv. Abs. (%)	10.51	10.17	8.84	6.38	9.31	9.36

En figura 5 se grafican los datos reportados en la tabla 9 de pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación para las cinco curvas de calibración. Con lo anterior se definió un modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. Siendo así:

$$Y=mx+b$$

Siendo:

Y: Respuesta analítica (altura de Quinfamida)

X: Concentración nominal de Quinfamida

m: Pendiente de la recta

b: ordenada al origen

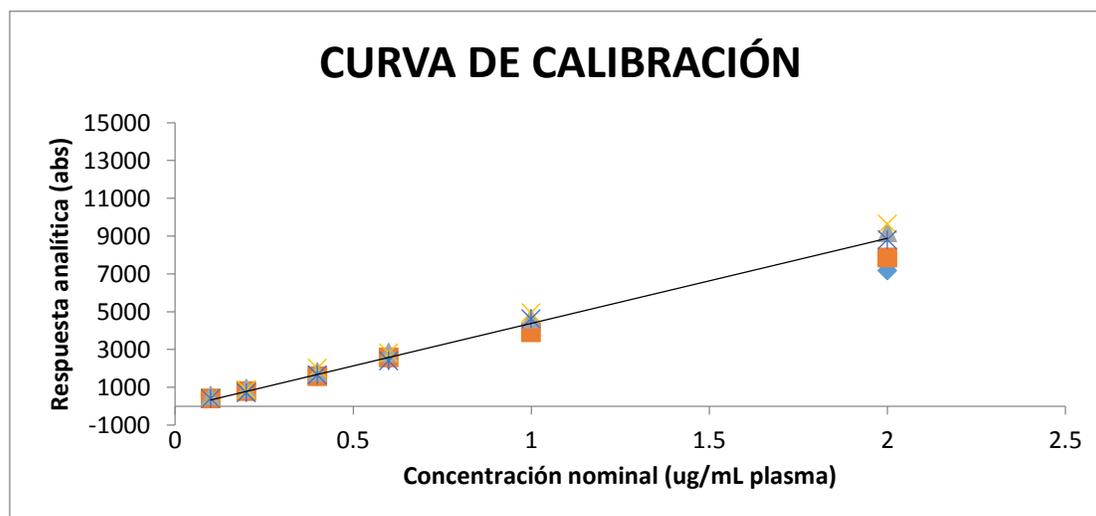


Fig 5. Curva de calibración del método analítico para cuantificar Quinfamida en plasma.

En la Tabla 9 se muestran los parámetros calculados de la curva de calibración. Se puede observar que el método es lineal en el rango de 0.1 a 2.0 ug/mL.

Tabla 9. Parámetros de linealidad del método para cuantificar Quinfamida en plasma.

	Pendiente (m)	Ordenada (b)	R
Curva 1	3571.6812	173.96182	0.9981
Curva 2	3913.1547	49.239116	0.9995
Curva 3	4577.2003	48.673141	0.9999
Curva 4	4851.9022	-28.6966	0.9997
Curva 5	4500.3818	-124.7736	0.9989
Promedio	4282.8640	23.6808	0.9992
D.E	511.31029		
C.V (%)	12.717014		

En la tabla 10 se muestran los valores de concentración nominal vs concentración recuperada, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. En ella se puede observar que en todas las concentraciones, la % desviación fue menor al 15%, lo que demuestra que el método es exacto.

Tabla 10. Concentración experimental de Quinfamida en plasma extrapolada en la curva de calibración preparada en la misma matriz biológica.

Conc. nominal ug/mL	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0	2.0
Curva 1	0.1016	0.1717	0.3594	0.5675	0.9254	1.6709
Curva 2	0.0883	0.1794	0.3653	0.5950	0.9062	1.8304
Curva 3	0.1245	0.2121	0.4173	0.6571	1.0772	2.1423
Curva 4	0.0965	0.1974	0.4642	0.6503	1.1465	2.2430
Curva 5	0.0888	0.1619	0.3802	0.5537	1.0734	2.0524
Promedio	0.1000	0.1845	0.3973	0.6047	1.0257	1.9878
DE	0.0148	0.0202	0.0437	0.0472	0.1047	0.2336
%CV	14.8203	10.9363	10.9992	7.8069	10.2075	11.7539
Desv. Abs. (%)	10.51	10.17	8.84	6.38	9.31	9.36

Tabla 11. % de la cantidad recuperada respecto a la concentración nominal, la cual debe estar dentro del 15% para cada nivel de concentración, excepto para el LIC que puede ser menor o igual que 20%.

Conc. nominal ug/mL	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0	2.0
Curva 1	1.6%	14.2 %	10.2 %	5.4 %	7.5 %	16.5 %
Curva 2	11.7 %	10.3 %	8.7 %	0.8 %	9.4 %	8.5 %
Curva 3	24.5 5	6.1 %	4.3 %	9.5 %	7.7 %	7.1 %
Curva 4	3.5 %	1.3 %	16.1 %	8.4 %	14.7 %	12.2 %
Curva 5	11.2 %	19.1 %	5.0 %	7.7 %	7.3 %	2.6 %
Promedio	10.5	10.2	8.8	6.4	9.3	9.4
DE	9.0	6.9	4.7	3.4	3.1	5.2

Al menos el 75 % de las concentraciones de la curva de calibración cumple el criterio. Y del total de las curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada nivel de concentración cumple con el criterio.

5.3.2 Precisión

5.3.2.1 Repetibilidad del método analítico

En la tabla 12 se muestran los resultados correspondientes a la repetibilidad en un mismo día. El método es repetible, ya que el coeficiente de variación fue menor al 15%

Tabla 12. Concentraciones de Quinfamida experimental resultado de extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.

Muestra	Control bajo (0.5 ug/mL)	Control medio (1.3 ug/mL)	Control alto (1.6 ug/mL)
1	0.542	1.267	1.629
2	0.548	1.348	1.424
3	0.568	1.296	1.833
4	0.484	1.352	1.380
5	0.488	1.256	1.832
Promedio	0.526	1.304	1.6196
D.E	0.038	0.045	0.216
C.V (%)	7.184	3.429	13.329
% Desv. Abs	5.191	0.279	11.125

5.3.2.2 Reproducibilidad del método analítico

En la tabla 13 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método realizada en tres corridas diferentes. En ella se observa que el método es reproducible, ya que el coeficiente de variación fue menor al 15%.

Tabla 13. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.

Muestra	Control bajo (0.5 ug/mL)	Control medio (1.3 ug/mL)	Control alto (1.6 ug/mL)
Día 1	0.542	1.267	1.832
	0.548	1.348	1.937
	0.568	1.296	1.817
	0.484	1.352	1.849
	0.488	1.256	1.930
Día 2	0.460	1.191	1.629
	0.456	1.207	1.424
	0.490	1.192	1.833
Día 3	0.455	1.172	1.165
	0.486	1.203	1.380
Promedio	0.498	1.248	1.679
D.E	0.041	0.066	0.267
C.V (%)	8.174	5.300	15.000
% desviación	6.785	5.502	14.776

5.3.3 Límite inferior de cuantificación

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable (LIC) .En la tabla 14 se muestran los resultados calculados mediante el método de exactitud donde el %DEA debe ser menor al 20%.

Se eligió como límite de cuantificación la concentración de 0.1ug/mL debido ya que el %DEA fue 15.7% y su coeficiente de variación fue de 8.4%. El resultado cumple con lo establecido con la NOM.177-SSA1-2013, ya que el valor fue menor a +/-20% del valor nominal y el coeficiente de variación no fue mayor a 20%.

Tabla 14. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.

Muestra	Límite de Cuantificación (0.1ug/mL)
1	0.132
2	0.109
3	0.109
4	0.117
5	0.111
Promedio	0.116
D.E	0.009
C.V (%)	8.453
Desv. Abs. (%)	15.784

5.3.4 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad a 24 horas en congelación a -20°C después de su preparación.

En la tabla 15 se muestran las concentraciones de las muestras control bajo y alto de Quinfamida (0.5 y 1.6 mg/mL) recuperada a las 24 h después de congelación.

Los resultados de coeficiente de variación muestran que la Quinfamida no es estable en plasma humano a 24 h después de su preparación por lo que los análisis que emplean plasma humano deben prepararse y procesarse el mismo día para evitar la hidrólisis de la Quinfamida.

Tabla 15. Resultados de concentraciones recuperada a las 24h después de congelación a -20°C

Muestra	Control bajo (0.5 ug/mL)	Control alto (1.6 ug/mL)
1	0.1092	0.2361
2	0.1125	0.3265
3	0.1189	0.2650
Promedio	0.1135	0.2758
D.E	0.0049	0.0461
C.V (%)	4.3407	16.7310

5.3.5 Curva de calibración en heces de pollo

En la Tabla 16 se muestran los resultados de alturas de la Quinfamida en heces de pollo. En la figura 6 se grafican los datos de pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación para las cinco curvas de calibración graficando la concentración nominal respecto a la respuesta de Quinfamida.

Tabla 16. Valores de respuesta de Quinfamida en el rango de concentración de 0.1 a 0.2 mg/g heces.

Concentración nominal (mg/g heces)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.10	0.2
Curva 1	281	442	1217	1918	3305	5655
Curva 2	147	491	932	1604	2775	5236
Curva 3	202	347	1145	1787	2794	6444
Curva 4	205	419	971	1642	3105	6654
Curva 5	189	331	1105	1928	3164	6073
Promedio	205	406	1074	1776	3029	6012
DE	48.29	66.71	119.58	150.80	234.51	577.14
%CV	23.59	16.43	11.13	8.49	7.74	9.60

En figura 6 se grafican los datos reportados en la tabla 16 de pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación para las cinco curvas de calibración. Con lo anterior se definió un modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. Siendo así:

$$Y=mx+b$$

Siendo:

Y: Respuesta analítica (altura de Quinfamida)

X: Concentración nominal de Quinfamida

m: Pendiente de la recta

b: ordenada al origen

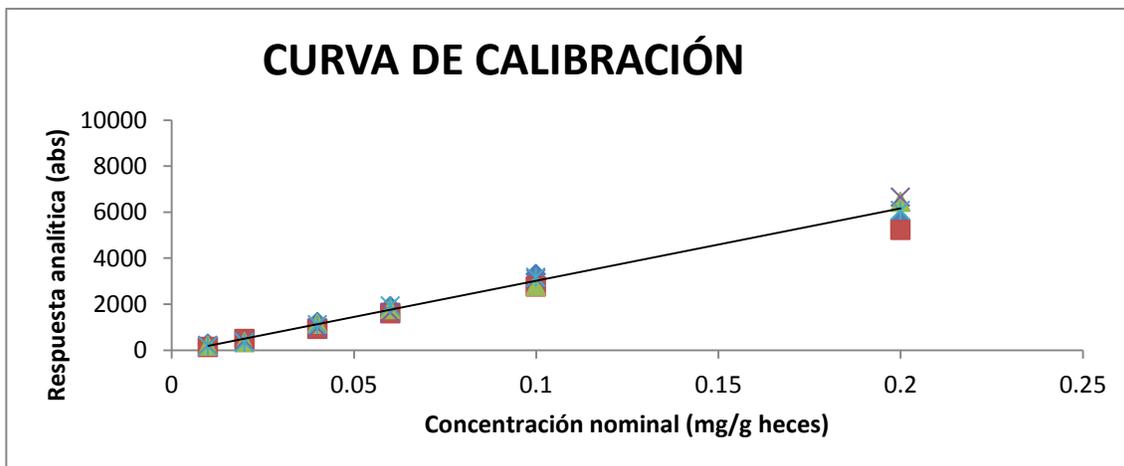


Fig. 6. Curva de calibración del método analítico para cuantificar Quinfamida en heces de pollo.

El modelo matemático obtenido fue el mismo que el obtenido para heces.

En la tabla 17 se muestran los parámetros de linealidad con los resultados obtenidos en la tabla 15.

Tabla 17. Curva de calibración para cuantificar Quinfamida en heces de pollo.

	Pendiente (m)	Ordenada (b)	r
Curva 1	28865.85	67.51	0.995
Curva 2	26842.00	-59.51	0.999
Curva 3	32899.60	-237.97	0.998
Curva 4	34469.26	-304.30	0.999
Curva 5	31457.74	-122.80	0.998
Promedio	30906.89	-131.41	0.998
D.E	150.6212	146.68	0.002
C.V (%)	4.57		0.174

El método demostró ser lineal en las concentraciones correspondientes a la curva de calibración (0.01 a 0.2 mg/g heces). En cada punto de la curva se cumplieron los criterios establecidos debido a que el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99 y el coeficiente de variación menor 15% para cada nivel de concentración.

En la tabla 18 se presentan los resultados de la exactitud del método analítico. En ella se puede observar que en todas las concentraciones, la %DEA fue menor al 15%, por lo que cumple con la especificación establecida en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 18. Valores de concentración adicionada en comparación con la concentración recuperada en heces de pollo.

Concentración nominal (mg/ g heces)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.1	0.2
Curva 1	0.0133	0.0186	0.0436	0.0663	0.1112	0.1872
Curva 2	0.0090	0.0201	0.0344	0.0561	0.0940	0.1737
Curva 3	0.0108	0.0155	0.0413	0.0621	0.0947	0.2127
Curva 4	0.0109	0.0178	0.0357	0.0574	0.1047	0.2195
Curva 5	0.0104	0.0150	0.0400	0.0666	0.1066	0.2007
Promedio	0.0109	0.0174	0.0390	0.0617	0.1022	0.1988
DE	0.0016	0.0022	0.0039	0.0049	0.0076	0.0187
%CV	14.37	12.41	9.92	7.91	7.42	9.39
Desv. Abs. (%)	12.7178	13.3327	7.4261	7.1624	6.7676	7.2163

Tabla 19. % de la cantidad recuperada respecto a la concentración nominal, la cual debe estar dentro del 15% para cada nivel de concentración, excepto para el LIC que puede ser menor o igual que 20%.

Concentración nominal (mg/ g heces)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.1	0.2
Curva 1	33.0	7.0	9.0	10.5	11.2	6.4
Curva 2	10.0	0.5	14.0	6.5	6.0	13.2
Curva 3	8.0	22.5	3.3	3.5	5.3	6.3
Curva 4	9.0	11.0	10.8	4.3	4.7	9.7
Curva 5	4.0	25.0	0.0	11.0	6.6	0.3
Promedio	12.8	13.2	7.4	7.2	6.8	7.2
DE	11.5	10.4	5.7	3.5	2.6	4.7

Al menos el 75 % de las concentraciones de la curva de calibración cumple el criterio. Y del total de las curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada nivel de concentración cumple con el criterio.

5.3.6 Precisión y exactitud

5.3.6.1 Repetibilidad del método analítico

En la tabla 20 se muestran los resultados correspondientes a la repetibilidad en un mismo día. El método es repetible, ya que el coeficiente de variación fue menor al 15%.

Tabla 20. Concentraciones de Quinfamida experimental resultado de extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.

Muestra	Control bajo (0.05 mg / g heces)	Control medio (0.13 mg/ g heces)	Control alto (0.16 mg/g heces)
1	0.0441	0.1205	0.1528
2	0.0440	0.1139	0.1528
3	0.0479	0.1190	0.1574
4	0.0517	0.1217	0.1438
5	0.0483	0.1277	0.1438
Promedio	0.0045	0.0045	0.0044
D.E	0.0002	0.0001	0.0001
C.V (%)	3.87	3.21	2.81
Desv. Abs.	6.93	7.28	6.20

5.3.6.2 Reproducibilidad del método analítico

En la tabla 21 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método realizada a tres diferentes días. El método es reproducible, ya que el coeficiente de variación fue menor al 15%.

Tabla 21. Concentraciones de Quinfamida experimental calculadas al extrapolar su respuesta analítica en el modelo matemático de la curva de calibración.

Muestra	Control bajo (0.05 mg/ g heces)	Control medio (0.13 mg/ g heces)	Control alto (0.16 mg/g heces)
Día 1	0.0441	0.1205	0.1528
	0.0440	0.1139	0.1528
	0.0479	0.1190	0.1574
	0.0517	0.1217	0.1438
	0.0483	0.1277	0.1438
Día 2	0.0430	0.1175	0.1505
	0.0482	0.1226	0.1607
	0.0479	0.1285	0.1560
Día 3	0.0522	0.1250	0.1521
	0.0513	0.1184	0.1558
Promedio	0.0479	0.1215	0.1526
D.E	0.0033	0.0046	0.0055
C.V (%)	6.85	3.81	3.58
Desv. Abs.	6.33	6.57	4.74

5.3.7 Estabilidad

En la tabla 22 se muestran las concentraciones de los controles bajo y medio de Quinfamida (0.05 y 0.13 mg/ g heces) después de 24 h de congelación -20°C. Con los resultados obtenidos de coeficiente de variación y desviación absoluta se observa que la Quinfamida es estable en heces de pollo hasta por 24h después de su preparación.

Tabla 22. Concentraciones de Quinfamida experimental a las 24 h.

Muestra	Control bajo (0.05 mg/g heces)	%Recobro	Control medio (0.13 mg/g heces)	%Recobro
1	0.0493	73.24	0.1379	79.58
2	0.0434	63.71	0.1421	82.03
3	0.0463	68.48	0.1379	79.58
Promedio	0.0463	68.48	0.1393	80.40
D.E	0.0029	4.77	0.0024	1.41
C.V (%)	6.32	6.96	1.70	1.76
Desv. Abs. (%)	7.34		0.1379	

En la tabla 23 se muestran las concentraciones de los controles bajo y alto de Quinfamida (0.05 y 0.16 mg/ g heces) recuperada después de 1 mes de congelación. En ella se observa que la Quinfamida es estable en heces de pollo durante este periodo.

Tabla 23. Concentraciones de Quinfamida experimental a 1 mes después de congelación.

Muestra	Control bajo (0.05 mg/g heces)	%Recobro	Control alto (0.16 mg/g heces)	%Recobro
1	0.0544	82.77	0.1713	87.12
2	0.0537	81.46	0.1742	88.69
3	0.0541	82.12	0.1795	91.54
Promedio	0.0541	82.1159	0.1750	89.1134
D.E	0.0004	0.6582	0.0042	2.2399
C.V (%)	0.67	0.80	2.39	2.51
Desv. Abs. (%)	8.14		9.34	

5.3.8 Recobro

En la tabla 24 se muestran los resultados de % recobro del método de extracción vs el sistema en Metanol. Se puede observar que, el porcentaje de recobro fue constante para los niveles de concentración de Quinfamida establecidos, con un valor promedio de 78%.

Tabla 24. %Recobro de Quinfamida en heces

Concentración nominal mg/g heces	Abs Quinfamida en metanol (100%)	%Recobro de Quinfamida					% de recobro promedio	DE	C.V%
		Heces de pollo							
		C1	C2	C3	C4	C5			
0.04	1424	75.42	85.46	65.45	80.41	77.60	76.87	7.41	9.64
0.06	2261	78.55	84.83	70.94	79.04	85.27	79.73	5.83	7.31
0.1	3784	80.05	87.34	73.34	73.84	83.62	79.64	6.10	7.66
0.2	7561	69.25	74.79	69.25	85.23	80.32	75.77	7.00	9.24

5.4 Aplicación del método

5.4.1 Muestras en plasma de pollo

Con los resultados obtenidos en la tabla 25, se estableció que en esta especie animal, la Quinfamida no pasa a la circulación sistémica.

Tabla 25. Respuesta de Quinfamida en muestras de plasma de pollo

Muestra	tr (tiempo de retención)	Altura
30 mg/kg 1h	sin señal de Quinfamida	sin señal de Quinfamida
30 mg/kg 4h	sin señal de Quinfamida	sin señal de Quinfamida
60 mg/kg 1h	sin señal de Quinfamida	sin señal de Quinfamida
30 mg/kg 4h	sin señal de Quinfamida	sin señal de Quinfamida

5.4.2 Muestras en heces de pollo

En la tabla 26 se muestra cálculo para determinar la cantidad de Quinfamida en heces de pollo, así como los resultados obtenidos en ambas muestras. Se comprueba que igual que en humanos, el fármaco se excreta en mayor proporción en heces.

Tabla 26. Cálculos para determinar la cantidad de Quinfamida en heces de pollo.

Muestra A	Muestra B
<p>Resultado</p> $\frac{0.0956 \text{ mg Quinfamida}}{\text{g heces liofilizadas}}$ $\frac{38.51 \text{ mg Quinfamida}}{145 \text{ g heces sin liofilizar}}$	<p>Resultado</p> $\frac{0.06255 \text{ mg Quinfamida}}{\text{g heces liofilizadas}}$ $\frac{16.52 \text{ mg Quinfamida}}{95 \text{ g heces sin liofilizar}}$

Para realizar los cálculos, se utiliza la ecuación obtenida en la linealidad del método y se extrapola la respuesta de cada muestra en ella.

Conclusiones

- El método analítico en plasma fue validado de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013, demostrando ser lineal, exacto, preciso y selectivo en el rango de las concentraciones de 0.1 a 2.0 ug/mL.
- Se demostró que la Quinfamida no es estable en muestras de plasma, por lo que se recomienda realizar la extracción, procesamiento y análisis de las muestras inmediatamente.
- El método analítico en heces fue validado de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013 en donde éste demostró ser lineal, exacto, preciso y selectivo en el rango de las concentraciones de 0.01mg/g -0.2 mg/g heces, con un porcentaje de recobro de 78%
- Se demostró que la Quinfamida es estable en heces de pollo en condiciones de corto plazo (24 h), largo plazo (1 mes).
- Con lo anterior los métodos analíticos en plasma y heces pueden emplearse para la cuantificación de Quinfamida en matrices biológicas (plasma y heces) de aves de corral con la certeza de que se obtendrán resultados confiables.

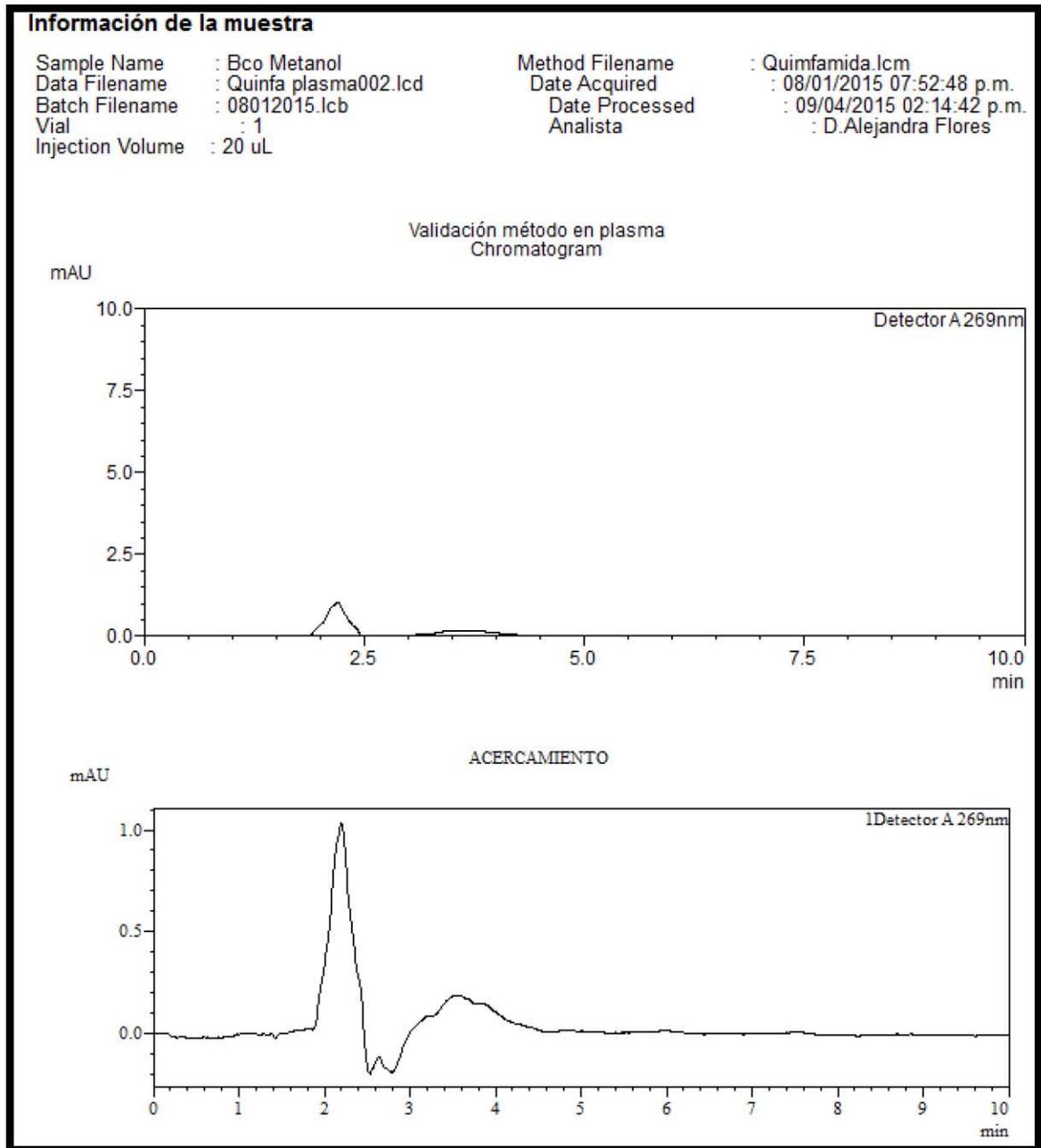
Bibliografía

1. B.Dorado, E. Chávez, C.Maldonado, J.Muñoz, M.Moreno. (2011) Evaluación de la efectividad de Quinfamida en la infección por *Trichinella spiralis* en fase intestinal en modelo murino. [Versión electrónica] BIOFARBO V.19n.1 La Paz
2. Coccidiosis control y tratamiento en aves comerciales. (2013) Pisa Agropecuaria.Consultado en http://www.avicultura.com.mx/avicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=990
3. E.Del Cacho y M.Pages. (2014) Coccidiosis, La enfermedad, consecuencias y tratamiento. Congreso científico de avicultura
4. E.Guadarrama. (n.d) Uso de la Quinfamida como tratamiento alternativo de la coccidiosis y giardiasis del hurón (ensayo clínico). Obtenida el 4 de abril de 2015 de http://veterinariosenweb.com/campus/cdvl/memorias/material/105_Quinfamida_Guadarrama.pdf
5. Extracción en Fase sólida (n.d). Consultado el 4 de abril de 2015. Cromlab.S.L. Página web: http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm
6. I.Aquino, F.Espinosa, V.Alcalá, G.Tapia, H.Sumano, L.Gutiérrez (2014).Eficacia comparativa de mejora de Quinfamida-chitosán o taltrazuril en un brote de coccidiosis en ovejas. [versión electrónica] Indian Journal of Veterinary Research v.22.n.1
7. J.Flórez. (n.d) Farmacología humana.cap73.Fármacos antiparasitarios I. Protozoos (1221-1237)
8. J.Hernández. (2005) Cromatografía líquida de alta eficacia. Ed.Cont.Lab Clin ; 8:49-62
9. J.M. Morales, C.H. Jung, A. Alarcón, A.Barreda. Journal of Chromatography B (2000). Solid-phase extraction and liquid chromatographic quantitation of quinfamide in biological samples. 746, 133-139
10. J.Morales. (1997), Tesis de Maestría Evaluación biofarmacéutica de la Quinfamida. UNAM

11. Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. (2013) Diario Oficial de la Federación. Página web: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013
12. Quinfamida. (n.d) Lookchem. Consultado .6 de abril de 2015 en <http://www.lookchem.com/Quinfamide/>
13. Quinfamida. n.d. Consultado el 4 de abril de 2015 Facultad de medicina. Página web: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Quinfamida.htm
14. Quinfamida.n.d. Santa Cruz Biotechnology. Consultado 6 de abril de 2015 en <http://www.scbt.com/es/datasheet-212612-quinfamide.html> Santa cruz biotechnology,
15. R. Romero, L. Robert, I.Martínez, O. Vázquez, D.Ruiz, J.Tay, J.Sánchez, L.Calderón. (2005).Evaluation of the efficacy and security of quinfamide administered in a single dose of 300 mg in adult patients with intestinal amebiasis. *Parasitol Latinoam* 60:57-60 FLAP
16. R.Romero, L.Rober, R. Muñoz, A.Alarcón, J.Tay, J.Sanchez.(1997) Trabajo de investigación: Tratamiento profiláctico con quinfamida para el control comunitario de las infecciones intestinales por Entamoeba histolytica. [versión electrónica] *Parasitol.día* v.21 n.3-4 Santiago.
17. UNODC.(2010).Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Obtenida el 4 de abril de 2015 en <http://www.unodc.org/>
18. V Gomis. (2008) Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. Página web: <http://hdl.handle.net/10045/8248>

Anexos

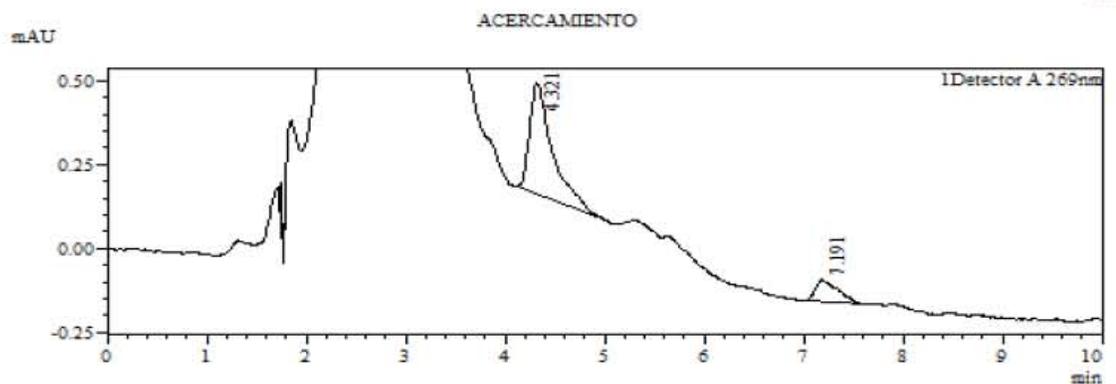
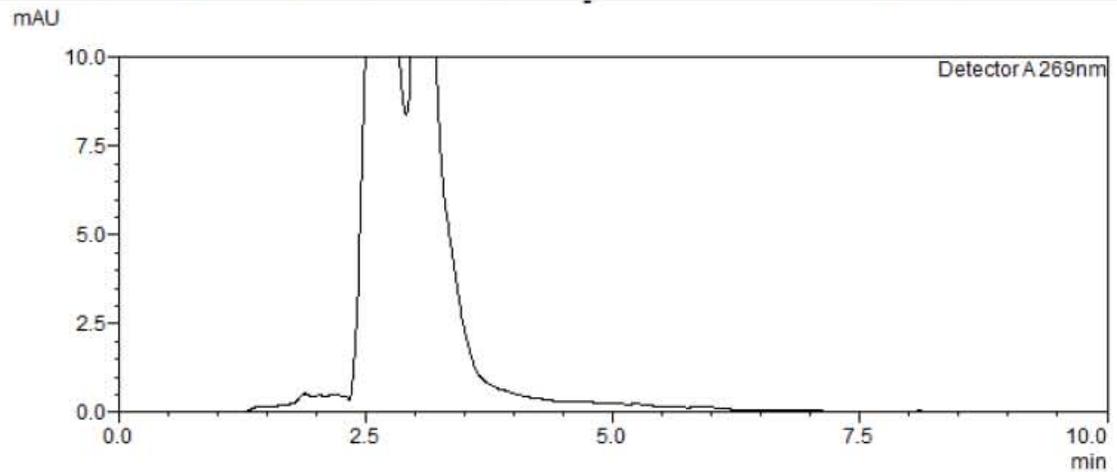
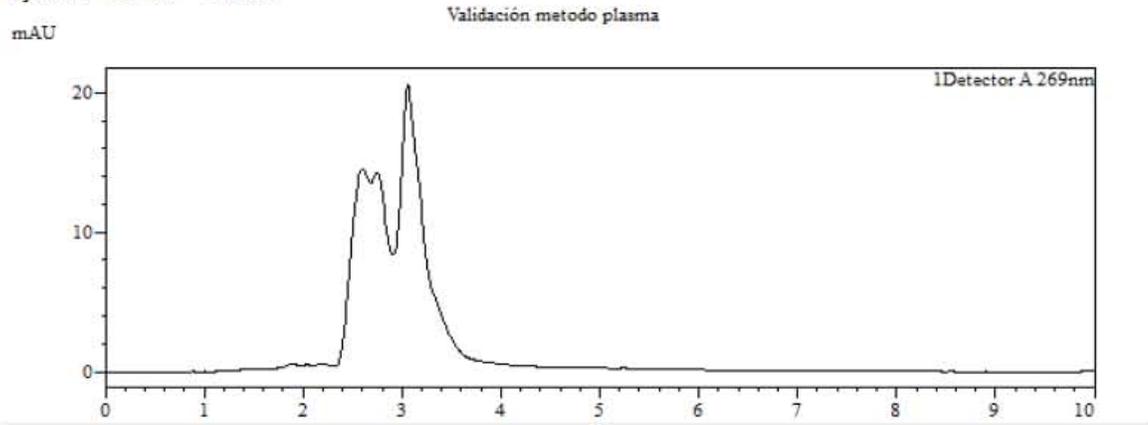
a Cromatograma típico de blanco en metanol



b. Cromatograma típico de blanco de plasma humano

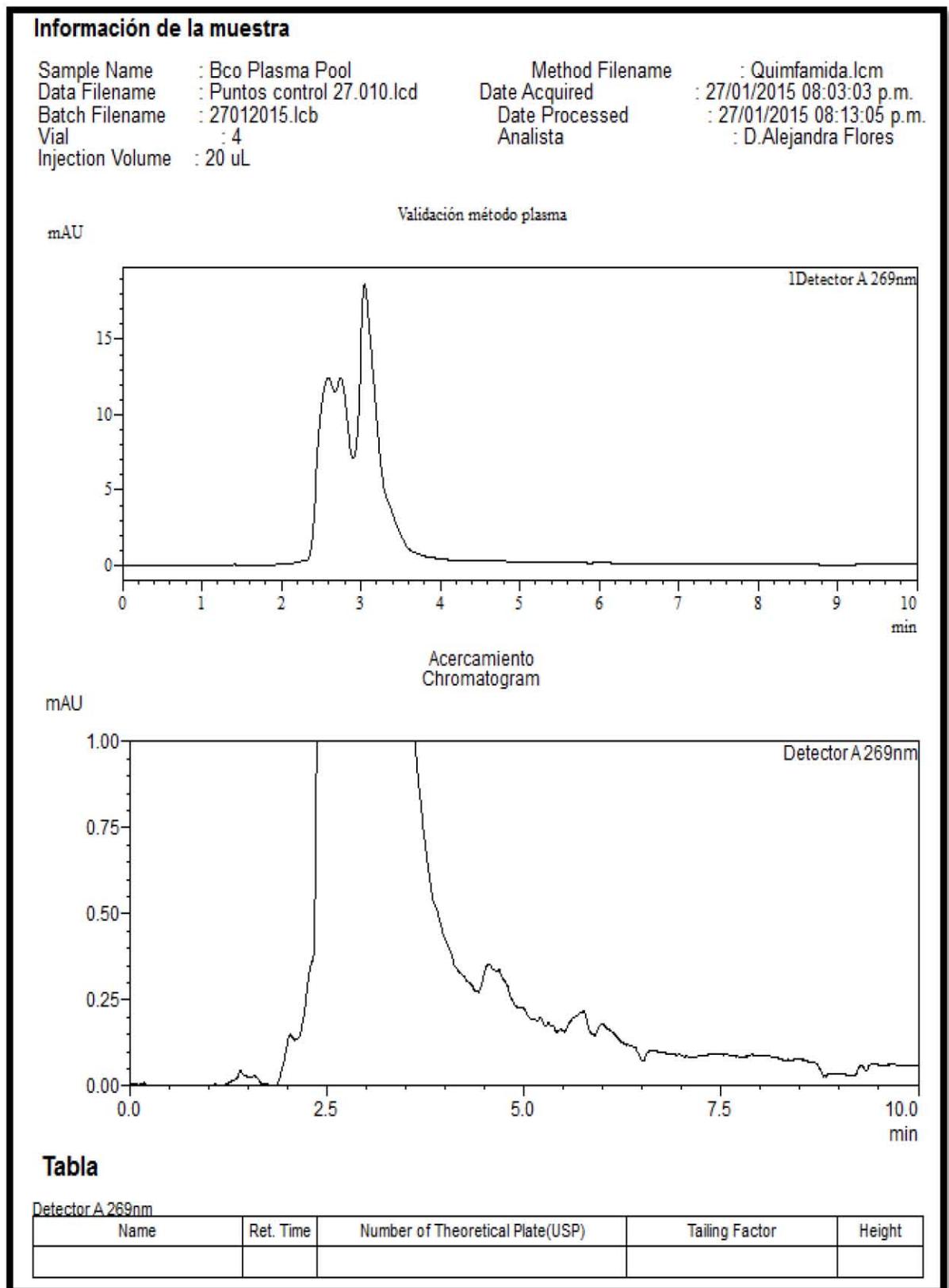
Información de la muestra

Sample Name	: Bco Plasma H	Method Filename	: Quimfamida.lcm
Data Filename	: Puntos control 27.008.lcd	Date Acquired	: 27/01/2015 07:37:57 p.m.
Batch Filename	: 27012015.lcb	Date Processed	: 27/01/2015 07:47:59 p.m.
Vial	: 3	Analista	: D.Alejandra Flores
Injection Volume	: 20 uL		

**Tabla**

Detector A 269nm					
Name	Ret. Time	Number of Theoretical Plate(USP)	Tailing Factor	Height	
	4.321	2274	2.1	329	
	7.191	3818	1.7	66	

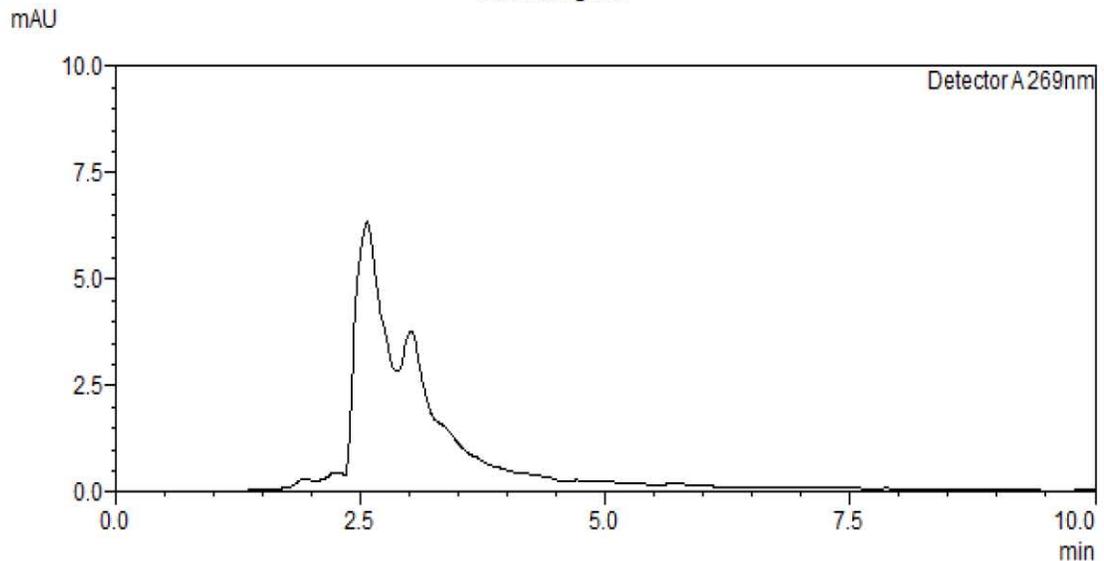
c Cromatograma típico de blanco de pool de plasma humano



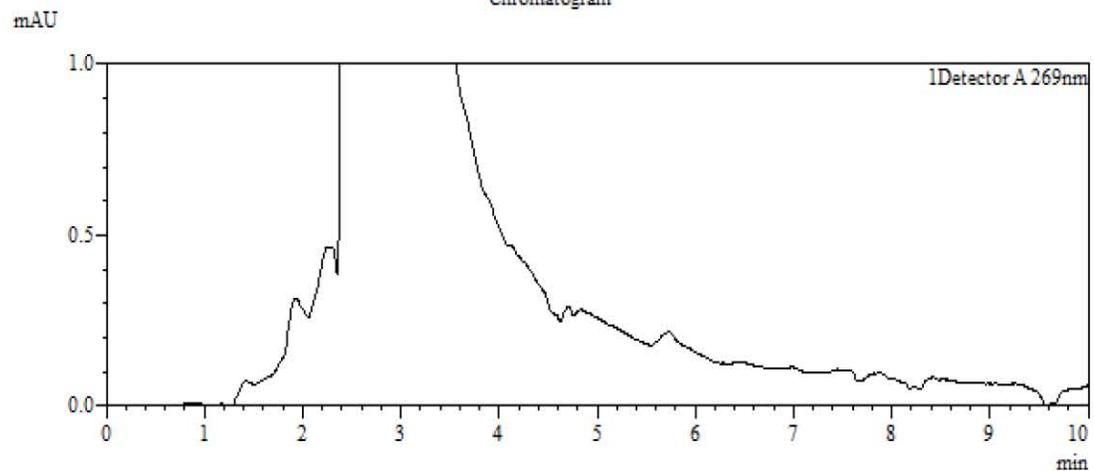
d. Cromatograma típico de blanco de plasma de pollo

Información de la muestra

Sample Name	: Bco Plasma Pollo	Method Filename	: Quimfamida.lcm
Data Filename	: Puntos control 27.011.lcd	Date Acquired	: 27/01/2015 08:15:34 p.m.
Batch Filename	: 27012015.lcb	Date Processed	: 27/01/2015 08:25:37 p.m.
Vial	: 5	Analista	: D.Alejandra Flores
Injection Volume	: 20 uL		

Validación método en plasma
Chromatogram

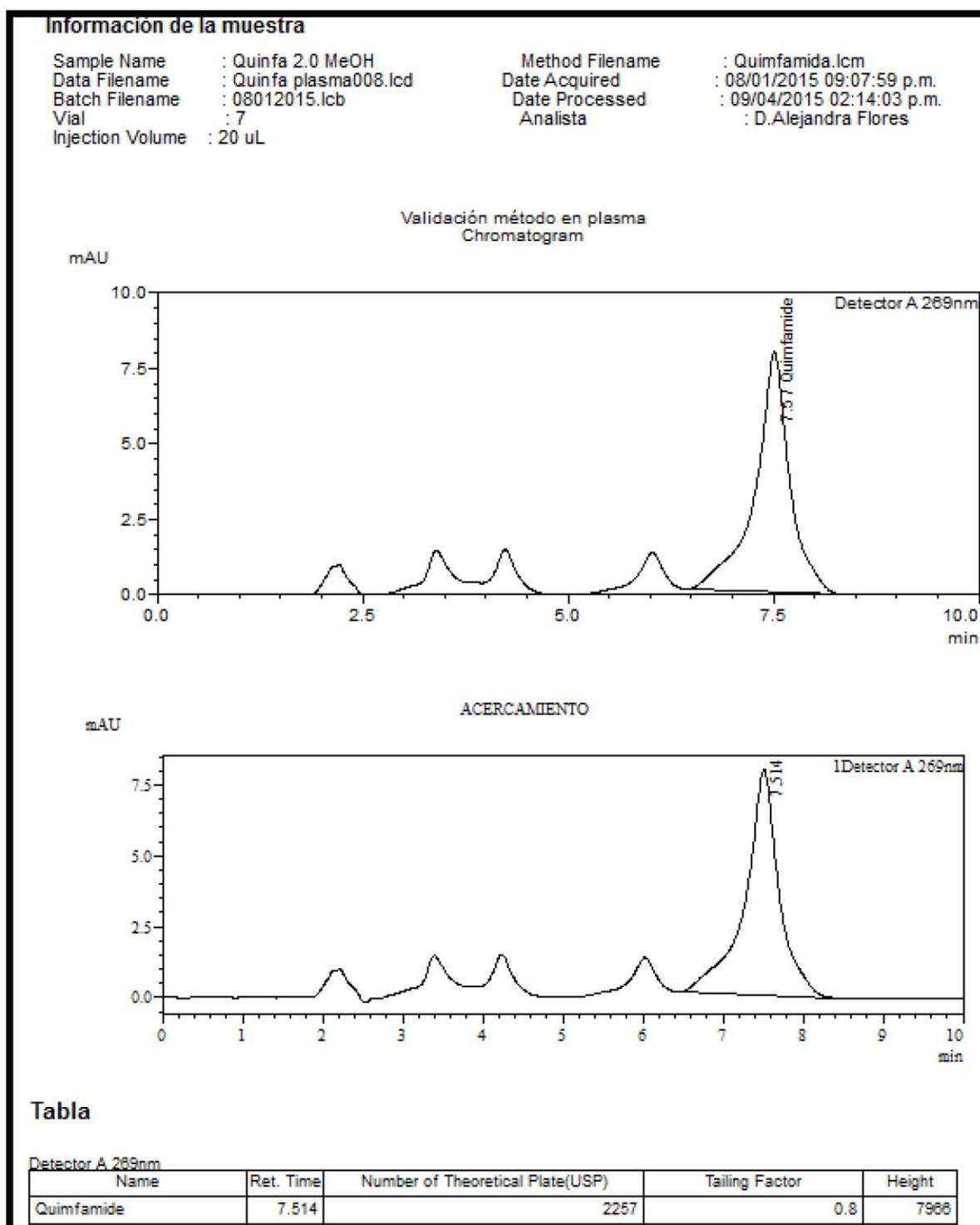
Chromatogram

**Tabla**

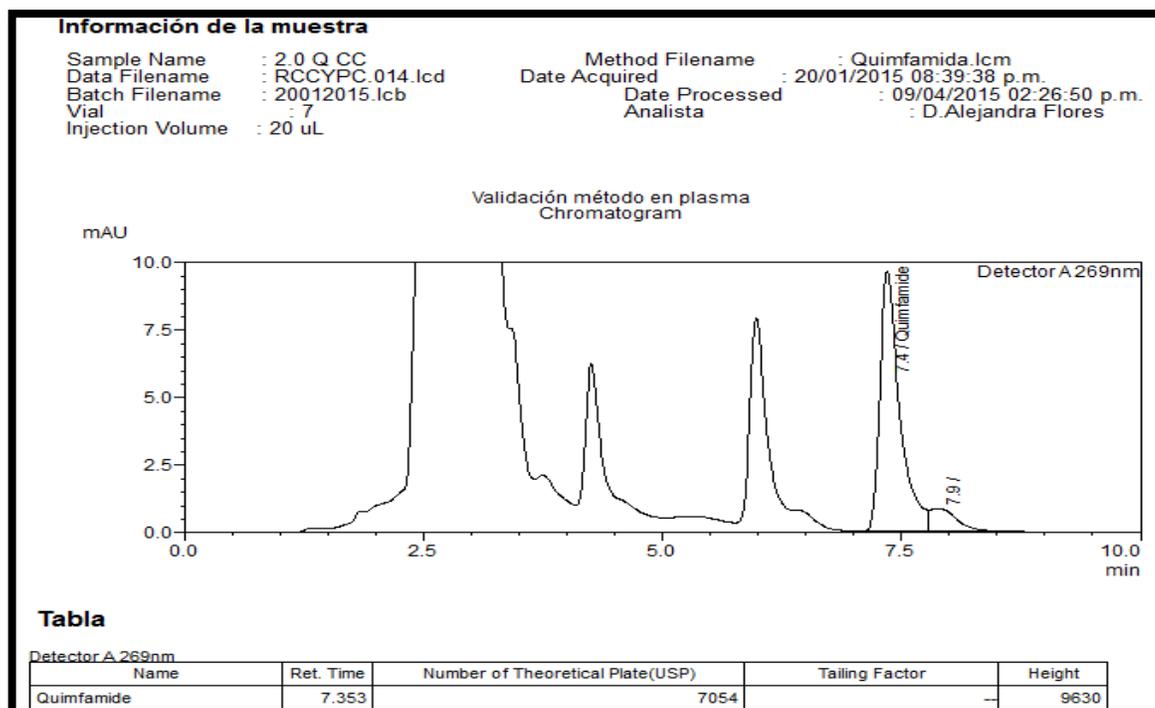
Detector A 269nm

Name	Ret. Time	Number of Theoretical Plate(USP)	Tailing Factor	Height

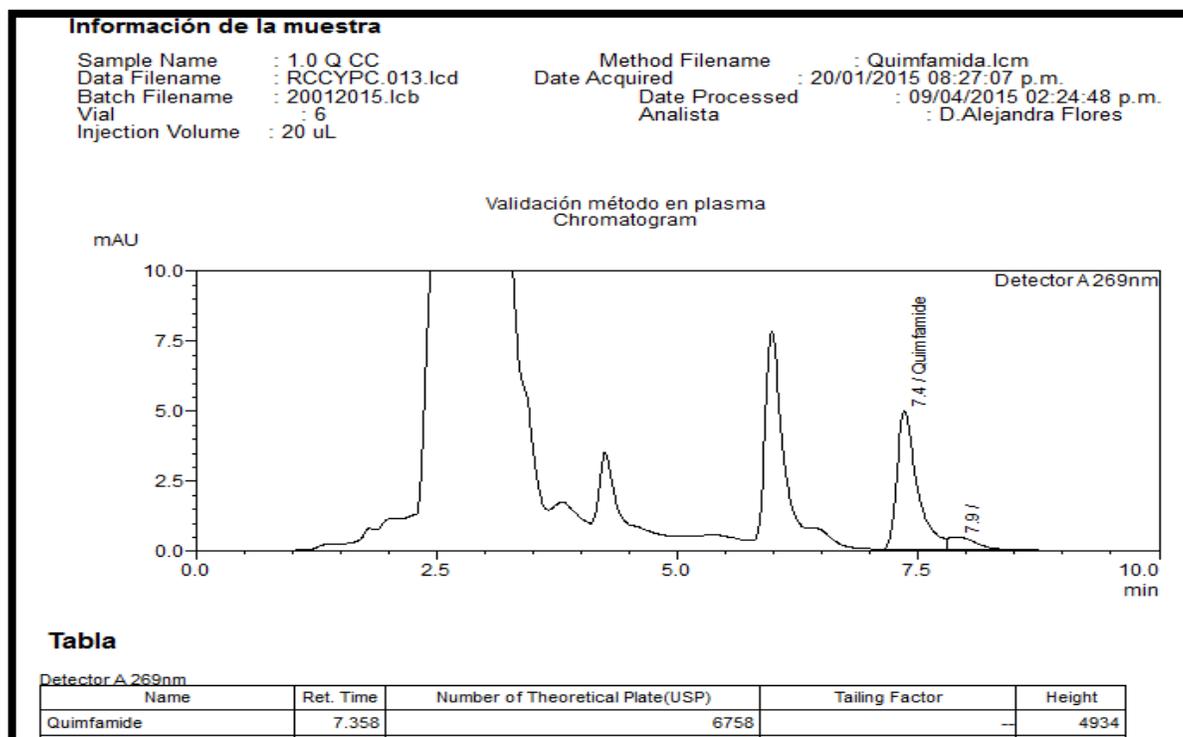
e. Cromatograma típico de Quinfamida 2.0ug/mL en metanol



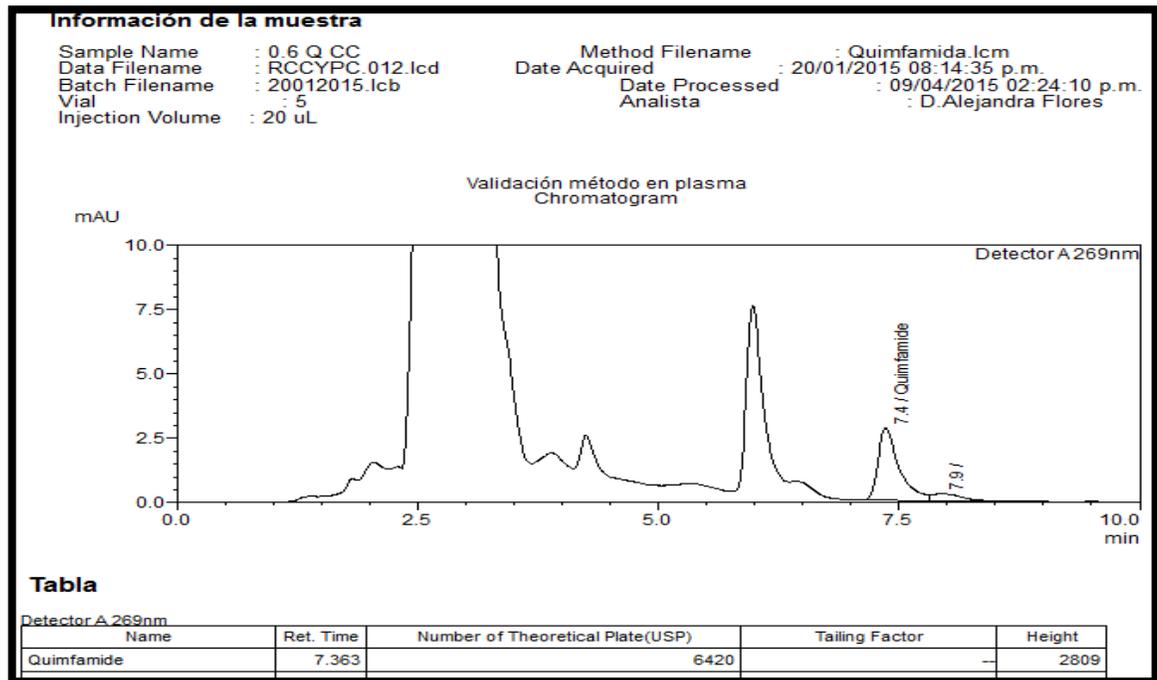
f. Cromatograma típico de Quinfamida 2.0ug/mL en plasma humano



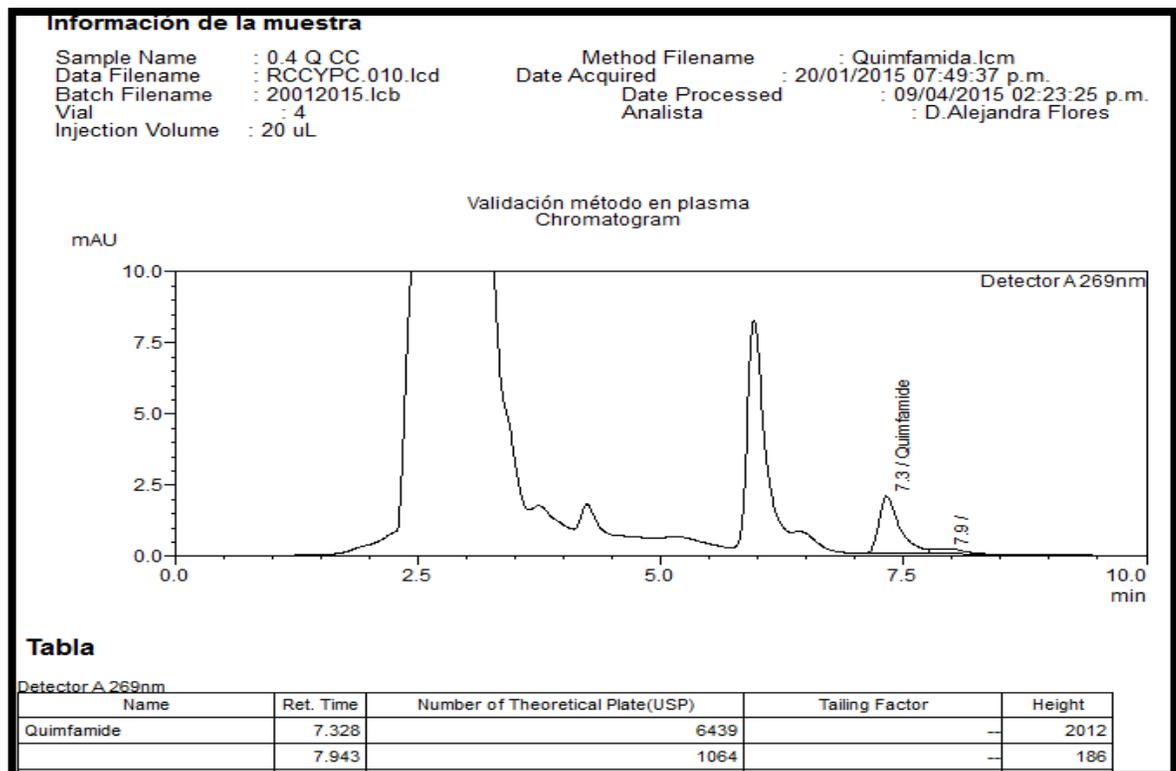
g. Cromatograma típico de Quinfamida 1.0ug/mL en plasma humano



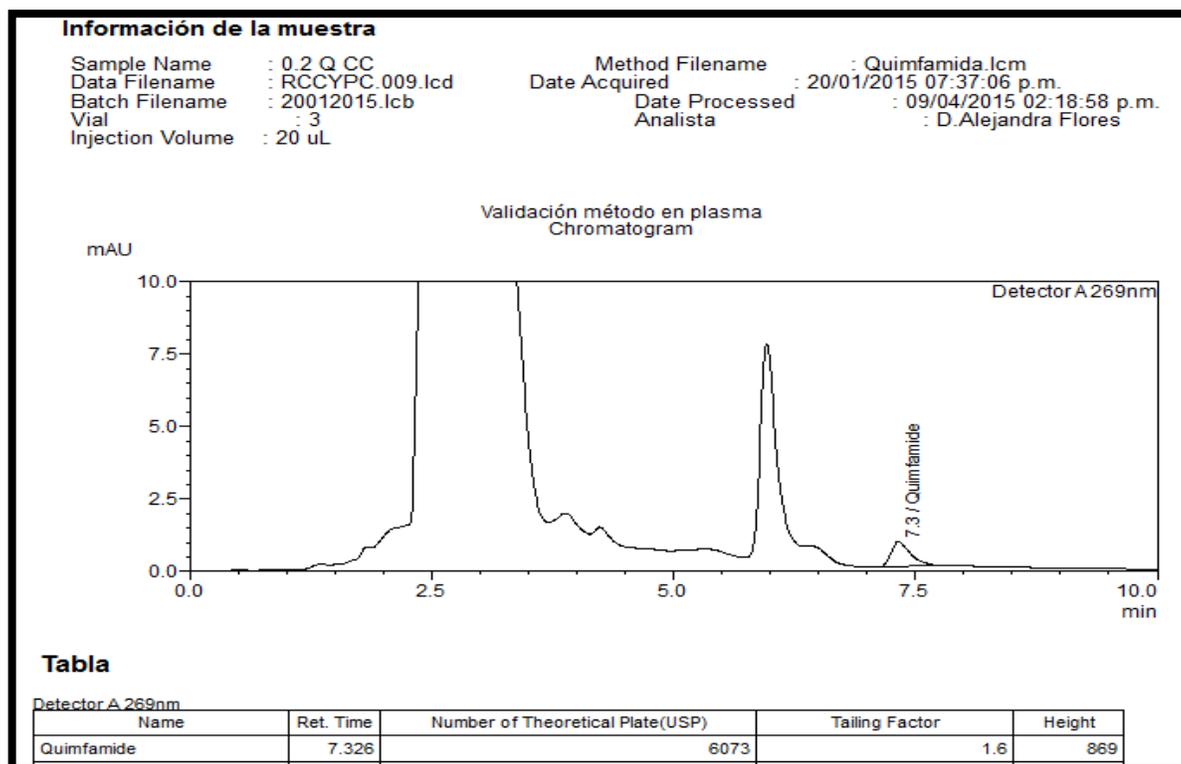
h. Cromatograma típico de Quinfamida 0.6ug/mL en plasma humano



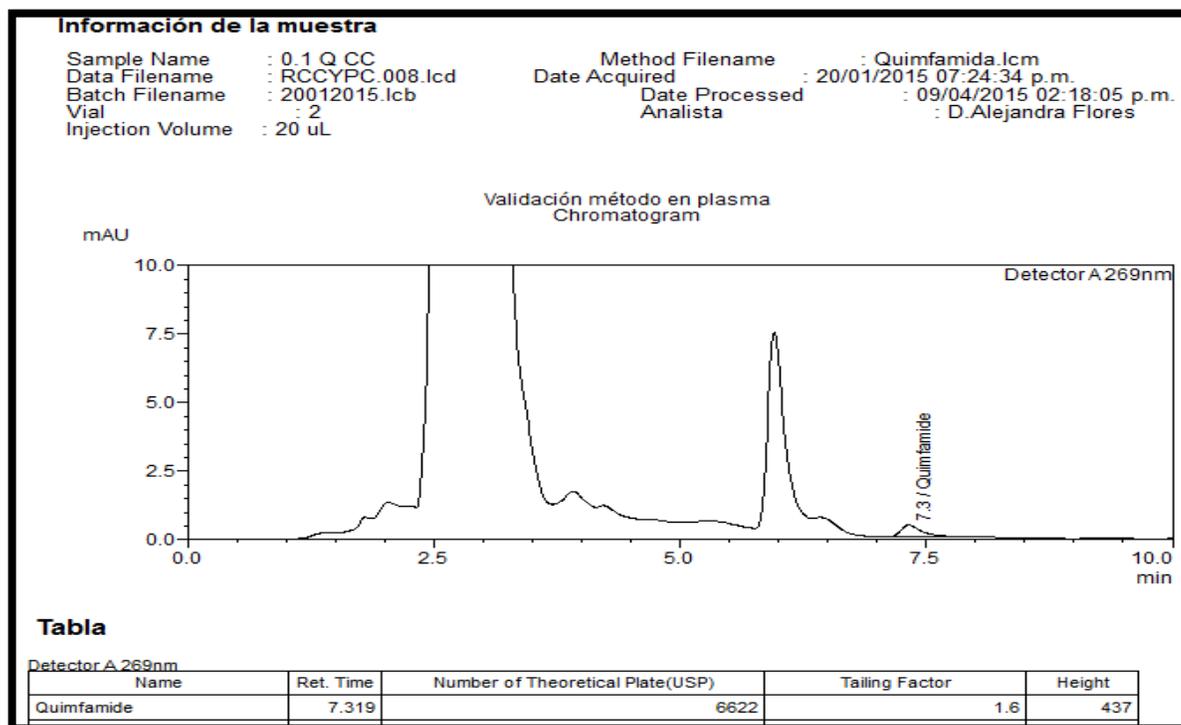
i. Cromatograma típico de Quinfamida 0.4ug/mL en plasma humano



j. Cromatograma típico de Quinfamida 0.2ug/mL en plasma humano



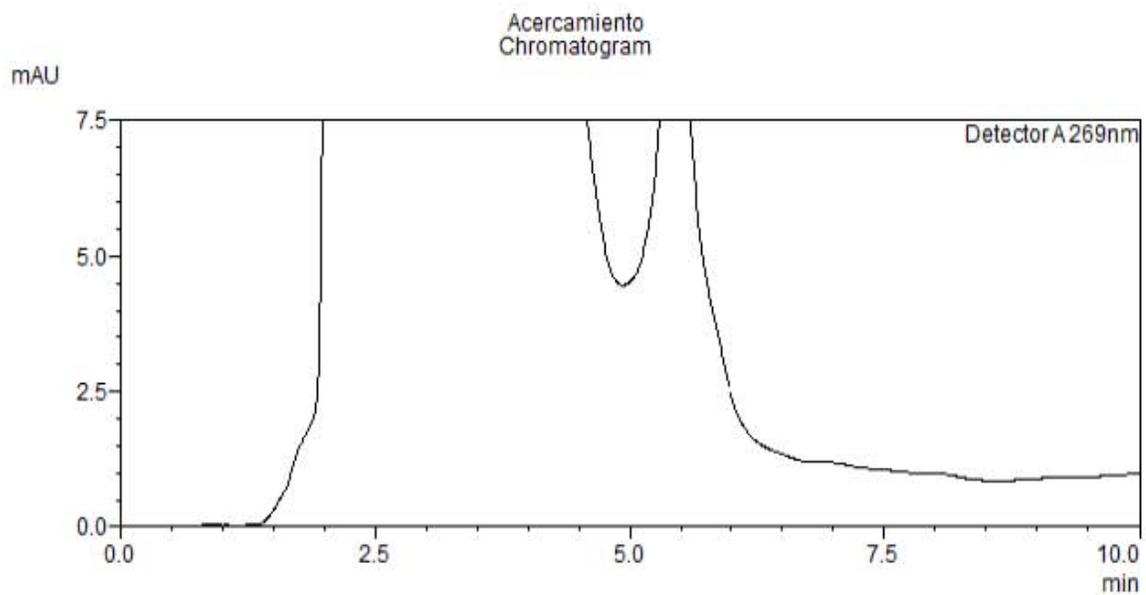
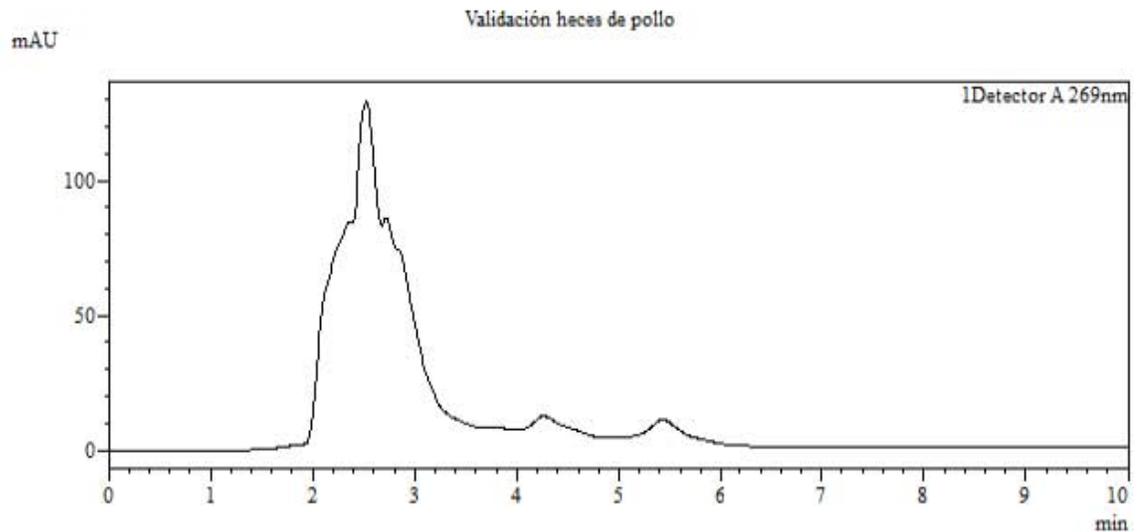
k. Cromatograma típico de Quinfamida 0.1ug/mL en plasma humano



I. Cromatograma típico de blanco de heces de pollo

Información de la muestra

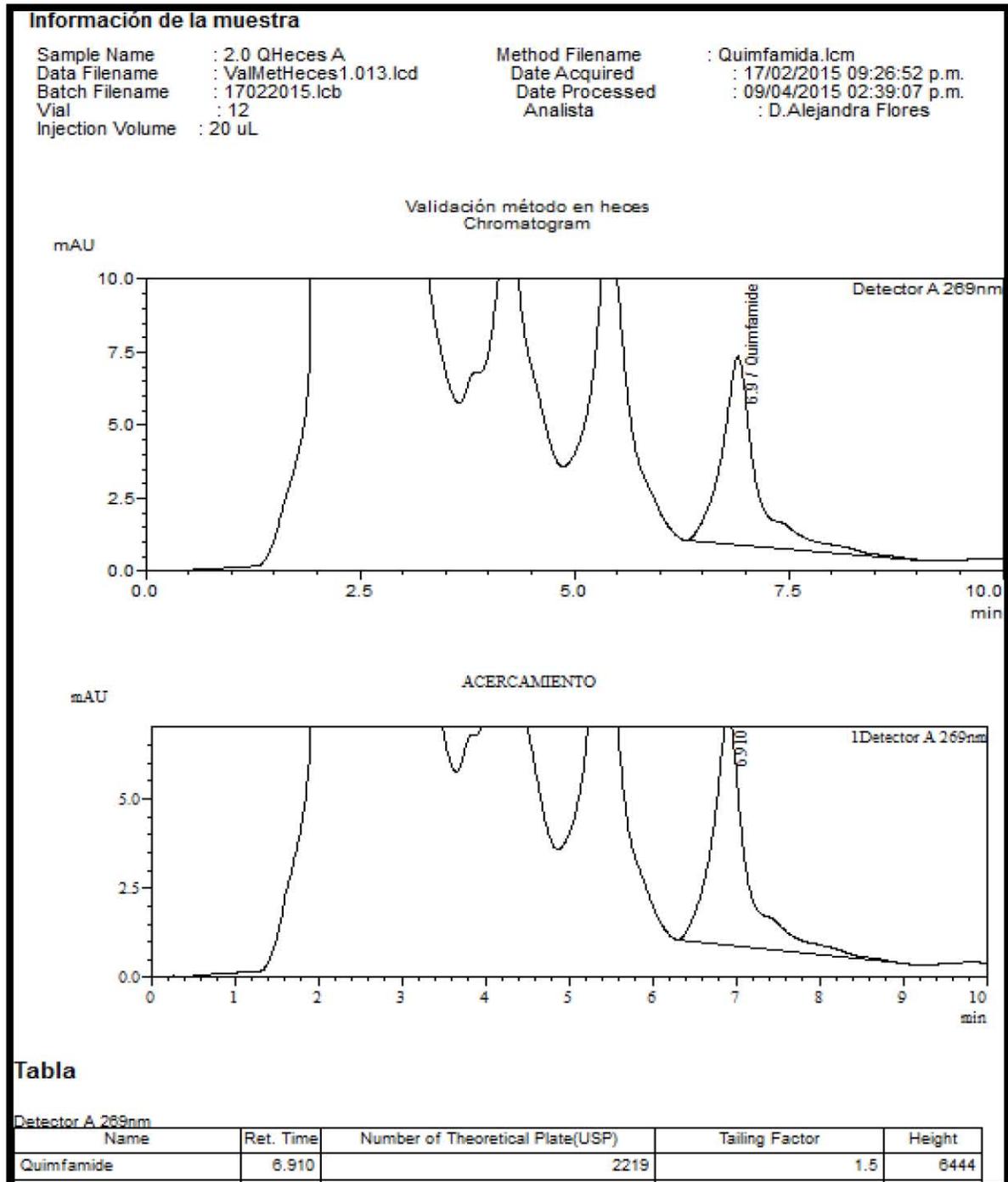
Sample Name	: BCO HECES	Method Filename	: Quimfamida.lcm
Data Filename	: ValMetHecesPC3.001.lcd	Date Acquired	: 23/02/2015 06:56:48 p.m
Batch Filename	: 23022015.lcb	Date Processed	: 23/02/2015 07:06:52 p.m
Vial	: 1	Analista	: D.Alejandra Flores
Injection Volume	: 20 uL		

**Tabla**

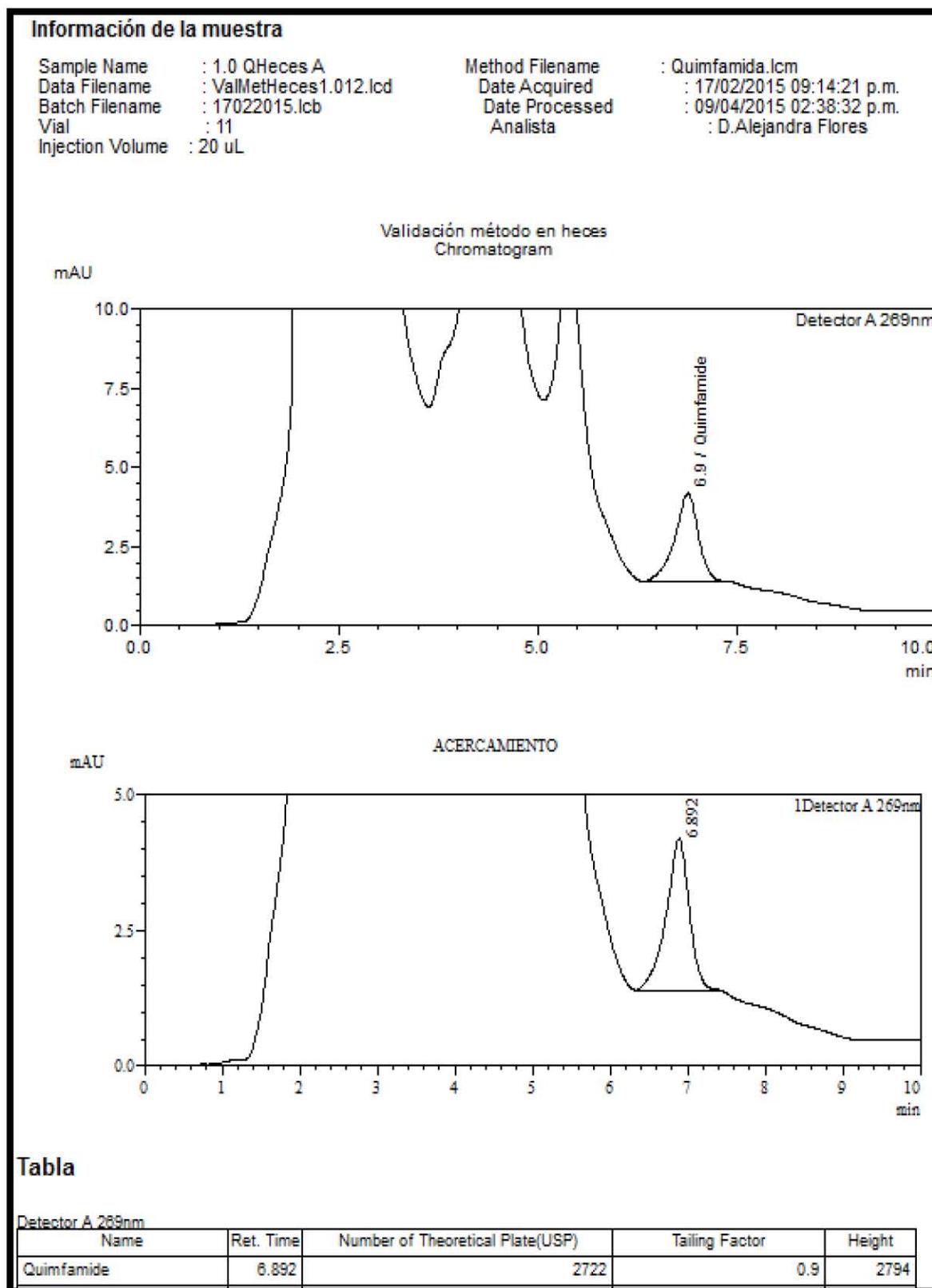
Detector A 269nm

Name	Ret. Time	Number of Theoretical Plate(USP)	Tailing Factor

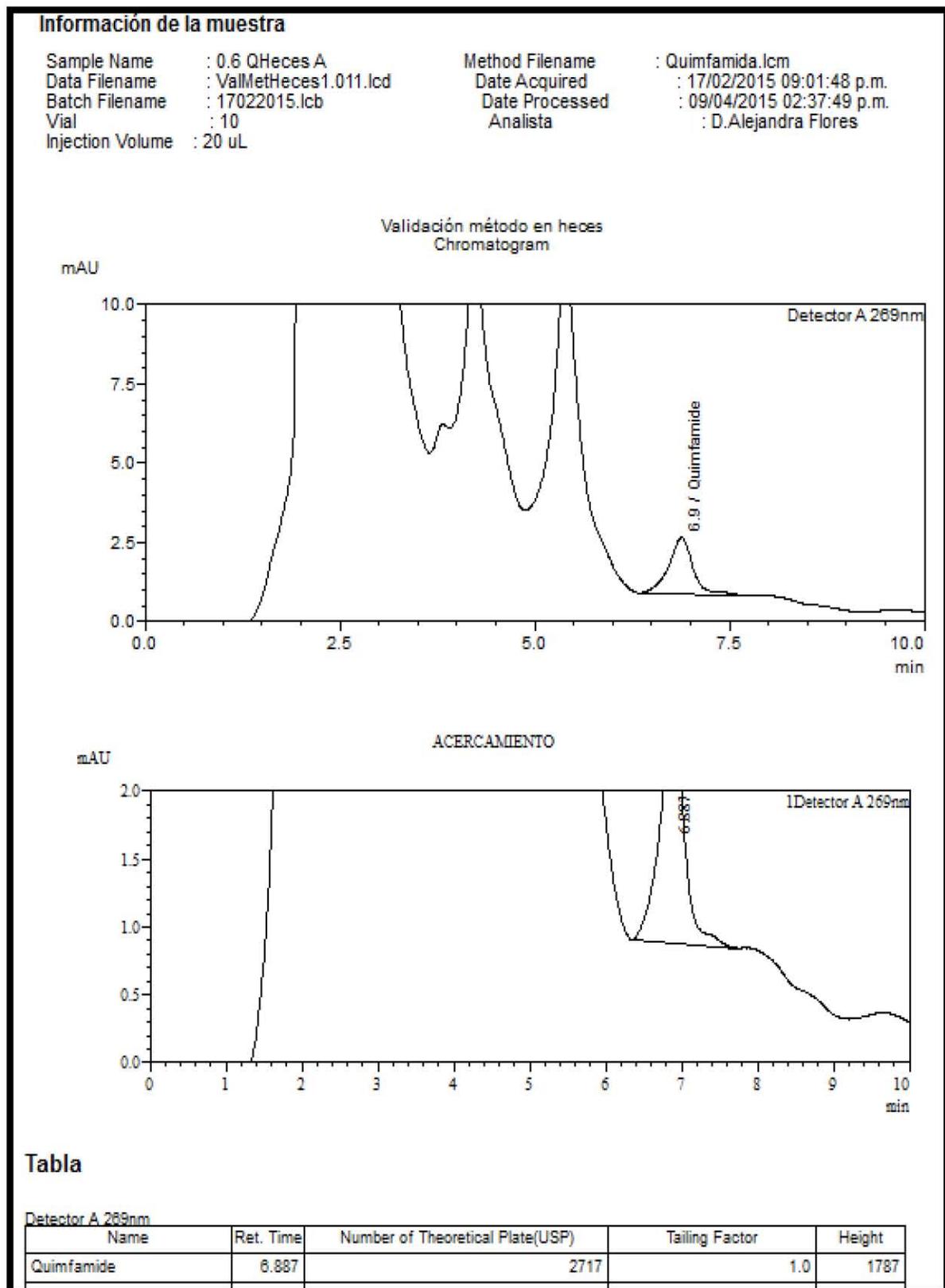
m. Cromatograma típico de Quinfamida 0.2 mg/g heces



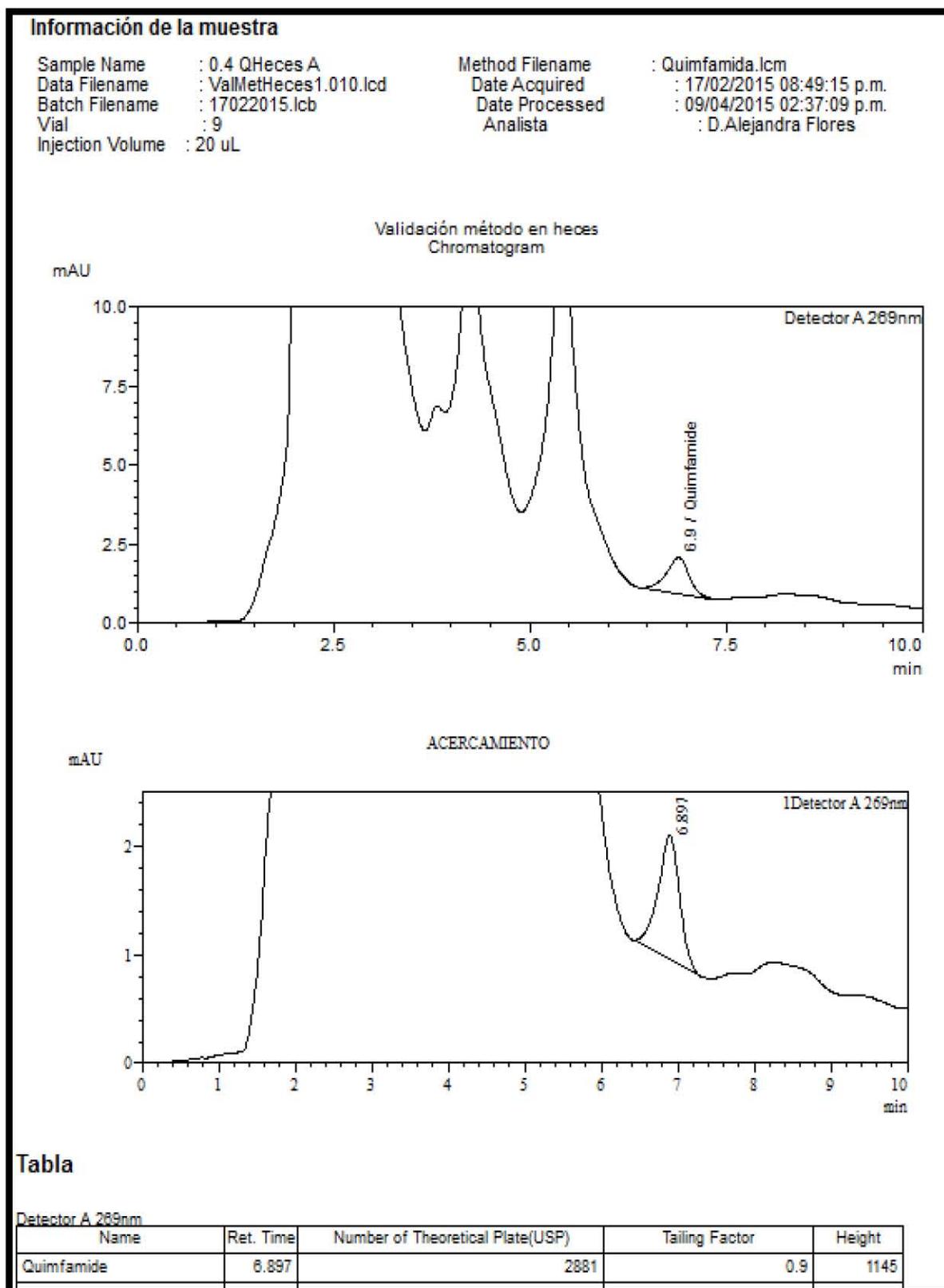
n.. Cromatograma típico de Quinfamida 0.1 mg/g heces



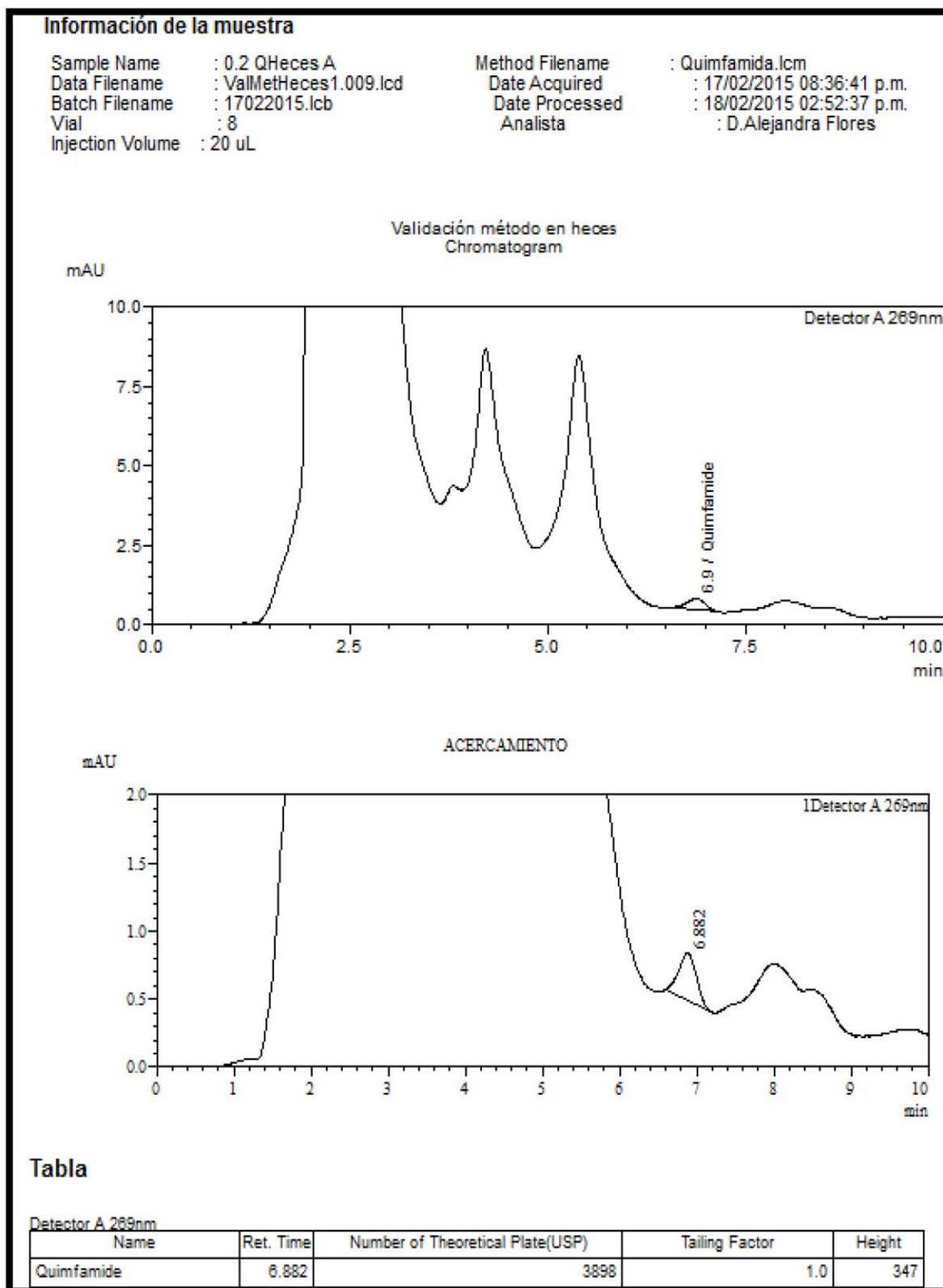
o. Cromatograma típico de Quinfamida 0.06 mg/g heces



p. Cromatograma típico de Quinfamida 0.04 mg/g heces



q. Cromatograma típico de Quinfamida 0.02 mg/g heces



r. Cromatograma típico de Quinfamida 0.01 mg/g heces

