



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EN PLASMA HUMANO (EDTA K₂) POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADO A DETECTOR MASAS/MASAS

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

SANDRA SÁNCHEZ RIVERO



Director de tesis:

Dra. Leticia Cruz Antonio

Nuevo León, México 2014



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.

Este trabajo es dedicado:

A mis padres, porque siempre han estado presentes, por enseñarme que nada es imposible, que no importa cuántas veces tropiece lo importante es aprender y levantarse, porque han sido mis principales maestros en la vida, gracias por apoyarme, amarme, creer en mí, guiarme, aconsejarme y ¿porque no? incluso castigarme, regañarme y reprenderme cuando fue necesario, porque gracias a eso he aprendido que siempre debe haber un equilibrio

A Tania Hernández, por dejarme aprender y crecer contigo profesionalmente, por apoyarme y estar presente en cada aventura, porque este proyecto lo has vivido conmigo de principio a fin y principalmente por confiar en mí. Gracias mi querido champiñón.

A mi asesora Dra. Leticia Cruz Antonio por todo el apoyo y el tiempo invertido en este proyecto, a pesar de los obstáculos que se presentaron.

A mis sinodales M. en C. Gloria Velásquez Vaquero, Mtra. María Isabel Garduño Pozadas, QFB Irma Alejandre Razo y Víctor Hugo Becerra López, porque algunos de ustedes fueron mis profesores y porque mi crecimiento profesional se encuentra cimentado en sus enseñanzas.

A Teresita de Jesús Castro Sandoval y Marco Antonio Morales Buendía, porque laboralmente han formado parte de mis dolores de cabeza al permitirme participar en grandes retos profesionales, por la confianza y amistad que me han brindado.

A Karla Orozco García por todo el apoyo a distancia, sin ti me habría llevado más tiempo culminar este proyecto.

A Avant Santé Research Center, por darme la oportunidad de ejecutar este proyecto en sus instalaciones y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ABREVIATURAS	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 MÉTODO ANALÍTICO Y SU IMPORTANCIA	5
3.2 IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	6
3.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	6
3.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA RESOLUCIÓN (UPLC) ...	8
3.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS	8
3.6 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	9
3.7 ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA	10
3.7.1 Propiedades Físico-químicas	10
3.7.2 Farmacocinética y farmacodinamia	11
3.7.3 Absorción.....	11
3.7.4 Distribución	11
3.7.5 Metabolismo	11
3.7.6 Excreción.....	12
3.8 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA.....	12
3.9 DESEMPEÑO ANALÍTICO	13
3.9.1 Selectividad	13
3.9.2 Prueba de acarreo	14
3.9.3 Linealidad	14
3.9.4 Recobro (Recuperación absoluta)	14
3.9.5 Precisión.....	15
3.9.6 Repetibilidad.....	15
3.9.7 Reproducibilidad.....	15
3.9.8 Exactitud.....	16
3.9.9 Efecto de la Matriz.....	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
5. HIPÓTESIS.....	18

6.	OBJETIVOS.....	19
6.1	OBJETIVO GENERAL	19
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1	INSTRUMENTOS.....	20
7.2	EQUIPOS.....	20
7.3	MATERIALES	20
7.4	MATRIZ BIOLÓGICA	21
7.5	REACTIVOS	21
7.6	SOFTWARE.....	21
8.	METODOLOGÍA.....	22
8.1	TUNING DE ANALITO Y ESTÁNDAR INTERNO	22
8.2	DETERMINACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	22
8.2.1	Proporción de fase móvil	22
8.2.2	Columnas cromatográficas	23
8.3	RANGO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	23
8.3.1	Solución de reconstitución	24
8.3.2	Ajuste de pH en solución diluyente y solución de reconstitución.	25
8.3.3	Soluciones de carga y muestras en solución.....	25
8.4	EXTRACCIÓN LÍQUIDO- LÍQUIDO	25
8.4.1	Preparación de muestras plasmáticas	25
8.4.2	Prueba de solventes de extracción.....	26
8.4.3	Modificador de pH en la muestra plasmática.....	28
8.5	ROBUSTES DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
8.5.1	Selectividad	29
8.5.2	Acarreo	30
8.5.3	Linealidad	30
8.5.4	Recobro	30
8.5.5	Precisión	31
8.5.6	Exactitud.....	31
8.5.7	Efecto matriz.....	31

9. RESULTADOS	32
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
11. CONCLUSIONES	55
12. REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de Curva de Calibración y Muestras Control en solución	24
Tabla 2. Preparación de curva de calibración y puntos control en plasma.....	26
Tabla 3. Parámetros de detector Masas-Masas, obtenidos del tuning para Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona D9.	32
Tabla 4. Solución de reconstitución proporción orgánico-acuosa, donde “a” es Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v y “b” es Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v	36
Tabla 5. Resultados de ajuste de pH en solución de Reconstitución solución diluyente	37
Tabla 6. Condiciones cromatográficas finales	40
Tabla 7. Selectividad de la matriz biológica	42
Tabla 8. Prueba de Acarreo	43
Tabla 9. Linealidad	44
Tabla 10. Recobro de Acetato de Medroxiprogesterona.....	46
Tabla 11. Recobro de Progesterona D9	46
Tabla 12. Repetibilidad	47
Tabla 13. Reproducibilidad y Exactitud.....	47
Tabla 14. Efecto matriz	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro MS de Acetato de Medroxiprogesterona.....	33
Figura 2. Espectro MSMS de Acetato de Medroxiprogesterona.....	33
Figura 3. Espectro MS de Progesterona D9.....	34
Figura 4. Espectro MSMS de Progesterona D9.	34
Figura 5. Proporción de fase móvil.....	35
Figura 6. Columnas cromatográficas.....	35
Figura 7. Blancos de prueba de solventes de extracción	38
Figura 8. Límites de cuantificación de la prueba de solventes de extracción	38
Figura 9. Blancos de plasma modificando pH de la muestra plasmática	39
Figura 10. Límites de cuantificación modificando pH de la muestra plasmática....	39
Figura 11. Diagrama de flujo del método de procesamiento de muestras plasmáticas.	41
Figura 12. Gráfico de Linealidad	45

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los métodos bioanalíticos para demostrar bioequivalencia de medicamentos se han desarrollado por diferentes técnicas como son RIA (Radioinmunoanálisis), Métodos microbiológicos, Cromatografía de Líquidos y Cromatografía de Gases, estos dos últimos resultan ser los más utilizados debido a su alta selectividad con respecto a los componentes endógenos de las matrices biológicas. Estas técnicas cromatográficas se encuentran acopladas a diferentes tipos de detectores entre los cuales se encuentran UV Vis, Amperometría, Quimioluminiscencia, Fluorescencia, Masas, Masas-Masas entre otros, el uso de uno u otro depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas de la molécula, de la sensibilidad deseada y de las opciones con las cuales se cuente.

Los métodos bioanalíticos incluyen un pre-tratamiento de la muestra para la eliminación de componentes de la matriz que puedan interferir con la selectividad y la sensibilidad del método, incluso con el tiempo de vida de la columna cromatográfica. La elección del método de extracción está definida de acuerdo a las propiedades físico-químicas de la molécula, así como de la sensibilidad deseada para lo cual se pueden utilizar métodos de dilución o bien concentración de la muestra, las principales técnicas de extracción utilizadas para métodos bioanalíticos son: líquido – líquido, fase sólida y precipitación.

El área bioanalítica es un campo que hace uso frecuentemente de la tecnología y esto se observa con la mejora constante de equipos y columnas cromatográficas que ayuden a cumplir los aspectos esenciales de un método bioanalítico, como lo son bajos costos, cortos tiempos de proceso, sensibilidad, selectividad y reproducibilidad.

Acetato de Medroxiprogesterona es un fármaco que muestra diferentes perfiles farmacocinéticos dependiendo de la vía de administración, por este motivo la

técnica analítica para su determinación en plasma humano debe ser lo suficientemente sensible para describir cualquier caracterización farmacocinética independientemente de la vía de administración.

Por lo que el presente trabajo propone un método de cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona: selectivo, sensible, preciso, exacto, rápido y de bajo costo.

2. ABREVIATURAS

UV Vis	:Ultra Violeta Visible
% Dev	:Desviación
°C	:Grados Celsius
µL	:Microlitro
µm	:Micrómetros
AD	:Amperometric detector
APCI	:Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionización Química a Presión Atmosférica)
API	:Atmospheric Pressure Ionization (Ionización a Presión Atmosférica)
C max	:Concentración plasmática máxima
CBG	:Corticosteroid-binding globulin (Globulina fijadora de corticoesteroides)
CC	:Curva de calibración
CL	:Chemoluminescence (Quimioluminiscencia)
CLAR	:Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Conc.	:Concentración
CV%	:Coeficiente de variación
EDTA K ₂	:Ácido etildiaminotetra acético
EI	:Estándar Interno
ESI	:Electro Spray Ionization (Ionización por Electrospray)
FM	:Factor matriz
FMN	:Factor matriz normalizado
g/mol	:gramos/mol
HM	:High mass (masa alta)
In	:pulgadas
Kv	:Kilovolts
lb/in ²	:Libra por pulgada cuadrada
L/hr	:Litros por hora
LC	:Límite de cuantificación
LC-MS	:Cromatografía de Líquidos acoplada a un espectrómetro de Masas
LC-MSMS	:Cromatografía de Líquidos acoplada a un espectrómetro de Masas/Masas
LIC	:Límite de Cuantificación en Plasma
LIC_S	:Límite de Cuantificación en Solución
LM	:Low mass (masa baja)
m/z	:masa / carga
MC	:Muestras control
MCA	:Muestra Control Alto en Plasma
MCA_S	:Muestra Control Alto en Solución
MCB	:Muestra Control Bajo en Plasma
MCB_S	:Muestra Control Bajo en Solución
MCD	:Muestra Control de Dilución en Plasma
MCD 1/5	:Muestra MCD aplicando un factor de dilución de 5 en plasma
MCD 1/5_S	:Muestra MCD_S aplicando un factor de dilución de 5 en solución
MCD_S	:Muestra Control de Dilución en Solución

MCM	:Muestra Control Medio en Plasma
MCM_S	:Muestra Control Medio en Solución
Mg	:miligramos
mg/mL	:miligramos por mililitro
mL	:mililitro
mL/min	:mililitro por minuto
Mm	:milímetros
mM	:miliMolar
MRM	:Multiple Reaction Monitoring (Monitoreo de Reacción Multiple)
MS/MS	:Masas/Masas
ng/mL	:nanogramos/mililitro
pg/mL	:picogramos/mililitro
Psi	:Unidades de presión
RIA	:Radioinmunoanálisis
Rpm	:Revoluciones por minuto
SHBG	:Sex hormone binding globulin (globulina fijadora de hormonas sexuales)
Sol.	:Solución
SPE	:Solid Phase Extraction (Extracción en Fase Sólida)
STD	:Estándar
STD _S	:Estándar en solución
UPLC	:Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución)
V	:Volts
Vol.	:Volúmen
v/v	:volumen/volumen
UV Vis	:Ultra Violeta Visible

3. MARCO TEÓRICO

3.1 MÉTODO ANALÍTICO Y SU IMPORTANCIA

La química analítica continuamente busca métodos y herramientas mejorados para medir la composición de los materiales naturales y artificiales. Las técnicas de esta ciencia se usan para identificar las sustancias que pueden estar presentes en un material y para determinar las cantidades exactas de la sustancia identificada y consiste en el análisis cualitativo (¿Qué?) y cuantitativo (¿Cuánto?).¹ Todos los métodos analíticos se basan en la observación de ciertas propiedades de los elementos o de los grupos de elementos que permitan deducir su presencia.² Los métodos analíticos se clasifican con frecuencia en clásicos e instrumentales. Los *métodos clásicos* generalmente se ejecutaban separando componentes de interés, mediante técnicas gravimétricas, volumétricas, precipitación, extracción o destilación.³ Los *métodos instrumentales* se basan en la medición de una propiedad física de la muestra como por ejemplo espectrometría (ultravioleta, visible o infrarroja), fluorimetría, espectroscopia atómica (de absorción o de emisión), espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de rayos X (de absorción, de fluorescencia), química electroanalítica (potenciometría, voltamperometría), cromatografía (de gases o de líquidos) y radioquímica.¹ Muchos de estos fenómenos sobre los que se apoyan los métodos instrumentales eran ya conocidos, sin embargo su aplicación es favorecida por el desarrollo tecnológico e industrial.³ Las ventajas de los métodos instrumentales en comparación con los métodos clásicos, es que generalmente son más sensibles, selectivos, rápidos, se pueden automatizar y pueden medir más de un analito a la vez. Como desventajas se debe considerar que suelen ser más costosas, sin embargo esto depende del número de número de muestras por analizar, pues si se evalúan los costos de personal y tiempo podrían ser menos costosos.¹

El desarrollo actual de la Química Analítica se debe en gran parte a los adelantos de la Química, la Física y la Físico-Química en sus diferentes ramas, mismos que se han aprovechado para la mejora de métodos analíticos, para contribuir de igual

forma a los adelantos de otras ciencias como pueden ser la Biología, Medicina, Geología, Agricultura, Energía Nuclear, e incluso la propia Química.²

3.2 IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Los métodos analíticos se han empleado para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en matrices biológicas (plasma, suero, sangre total, orina, etc.) con el objetivo de evaluar e interpretar estudios farmacocinéticos dentro de los cuales se incluyen los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.^{4,5} Estos estudios tienen por objetivo demostrar la intercambiabilidad de equivalentes farmacéuticos de manera científica, de tal forma que se demuestre que son igualmente seguros y eficaces al medicamento de referencia en un intervalo específico.⁶ Para la evaluación de estos métodos analíticos o también llamados bioanalíticos, generalmente se prefiere la utilización de métodos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o de Gases, ya que son más selectivos y capaces de discernir el compuesto de interés de los metabolitos u otras sustancias endógenas.⁵

3.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Actualmente existen diversas técnicas que permiten realizar la cuantificación de estos analitos en fluidos biológicos, como la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cromatografía de gases, el radioinmunoanálisis y métodos microbiológicos entre otros.⁵ La cromatografía comprende un conjunto de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de solutos entre dos fases no miscibles denominadas fase móvil y fase estacionaria.⁷ Los métodos cromatográficos se dividen en dos grupos de acuerdo a la naturaleza de sus fases involucradas y a los mecanismos de separación en cromatografía líquida, cuando la fase móvil es un líquido (denominado eluyente) y cromatografía de gases cuando la fase móvil es un gas.^{8,9}

La cromatografía de líquidos es uno de los métodos analíticos más utilizados hoy en día debido a su alta sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles pero sobre todo por su amplia aplicación a sustancias importantes en diversos campos de la ciencia.³

El éxito de esta aplicación para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración etc.

La migración diferencial en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Dichos componentes se separan en la columna y al eluir de ésta, son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención de la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto.⁸

Para seleccionar un método de cromatografía de líquidos se debe tomar en cuenta propiedades de la molécula a analizar como la solubilidad y la masa molecular. Para solutos con masas moleculares superiores a 10000 se utiliza a menudo la cromatografía de exclusión por tamaño, en el caso de especies iónicas de masa molecular pequeña, generalmente se utiliza la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de fase inversa se aplican a las especies poco polares pero no iónicas.³Un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución consta de un sistema de bombas, sistema de inyección, detector y columna cromatografica.¹⁰

Un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) tiene como característica la generación de presiones máximas de 6000 psi (lb/in²).³

3.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA RESOLUCIÓN (UPLC)

Cuando el sistema cromatográfico usa presiones de hasta 15000 psi (lb/in²) se le llama Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución conocida como UPLC por sus siglas en inglés (Ultra Performance Liquid Chromatography).¹¹

Para este tipo de cromatografía, las columnas también deben ser específicas. La tecnología ha aprovechado al máximo los principios cromatográficos para ejecutar mejores separaciones, utilizando empaques con tamaños de partículas menores a 2.5 µm lo cual ocasiona incremento en la presión del sistema y columna, mejorando la velocidad del análisis ya que incrementa la superficie de contacto con el analito, lo que ha demostrado mejorar la resolución, sensibilidad y eficiencia.¹¹

3.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS

El principio básico de la espectrometría de masas es la generación de iones a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos, para separar estos en su masa-carga (m/z), y para detectarlos cuantitativa o cualitativamente por su respectiva m/z y abundancia. El analito puede ser ionizado térmicamente, por campos eléctricos o por el impacto de electrones, iones o fotones. La espectrometría de masas mide precisamente la masa molecular de compuestos individuales por conversión a sus iones y determinando en un analizador de masas. Hoy en día la espectrometría de masas puede ser usada para determinar estructuras moleculares, para estudiar la dinámica de reacciones y la química de iones, es extremadamente versátil en áreas como la Física, Farmacéutica, Arqueología, Forense, etc.¹² El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite que se resuelvan los problemas de identificación y cuantificación de sustancias, con las suficientes garantías. La sensibilidad del análisis por LC-MS va a depender tanto del analito como de la interfase empleada. Actualmente los equipos son configurados con dos interfaces que son ionización por electrospray (ESI) e ionización química a presión reducida (APCI), las cuales forman parte de la modalidad denominada ionización a presión atmosférica (API).¹³

En las técnicas API los iones formados a presión atmosférica son transportados desde la fuente a las regiones de alto vacío del analizador a través de diferentes etapas de vacío separada por diferentes lentes. En la siguiente etapa, los iones son enfocados y guiados a través de orificios en las lentes hacia el interior del MS gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados. Dentro de las más recientes técnicas API se diferencian dos modalidades básicas de interfase ESI y APCI. La sonda APCI generalmente es utilizada para el análisis de moléculas de menos de 1000 Da, con baja o moderada polaridad. Estos analitos deben poseer además de cierta volatilidad y no ser excesivamente termolábiles, la diferencia de esta técnica con respecto a la ionización por electrospray es el uso de una corona de descarga la cual ayuda a incrementar el proceso de ionización, esta descarga eléctrica no solo ioniza las moléculas de análisis, sino también las del disolvente de la fase móvil, las cuales a su vez pueden transferir su carga a las de los analitos de la interfase gaseosa, que da como resultado la ionización química de los mismos. La sonda ESI puede ser utilizada en un amplio rango de moléculas. Es posible el análisis de moléculas pequeñas y compuestos de baja polaridad capaces de ser protonados o desprotonados o que se combinen con un anión o catión. Sin embargo su aplicación más interesante es el análisis de moléculas de elevado peso molecular, compuestos termolábiles y biomoléculas polares como péptidos, proteínas, oligonucleótidos etc., otra de sus características es su ionización “suave” que hace posible el análisis por impacto electrónico de estructuras poco estables por efecto de la temperatura. ¹³

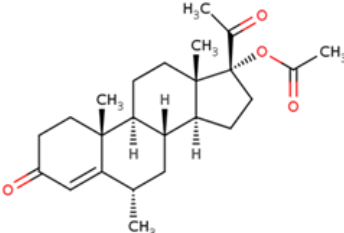
3.6 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Para trabajar matrices biológicas es indispensable que éstas sufran procesos de semipurificación. Estos procesos tienen el fin de obtener muestras más puras y eliminar las sustancias que puedan dañar las columnas empleadas para la separación de los compuestos, para así determinar de manera precisa y exacta las concentraciones de la o las sustancias de interés. Los procesos de semipurificación de las muestras pueden incluir precipitación, extracción con un disolvente inmiscible

o cromatografía por cartucho (extracción por fase sólida SPE). La característica del proceso de semipurificación depende de las concentraciones y propiedades fisicoquímicas del fármaco a analizar.^{1, 5}

3.7 ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

3.7.1 Propiedades Físico-químicas

Nombre	Acetato de Medroxiprogesterona
Nombre químico	Pregn-4-ene-3, 20-diona, 17 (acetiloxi)-6-metil-, (6 α) 17- Hydroxi-6 α -metilpren-4-ene-3,20-diona acetato
Formula molecular	C ₂₄ H ₃₄ O ₄
Estructura molecular	 <p>The image shows the chemical structure of Medroxyprogesterone acetate. It is a steroid molecule with a four-ring core. The A-ring has a ketone group at C3 and a double bond between C4 and C5. The B-ring has a methyl group at C10. The C-ring has a methyl group at C13 and a hydrogen at C14. The D-ring has a methyl group at C18 and an acetate ester group at C17. The acetate group is shown as -O-C(=O)-CH3.</p>
Peso molecular	386.53 g/mol
Punto de fusión	200 – 210 °C
Descripción	Polvo cristalino blanco inodoro, estable al aire.
Solubilidad	Muy soluble en cloroformo, soluble en acetona y dioxano, poco soluble en etanol y metanol, muy poco soluble en éter e insoluble en agua. ^{14,15, 16}

3.7.2 Farmacocinética y farmacodinamia

Acetato de Medroxiprogesterona es una hormona esteroide sintética, similar a la progesterona natural, ha sido utilizada como anticonceptivo y para el tratamiento disfuncional de sangrado uterino, amenorrea secundaria y endometrosis, el uso de este fármaco incrementa en el área de oncología debido a que funciona como un coadyuvante en el tratamiento para cáncer dependiente de hormonas como cáncer endometrial y especialmente cáncer de seno.¹⁷

3.7.3 Absorción

Acetato de Medroxiprogesterona administrado por vía oral es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y la Cmax es obtenida entre 2 y 4 horas después de la administración, cuando la vía de administración es intramuscular la Cmax se obtiene alrededor de 3 semanas.^{14, 18}

3.7.4 Distribución

Se une aproximadamente de un 88 a 90% a proteínas, principalmente a albumina, no se une a globulina fijadora de hormonas sexuales SHBG (sex hormone bindingglobulin) ni a globulina fijadora de corticoesteroides CBG (Corticosteroid-bindingglobulin).^{14, 19, 20}

3.7.5 Metabolismo

Acetato de Medroxiprogesterona es metabolizado en el hígado por enzimas P 450 a varios metabolitos de progestina. Las principales vías metabólicas son las reacciones de hidroxilación, dihidro-derivados y tetrahidro-derivados de Medroxiprogesterona.^{14, 18, 19}

3.7.6 Excreción

Su eliminación es principalmente por vía fecal, sin embargo también es eliminado por vía biliar y urinaria, para esta última se ha determinado que en dosis orales aproximadamente el 44% del fármaco es eliminado en forma de metabolitos.^{14, 18}

La vida media de Acetato de Medroxiprogesterona en dosis oral es de aproximadamente 30 horas. Para el caso de la solución intramuscular, su tiempo de vida media se encuentra alrededor de 50 días y las concentraciones plasmáticas decrecen exponencialmente a niveles por debajo de 100 pg/mL entre 120 y 200 días después de la aplicación.^{14, 18}

La Cmax de Acetato de Medroxiprogesterona para dosis de 2.5 mg es de 0.3 a 0.45 ng/mL y para una dosis de 5 mg la Cmax es de 0.6 a 0.9 ng/mL, para la solución intramuscular de 150 mg la Cmax, es de 1.75 a 9ng/mL.^{20, 21.}

3.8 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PARA ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA.

Se han desarrollado varios métodos analíticos para determinar Acetato de Medroxiprogesterona en plasma o suero, con el fin de estudiar la farmacocinética del analito y monitorear los niveles residuales en pacientes con cáncer después de la administración oral o intramuscular.

Acetato de Medroxiprogesterona se ha cuantificado en muestras plasmáticas por Radioinmunoanálisis (RIA), el límite de detección referido con esta técnica es de 0.2 ng/mL, la técnica de extracción generalmente es líquido-líquido y el tamaño de muestra reportado es de 50µL.^{22, 23, 24, 25, 26, 27} La Cromatografía de Gases también se ha utilizado para cuantificar Acetato de Medroxiprogesterona y se ha acoplado a diferentes detectores para mejorar su sensibilidad, como son: trampa de iones, espectrometría de masas; las técnicas de extracción que utiliza generalmente son líquido-líquido o extracción en fase sólida, también se puede emplear la derivatización del compuesto logrando límites de detección de 0.2 a 5.0 ng/mL, empleando un tamaño de muestra de 1 mL.^{28, 29, 30} Otra de las técnicas que más se

utiliza es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, esta técnica también se ha acoplado a diferentes detectores para incrementar la sensibilidad del método, en entre los detectores más utilizados para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona están: peroxioxalato quimioluminescencia (CL), ultravioleta (UV), amperometría (AD), trampa de iones (MSD) y masas/masas (MS/MS), con técnicas de separación de extracción líquido – líquido, extracción en fase sólida y extracción por inmunoafinidad, solo el detector de peroxioxalato quimioluminescencia requiere de la derivatización de la molécula, el límite de cuantificación más bajo reportado es de 0.05 ng/mL para la técnica de trampa de iones, con tamaño de muestra procesado de 3 mL.^{31, 32, 33, 34, 35, 36} Algunos de estos métodos han sido utilizados para la cuantificación de Acetato de medroxiprogesterona en plasma humano, bovino, porcino, tejidos y leche.

3.9 DESEMPEÑO ANALÍTICO

El desempeño de la propuesta del método analítico se determina con las siguientes pruebas.

3.9.1 Selectividad

Este parámetro es definido como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.⁶

Criterio de aceptación

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.⁶

3.9.2 Prueba de acarreo

Este factor es generado en el sistema instrumental por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores.⁶

Criterio de aceptación

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.⁶

3.9.3 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.⁶

Criterio de aceptación

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

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.⁶

3.9.4 Recobro (Recuperación absoluta)

Se determina a la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.³⁷

Criterio de aceptación

El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.³⁷

3.9.5 Precisión

Está definida como al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.⁶

3.9.6 Repetibilidad

Este parámetro se define como la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.⁶

Criterio de aceptación

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%.⁶

3.9.7 Reproducibilidad

Se define como la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.⁶

Criterio de aceptación.

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.⁶

3.9.8 Exactitud

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.⁶

Criterio de aceptación

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.⁶

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

3.9.9 Efecto de la Matriz

El efecto matriz se deriva de la co-elución residual de componentes de la matriz en la ionización del analito. Típicamente se observa como supresión o incremento de la respuesta de los analitos, este es acompañado de la variación de precisión y exactitud de muestras subsecuentes.³⁸

Criterio de aceptación.

El CV% del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15%. Esta determinación debe ser realizada con la MCB y MCA. El FM se determina con la siguiente fórmula:

$$FM = \frac{\text{Respuesta del analito} / \text{Respuesta del estándar interno (matriz)}}{\text{Respuesta del analito} / \text{Respuesta del estándar interno (solución)}}$$

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se han reportado métodos para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona en plasma mediante diversas técnicas cromatográficas tales como Líquidos y Gases, utilizando una amplia gama de detectores dependiendo de la opción cromatográfica seleccionada, entre estos se encuentran: trampa de iones, ultravioleta, masas/masas, amperometría; aplicando los procesos de extracción de primera elección como líquido-líquido y fase sólida, algunas de las cuales incluyen una reacción de derivatización de la molécula y/o de inmunoafinidad; por lo cual para las técnicas antes citadas es necesario utilizar altos volúmenes de muestra plasmática para mejorar la sensibilidad y selectividad de los métodos bioanalíticos; todo lo anterior implica altos costos y largos tiempo de proceso, para que dichos métodos de cuantificación sean aplicados a estudios de Bioequivalencia.^{17, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36}

Por lo que en el presente trabajo tiene como propósito realizar un método de cuantificación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Masas/Masas (Xevo TQ-S) el cual sea selectivo y ofrezca una mayor sensibilidad, para que de esta forma se logren reducir los costos y tiempos de proceso, mostrándose como una alternativa a ser ejecutado en estudios de Bioequivalencia.

5. HIPÓTESIS

El método analítico para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona en plasma humano utilizando un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) acoplado a un detector Xevo TQ-S Masas/Masas de alta sensibilidad, presentará selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método analítico para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona en plasma humano utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un detector Masas/Masas.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar condiciones óptimas de tuning para Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona D9 (Estandar Interno).
- Establecer las condiciones cromatográficas ideales para la cuantificación de ambos analitos.
- Definir rango de la curva de calibración para Acetato de Medroxiprogesterona.
- Evaluar la técnica de extracción Líquido-Líquido para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona D9 en la matriz biológica.
- Evaluar la robustez del método analítico.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 INSTRUMENTOS

- ❖ Espectrómetro de Masas/Masas Xevo TQ-S
- ❖ Balanza granataria
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Potenciómetro
- ❖ Micropipetas
- ❖ Multipipeta

7.2 EQUIPOS

- ❖ Acquity UPLC system
- ❖ Generador de Nitrógeno
- ❖ Equipo de computo
- ❖ Sistema de Agua Milli-Q
- ❖ Vortex Maxi Mix
- ❖ Vortex Multi Reax
- ❖ Centrífuga refrigerada
- ❖ Evaporador
- ❖ Baño de ultrasonido
- ❖ Refrigerador
- ❖ Ultracongelador
- ❖ Bomba de vacío
- ❖ Campana de extracción

7.3 MATERIALES

- ❖ Desecador
- ❖ Sistema de filtración
- ❖ Columna cromatográfica
- ❖ Reservorios
- ❖ Tubo de vidrio de 13 x 100 mm.
- ❖ Tubos falcon con capacidad de 15 y 50 mL
- ❖ Vial holder con capacidad de 2 mL

- ❖ Micro tubo eppendorf de 2 mL
- ❖ Punta para pipetas diferentes capacidades
- ❖ Probetas
- ❖ Matraz volumétrico de 5, 10, 20, 25, 100, 500 mL
- ❖ Combitips diferentes volúmenes
- ❖ Gradillas
- ❖ Membranas de celulosa Millipore de 0.22 µm

7.4 MATRIZ BIOLÓGICA

- ❖ Plasma (con anticoagulante EDTA K₂)
- ❖ Plasma (con anticoagulante Citratos)
- ❖ Plasma hemolizado (con anticoagulante EDTA K₂)
- ❖ Plasma lipémico (con anticoagulante EDTA K₂)

7.5 REACTIVOS

- ❖ Metanol grado HPLC, J.T. Baker
- ❖ Metanol grado LCMS, J.T. Baker
- ❖ Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker
- ❖ Acetonitrilo grado LCMS, J.T. Baker
- ❖ Formiato de amonio grado reactivo, J.T. Baker
- ❖ Ácido fórmico grado LCMS, Fluka
- ❖ Metil terbutil eter, J.T. Baker
- ❖ Hexano, J.T. Baker
- ❖ Éter anhídrido, J. T. Baker
- ❖ Agua Milli Q
- ❖ Nitrógeno
- ❖ Argón

7.6 SOFTWARE

- ❖ Mass Lynx
- ❖ Microsoft Office Excel 2010

8. METODOLOGÍA

8.1 TUNING DE ANALITO Y ESTÁNDAR INTERNO

Se infundieron por separado soluciones de tuning de Acetato de Medroxiprogesterona [50 ng/mL] y Progesterona D9 [100 ng/mL] a un flujo de 10 μ L/ minuto en modo combinado utilizando como Fase Móvil Formiato de Amonio 5mM: Acetonitrilo en proporción 20:80 con un flujo de 0.2 mL/minuto en modo ESI (+), buscando las transiciones 387>327 m/z para Acetato de Medroxiprogesterona y 324>100 m/z para Progesterona D9.

Se obtuvieron parámetros para ambos analitos, los cuales se muestran la Tabla 3, Figuras 1, 2, 3 y 4.

8.2 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

8.2.1 Proporción de fase móvil

Para la determinación de las condiciones cromatográficas se parte de las siguientes condiciones:

Columna	: Acquity UPLC HSS C18 1.8 μ m, 2.1 x 50 mm
Temperatura de columna	: 30 \pm 5 $^{\circ}$ C
Volumen de inyección	: 2 μ L
Solución de Lavado Débil	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 50:50 v/v (600 μ L)
Solución de Lavado Fuerte	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 80:20 v/v (200 μ L)
Flujo de la Fase Móvil	: 0.3 mL/min
Temperatura de automuestreador	: 5 \pm 3 $^{\circ}$ C

Se inyectó una solución de 250 ng/mL de Acetato de Medroxiprogesterona la cual se preparó utilizando como solución diluyente Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v bajo las siguientes condiciones de Fase Móvil.

1. Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20:80 v/v
2. Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 30:70 v/v
3. Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v

8.2.2 Columnas cromatográficas

Se probaron las siguientes columnas:

- Acquity UPLC HSS C18 de 1.8 μm , 2.1 x 50 mm
- Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 3.5 μm , 2.1 x 50 mm

Estas pruebas se realizaron inyectando muestras en solución de 19.104 ng/mL, la cual fue preparada con una solución diluyente de Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20:80 v/v.

Esta muestra se inyectó bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase Móvil	: Formiato de Amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v
Volumen de inyección	: 2 μL
Solución de Lavado Débil	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 50:50 v/v (600 μL)
Solución de Lavado Fuerte	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 80:20 v/v (200 μL)
Flujo de la Fase Móvil	: 0.3 mL/min
Temperatura de automuestreador	: 5 ± 3 °C
Temperatura de columna	: 35 ± 5 °C

8.3 RANGO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

El intervalo de calibración se basa en la C_{max} para una dosis de 150 mg/mL de Acetato de Medroxiprogesterona por vía intramuscular, para la cual se ha observado una alta variabilidad pues su C_{max} va de 1.75 a 9 ng/mL, se propuso un rango de aproximadamente 0.105 a 12 ng/mL para muestras plasmáticas, donde el Limite de Cuantificación corresponde al 6.00% de 1.75 ng/mL y el Limite Superior corresponde a 133.33 % de 9 ng/mL.²¹

8.3.1 Solución de reconstitución

Se preparó curva de calibración de 8 calibrantes en solución, así como muestras control MCA_S, MCM_S, MCB_S, LIC_S y MCD 1/5_S para cada una de las siguientes propuestas de proporción orgánico- acuoso.

- a) Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20:80 v/v
- b) Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v

Se utilizaron soluciones de carga preparadas en Formiato de amonio 5mM: Metanol 20: 80 v/v. La preparación de las muestras en solución se describe en la Tabla 1 y se fueron inyectadas bajo las condiciones descritas en la Tabla 6.

Tabla 1. Preparación de Curva de Calibración y Muestras Control en solución

Solución de carga	Conc. Sol carga ng/mL	Alícuota de sol. de carga (µL)	Progesterona d9 (100 ng/mL)	Vol. Sol de reconstitución (µL)	Vol. total (µL)	Conc. Teórica Acetato de Medroxiprogesterona (ng/mL)
STD 8_S	240.000	10	10	80	100	24.000
STD 7_S	192.000	10	10	80	100	19.200
STD 6_S	120.000	10	10	80	100	12.000
STD 5_S	60.000	10	10	80	100	6.000
STD 4_S	24.000	10	10	80	100	2.400
STD 3_S	12.000	10	10	80	100	1.200
STD 2_S	4.200	10	10	80	100	0.420
STD 1_S	2.100	10	10	80	100	0.210
MCD_S*	600.000	10	0	90	100	60.000
MCA_S	168.000	10	10	80	100	16.800
MCM_S	100.800	10	10	80	100	10.080
MCB_S	6.048	10	10	80	100	0.605
LIC_S	2.117	10	10	80	100	0.212
MCD1/5_S	60.000	20	10	80	100	12.000

*Muestra para aplicar dilución 1/5 la cual tiene una concentración de 2.5 veces por arriba del STD 8.

8.3.2 Ajuste de pH en solución diluyente y solución de reconstitución.

Se preparó curva de calibración de 8 puntos y muestras control en solución ajustando el pH a 4.5 para la solución Diluyente y Solución de reconstitución

- a) Solución diluyente: Formiato de amonio 5mM pH 4.5: Metanol 20:80 v/v
- b) Solución de reconstitución: Formiato de amonio 5mM pH 4.5: Acetonitrilo 40:60 v/v.

La preparación de las muestras en solución se describe en la Tabla 1 y fueron inyectadas bajo las condiciones descritas en la Tabla 6.

8.3.3 Soluciones de carga y muestras en solución.

La distribución de los estándares de calibración y puntos control propuesto para determinar la linealidad en solución se describen en la Tabla 1.

Las soluciones de carga fueron preparadas utilizando como solución diluyente: Metanol: Formiato de Amonio 5mM pH 4.5 (80:20 v/v), las cuales se obtuvieron por diluciones seriadas a partir de una solución de Acetato de Medroxiprogesterona de [100 ng/mL], estas soluciones son utilizadas para cargar tanto muestras en solución como plasmáticas.

La solución de reconstitución utilizada fue Formiato de amonio 5mM pH 4.5: Acetonitrilo 40:60 v/v. Para la preparación de las muestras en solución se consideró un factor de concentración de 2 con respecto a las muestras plasmáticas.

8.4 EXTRACCIÓN LÍQUIDO- LÍQUIDO

8.4.1 Preparación de muestras plasmáticas

La preparación de las muestras plasmáticas, a partir de las soluciones de carga, se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de curva de calibración y puntos control en plasma.

Solución de carga	Conc. Sol carga ng/mL	Alícuota de sol. De carga (µL)	Vol. Plasma (µL)	Vol. total (µL)	Conc. Teórica Acetato de Medroxiprogesterona (ng/mL)
STD 8	240.000	10	190	200	12.000
STD 7	192.000	10	190	200	9.600
STD 6	120.000	10	190	200	6.000
STD 5	60.000	10	190	200	3.000
STD 4	24.000	10	190	200	1.200
STD 3	12.000	10	190	200	0.600
STD 2	4.200	10	190	200	0.210
STD 1	2.100	10	190	200	0.105
MCD*	600.000	10	190	200	30.000
MCA	168.000	10	190	200	8.400
MCM	100.800	10	190	200	5.040
MCB	6.048	10	190	200	0.302
LIC	2.117	10	190	200	0.106
MCD 1/5	30.000	40	160	200	6.000

*Muestra para aplicar dilución 1/5 la cual tiene una concentración de 2.5 veces por arriba del STD 8.

8.4.2 Prueba de solventes de extracción

Para evaluar extracción líquido – líquido se evaluaron los siguientes solventes de extracción:

- Hexano 100 %
- Metil terbutil éter 100%
- Éter etílico anhidro 100%

Para la evaluación de esta prueba se procesó una muestra blanco de plasma y un STD 1 (límite de cuantificación).

Para el procesamiento de la muestra blanco se transfirió a un eppendorf 200 μL de plasma libre de fármaco y se continuó con el proceso de extracción a partir del paso f, el procesamiento del STD1 se llevó a cabo de acuerdo al método que se describe a continuación:

- a. En un eppendorf adicionar 190 μL de plasma libre de fármaco
- b. Adicionar 10 μL de una solución de 2.100 ng/mL de Acetato de Medroxiprogesterona (solución de carga del STD 1).
- c. Agitar 20 segundos en vortex maxi mix
- d. Adicionar 10 μL de Progesterona D9 [100 ng/mL]
- e. Agitar 20 segundos en vortex maxi mix
- f. Adicionar 1.3 mL del solvente de extracción a probar
- g. Agitar en vortex multireax por 3 minutos a máxima velocidad.
- h. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- i. Congelar la fracción acuosa a $-70\text{C} \pm 10 \text{C}$ por 10 minutos
- j. Decantar la fracción orgánica a un tubo de vidrio liso
- k. Evaporar bajo atmosfera de nitrógeno a 50°C por 5 minutos
- l. Adicionar 100 μL de solución de reconstitución Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v.
- m. Agitar por 20 segundos en vortex maxi mix
- n. Transferir la muestra a viales con inserto

Estas muestras fueron inyectadas en el equipo cromatográfico bajo las siguientes condiciones.

Fase Móvil : Formiato de Amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v

Volumen de inyección : 2 μL

Solución de Lavado Débil : Acetonitrilo: Agua Milli Q 50:50 v/v (600 μL)

Solución de Lavado Fuerte : Acetonitrilo: Agua Milli Q 80:20 v/v (200 μL)

Flujo de la Fase Móvil : 0.3 mL/min

Temperatura de automuestreador : $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$

Temperatura de columna	35 ± 5 °C
Columna cromatográfica	Acquity UPLC HSS C18 1.8 µm, 2.1 x 50 mm

8.4.3 Modificador de pH en la muestra plasmática

Se modificó el pH de la muestra plasmática utilizando diferentes volúmenes de ácido fórmico 0.1% (10, 20, 50, 70 y 100 µL), para lo cual se procesaron blancos de plasma y STD1 para cada volumen, para el procesamiento del blanco de plasma se transfirió 200 µL de plasma libre de fármacos y se continuó con el método de procesamiento a partir del paso f, el procesamiento del STD1 se realizó de acuerdo el siguiente método de procesamiento:

- a. En un eppendorf adicionar 190 µL de plasma libre de fármaco
- b. Adicionar 10 µL de una solución de carga de Acetato de Medroxiprogesterona de 2.100 ng/mL
- c. Agitar 20 segundos en vortex maxi mix
- d. Adicionar 10 µL de Progesterona D9 [100 ng/mL]
- e. Agitar 20 segundos en vortex maxi mix
- f. Adicionar el volumen de prueba de ácido fórmico 0.1%
- g. Agitar en vortex maxi mix 10 segundos.
- h. Adicionar 1.3 mL de Hexano HPLC 100%
- i. Agitar en vortex multireax por 3 minutos a máxima velocidad.
- j. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- k. Congelar la fracción acuosa a -70C ± 10 C por 10 minutos
- l. Decantar la fracción orgánica a un tubo de vidrio liso
- m. Evaporar bajo atmosfera de nitrógeno a 50°C por 5 minutos
- n. Adicionar 100 µL de solución de reconstitución Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40: 60 v/v.
- o. Agitar por 20 segundos en vortex maxi mix
- p. Transferir la muestra a viales con inserto

Estas muestras fueron inyectadas en el equipo cromatográfico bajo las siguientes condiciones.

Fase Móvil	: Formiato de Amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v
Volumen de inyección	: 2 µL
Solución de Lavado Débil	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 50:50 v/v (600 µL)
Solución de Lavado Fuerte	: Acetonitrilo: Agua Milli Q 80:20 v/v (200 µL)
Flujo de la Fase Móvil	: 0.3 mL/min
Temperatura de automuestreador	: 5 ± 3 °C
Temperatura de columna	35 ± 5 °C
Columna cromatográfica	Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 3.5 µm, 2.1 x 50 mm

8.5 ROBUSTES DEL MÉTODO ANALÍTICO

8.5.1 Selectividad

Se procesaron muestras blanco de plasma y STD 1 (Limite de cuantificación) para 6 lotes de plasma, 1 plasma hemolizado y 1 lipémico con EDTA K₂ como anticoagulante y 1 lote de plasma con Heparina.

La muestra blanco de plasma, se preparó transfiriendo 200 µL de plasma libre de fármacos y se continuó con la técnica de procesamiento, sin adición de Progesterona D9.

La muestra cero, se preparó transfiriendo 200 µL de plasma libre de fármacos, se adicionó 10 µL de Progesterona D9 [100 ng/mL] y se continuó con la técnica de procesamiento.

Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo especificado en la Figura 11 y se inyectaron bajo las condiciones cromatográficas de la Tabla 6.

8.5.2 Acarreo

Se procesaron las siguientes muestras plasmáticas: 6 STD 1 (Limite de cuantificación), 1 blanco de plasma y 1 STD 8 (Limite Superior), el procesamiento se describe en la Figura 11, las muestras fueron inyectadas bajo las condiciones descritas en la Tabla 6. Inmediato a la inyección del STD 8 se realizan 2 reinyecciones del blanco de plasma

8.5.3 Linealidad

La linealidad fue determinada con 8 calibrantes en un intervalo de 0.105 ng/mL – 12,000 ng/mL.

Para la evaluación de este parámetro se procesaron 3 curvas de calibración cada una con blanco y cero de plasma. La carga de las muestras para la curva de calibración se describe en la Tabla 2.

Estas muestras fueron procesadas de acuerdo al diagrama de proceso de la Figura 11 e inyectadas bajo las condiciones cromatográficas de la Tabla 6

8.5.4 Recobro

El recobro fue determinado para Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona-d9 extrayendo 5 muestras de puntos control MCB, MCM, y MCA y comparadas con 5 muestras en solución MCB_S, MCM_S y MCA_S, las muestras en plasma fueron cargadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2 y procesadas de acuerdo al diagrama de la Figura 11, en el caso de las muestras en solución éstas fueron cargadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1. Las condiciones cromatográficas bajo las cuales se inyectaron se encuentran descritas en la Tabla 6

8.5.5 Precisión

- Repetibilidad

Fue determinada procesando 5 niveles de muestras control, analizando 5 réplicas para cada nivel LIC, MCB, MCM, MCA, MCD, las muestras fueron cargadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2 y procesadas de acuerdo al diagrama de proceso de la Figura 11 e inyectadas al equipo cromatográfico bajo las condiciones descritas en la Tabla 6.

- Reproducibilidad

La precisión y exactitud fue determinada procesando 5 niveles de muestras control, analizando 5 réplicas para cada nivel de concentración LIC, MCB, MCM, MCA y MCD, durante dos días en 3 corridas diferentes, las muestras fueron cargadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2 y procesadas de acuerdo al diagrama de proceso de la Figura 11 e inyectadas al equipo cromatográfico bajo las condiciones descritas en la Tabla 6

8.5.6 Exactitud

Se utilizan los resultados de la prueba de reproducibilidad para obtener la exactitud del método.

8.5.7 Efecto matriz

Se procesaron 6 réplicas de muestras blanco de plasma de 200 μ L para cada lote utilizado en la selectividad (6 lotes de plasma, 1 plasma hemolizado y 1 lipémico con EDTA K2 como anticoagulante y 1 lote de plasma con Heparina), de acuerdo a procesamiento descrito en la Figura 11, a partir de la adición de los 10 μ L del ácido fórmico 0.1%, una vez realizada la extracción, 3 de las réplicas para cada lote de plasma fueron cargadas con una solución de analito /estándar interno a la concentración del MCA y las 3 réplicas restantes fueron cargadas con una solución de analito / estándar interno a la concentración del MCB.

9. RESULTADOS

Tabla 3. Parámetros de detector Masas-Masas, obtenidos del tuning para Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona D9.

Parametros	Acetato de Medroxiprogesterona	Progesterona D9
Capilar (Kv)	0.8	
Source offset (V)	25	
Source temp (°C)	150	
Desovotation temp (°C)	500	
Cone gas flow(L/Hr)	150	
Desolvatation gas flow	900	
Colission gas flow (mL/min)	0.15	
LM 1 Resolution	2.9	
LH 1 Resolution	14.8	
Ion energy 1	0.1	
LM 2 Resolution	2.8	
LH 2 Resolution	14.9	
Ion energy 2	0.4	
Collision	13	21
Cono (kV)	2	2

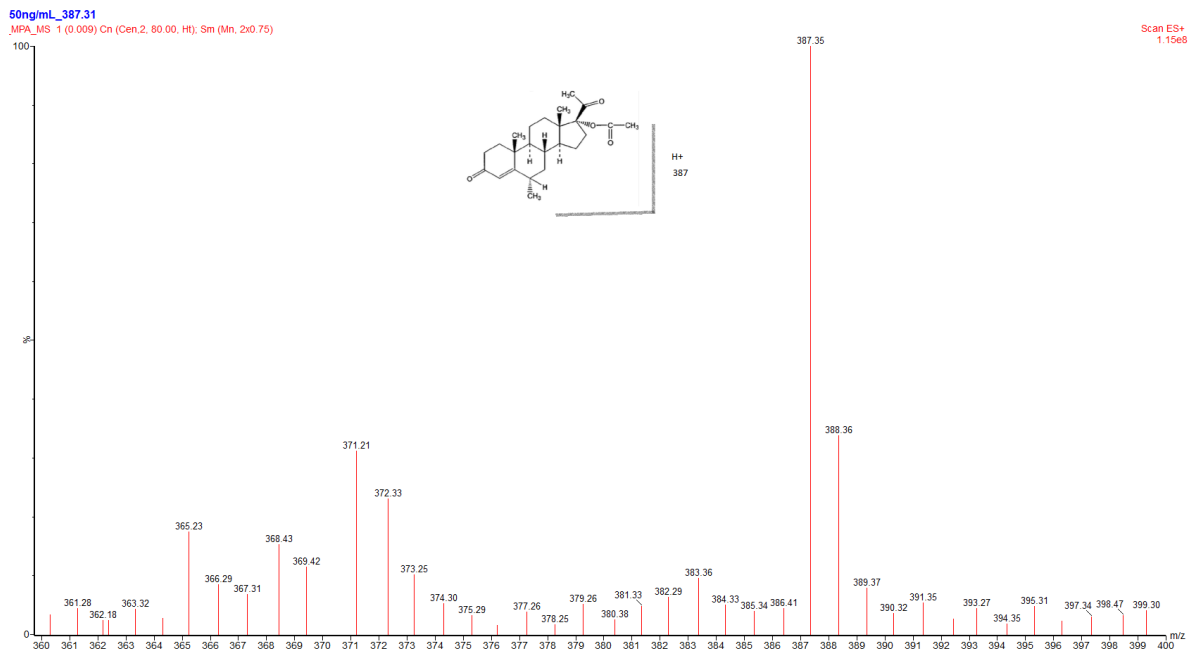


Figura 1. Espectro MS de Acetato de Medroxiprogesterona

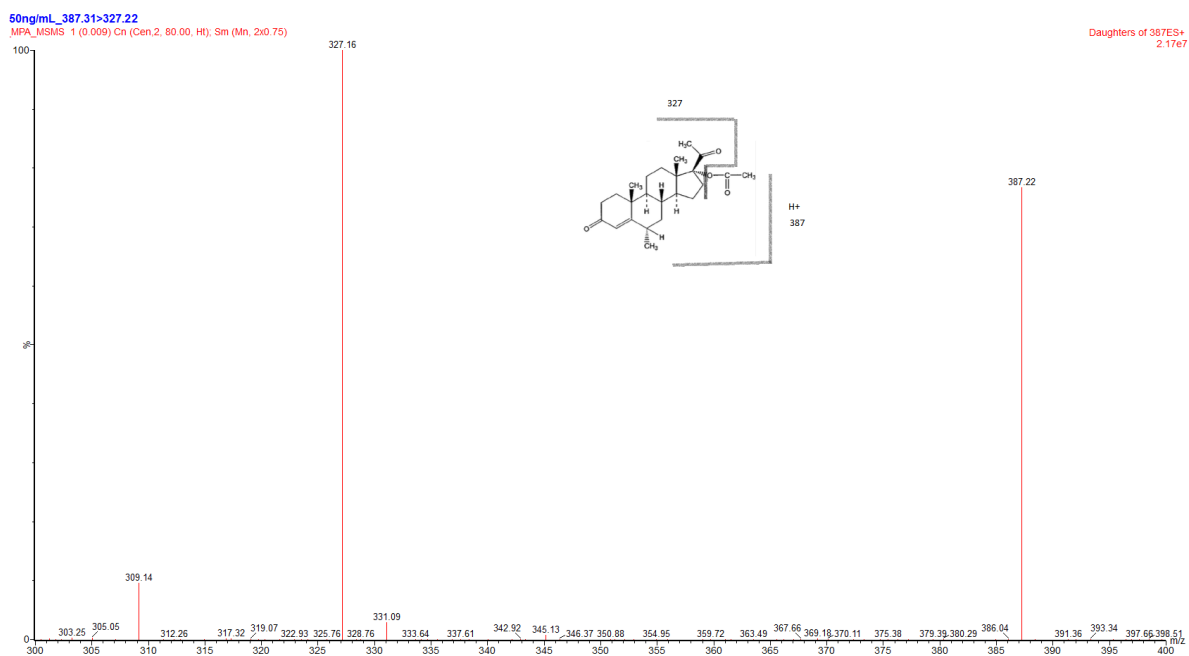


Figura 2. Espectro MSMS de Acetato de Medroxiprogesterona.

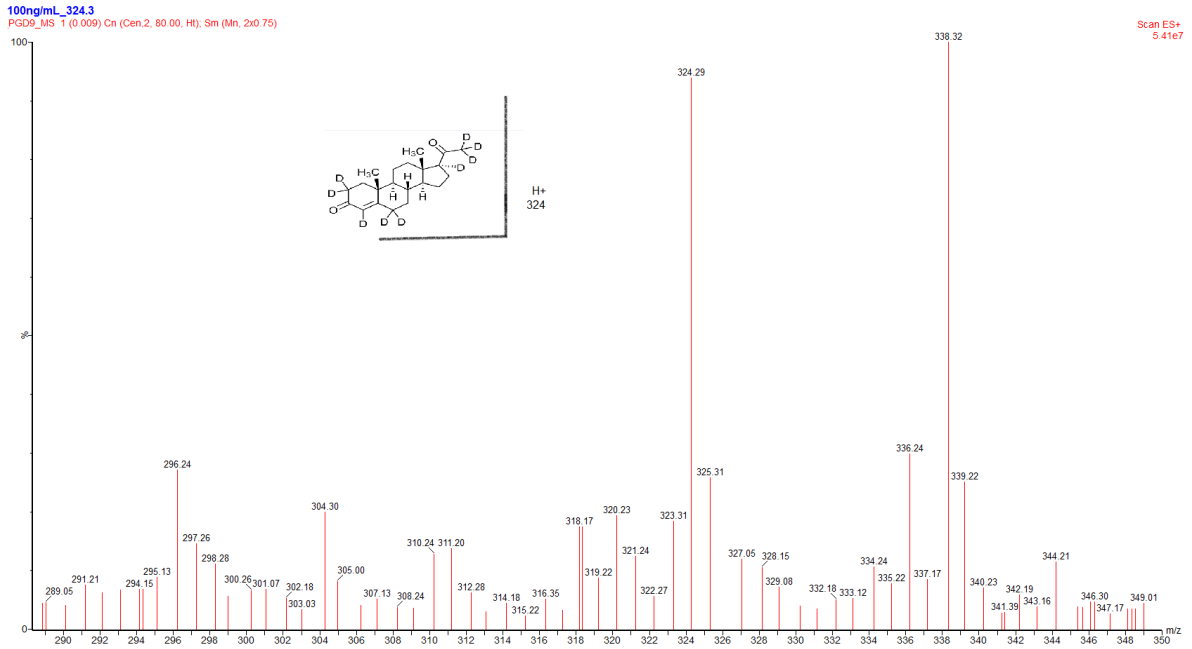


Figura 3. Espectro MS de Progesterona D9.

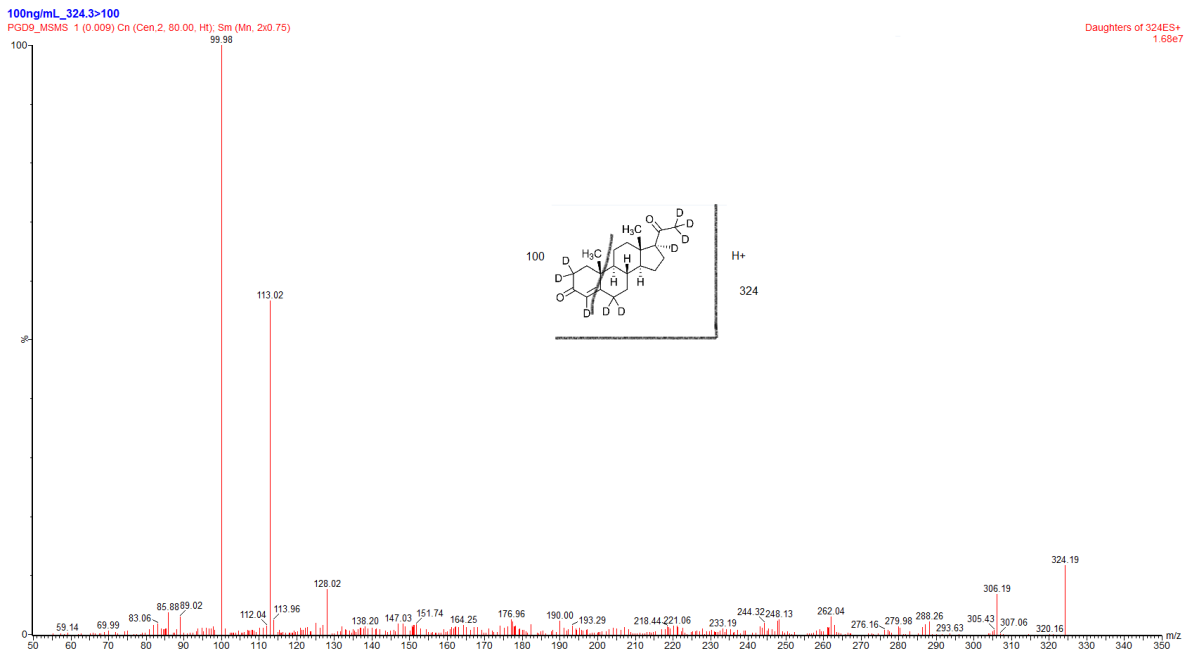


Figura 4. Espectro MSMS de Progesterona D9.

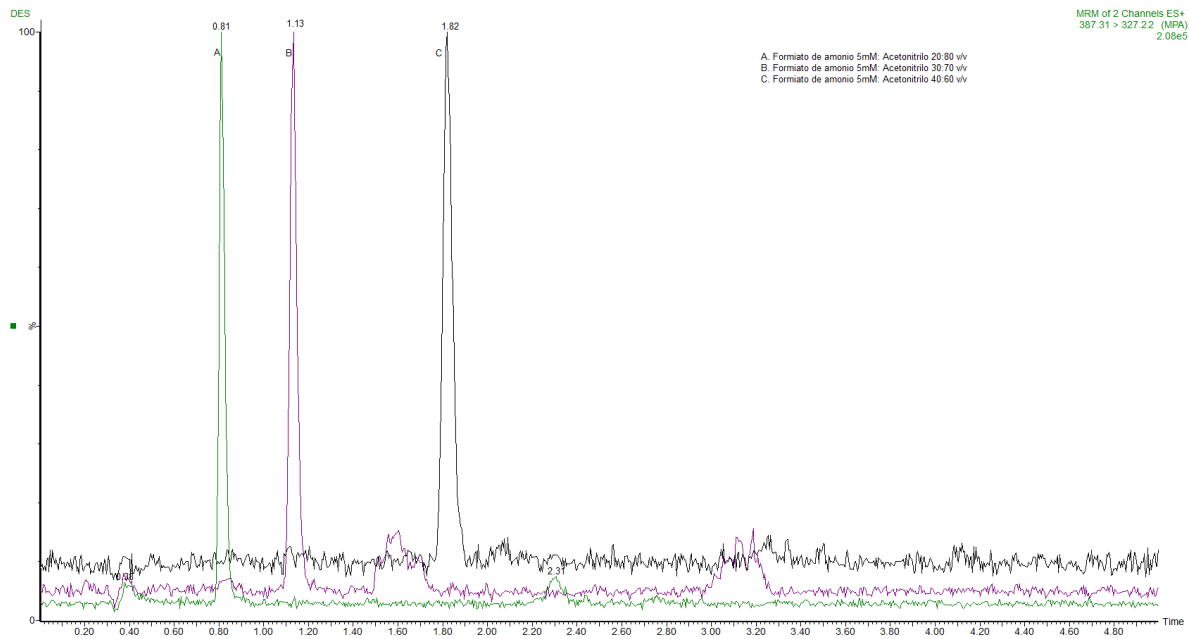


Figura 5. Proporción de fase móvil

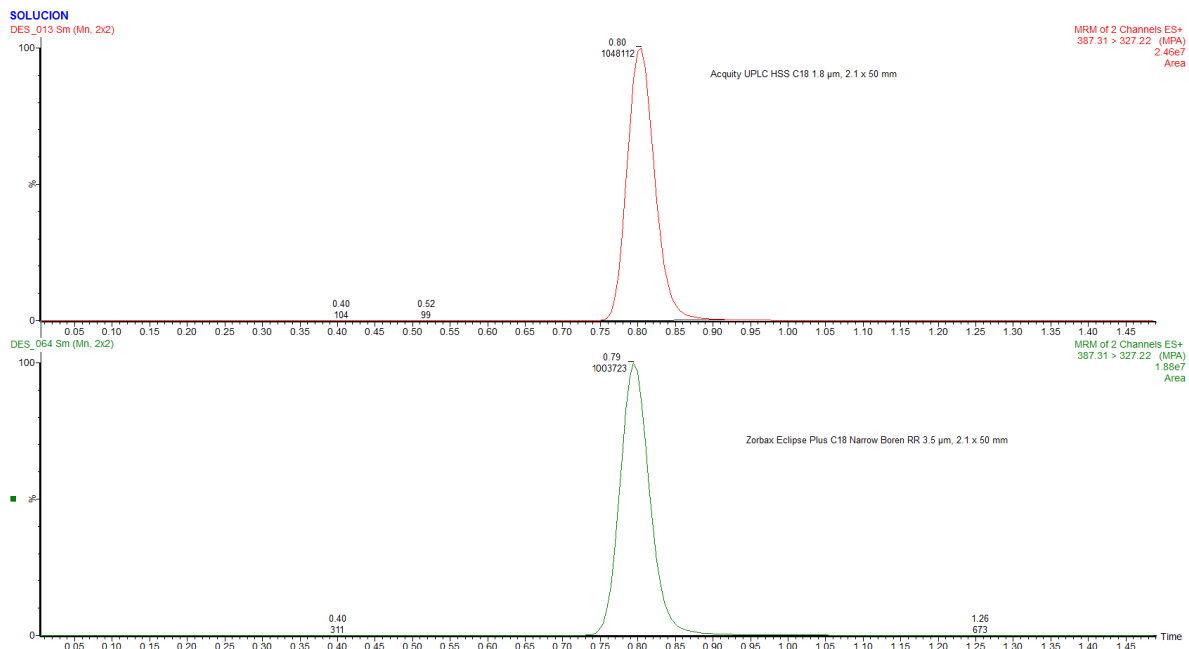


Figura 6. Columnas cromatográficas

Tabla 4. Solución de reconstitución proporción orgánico-acuosa, donde “a” es Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20: 80 v/v y “b” es Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v

CC / MC	Concentración ng/mL*	% Dev	
		a	b
STD 1_S	0.209	0.28	-1.89
STD 2_S	0.418	-0.71	0.05
STD 3_S	1.194	-0.14	-2.92
STD 4_S	2.388	2.43	1.11
STD 5_S	5.970	-1.45	2.76
STD 6_S	11.940	-1.18	3.27
STD 7_S	19.104	0.2	-0.51
STD 8_S	23.880	0.56	-1.87
MCA_S	16.716	-2.97	2.98
MCM_S	10.030	-2.37	-0.19
MCB_S	0.602	0.87	-0.96
LIC_S	0.211	15.31	1.64
MCD 1/5_S	11.940	1.34	3.45

*Concentración nominal corregida después de cálculos de pureza con respecto a la concentración pesada

Tabla 5. Resultados de ajuste de pH en solución de Reconstitución solución diluyente

CC / MC	Concentración teórica ng/mL	% Dev
STD 1_S	0.209	-4.63
STD 2_S	0.418	1.84
STD 3_S	1.194	-2.25
STD 4_S	2.388	5.41
STD 5_S	5.970	0.89
STD 6_S	11.940	-0.33
STD 7_S	19.104	-2.28
STD 8_S	23.880	1.35
MCA_S	16.716	4.85
MCM_S	10.030	3.61
MCB_S	0.602	-0.91
LIC_S	0.211	0.91
MCD 1/5_S	11.940	5.66

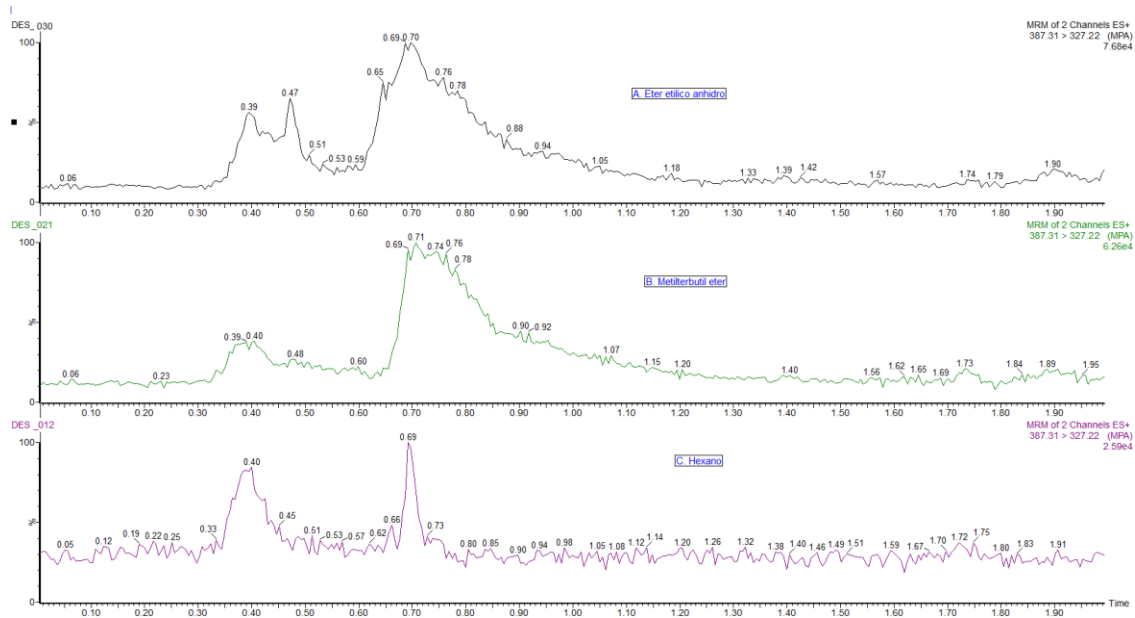


Figura 7. Blancos de prueba de solventes de extracción

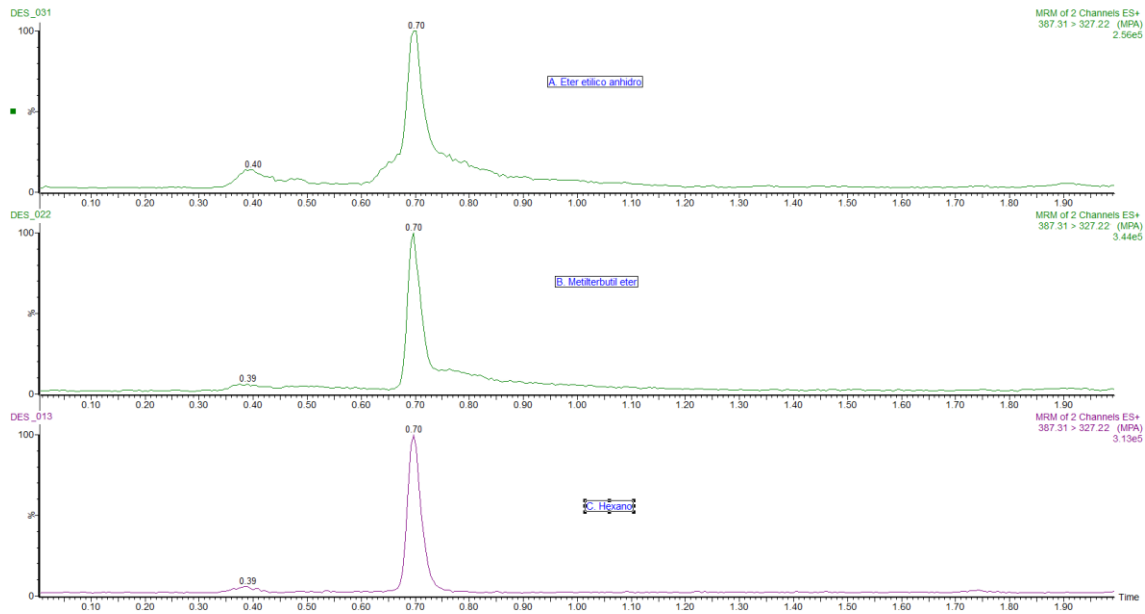


Figura 8. Límites de cuantificación de la prueba de solventes de extracción

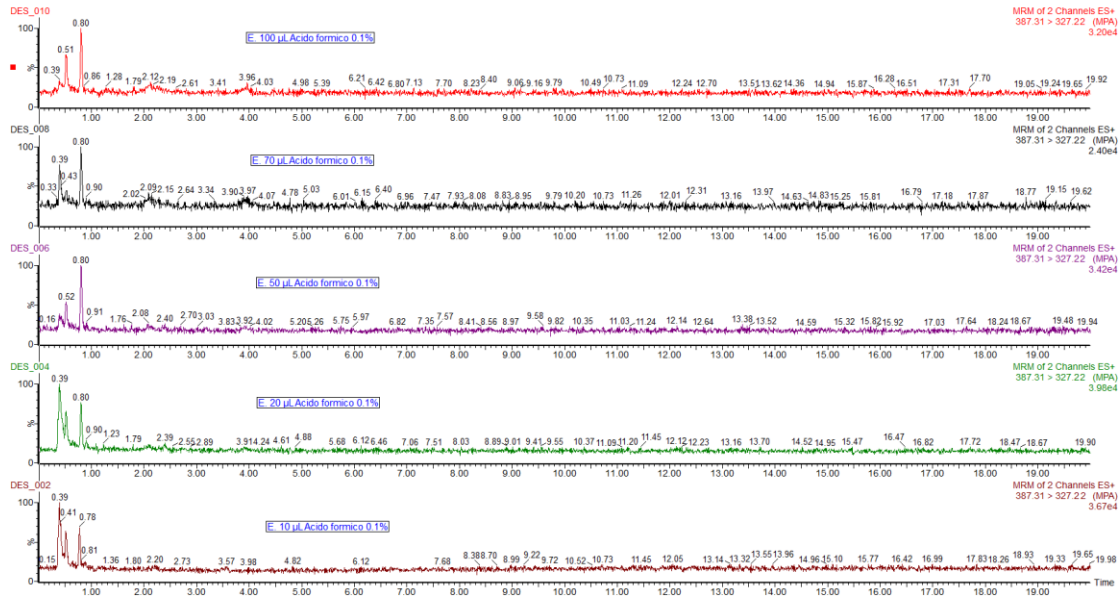


Figura 9. Blancos de plasma modificando pH de la muestra plasmática

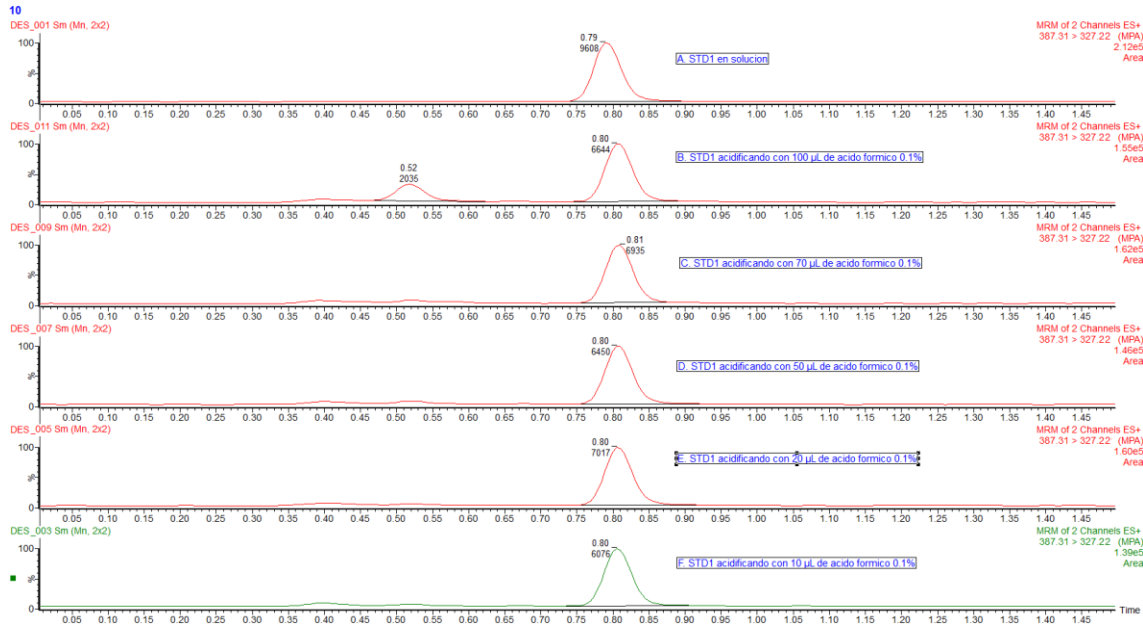


Figura 10. Límites de cuantificación modificando pH de la muestra plasmática

Tabla 6. Condiciones cromatográficas finales

Columna	Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm, 3.5 μ m
Fase Móvil	Formiato de Amonio 5mM pH 4.5 : Acetonitrilo LCMS 20: 80 v/v
Temperatura de columna	35 \pm 5°C
Flujo de la Fase Móvil	0.3 mL/min
Volumen de inyección	2.0 μ L
Temperatura de automuestreador	5 \pm 3°C
Tiempo de corrida	2.5 minutos
Solución de Lavado Débil	Acetonitrilo: Agua Milli Q 50:50 v/v (600 μ L)
Solución de Lavado Fuerte	Acetonitrilo: Agua Milli Q 80:20 v/v (200 μ L)

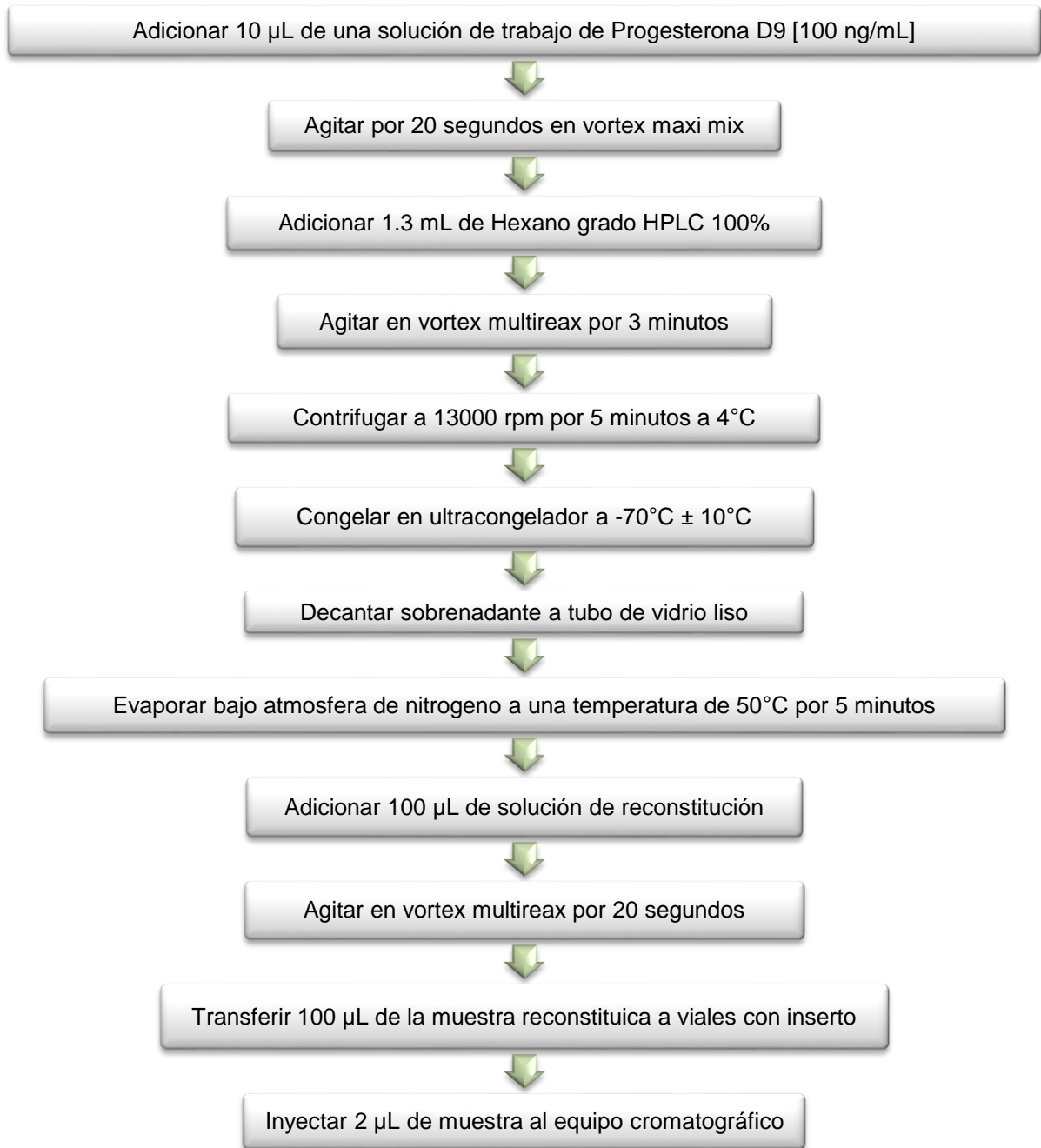


Figura 11. Diagrama de flujo del método de procesamiento de muestras plasmáticas.

Tabla 7. Selectividad de la matriz biológica

ID Muestra	Área del pico		% Interferencia	
	Acetato de Medroxiprogesterona	Progesterona D9	Acetato de Medroxiprogesterona	Progesterona D9
P-001_Blanco	80	91	1.52	0.06
P-001_STD 1	5274	163677		
P-002_Blanco	122	55	2.59	0.04
P-002_STD 1	4706	133624		
P-003_Blanco	131	314	2.46	0.20
P-003_STD 1	5329	160194		
P-004_Blanco	69	170	1.47	0.13
P-004_STD 1	4699	134586		
P-005_Blanco	89	40	1.61	0.03
P-005_STD 1	5532	159415		
P-006_Blanco	104	891	2.07	0.62
P-006_STD 1	5019	143024		
P-007_Blanco (Lipemia)	87	399	1.51	0.23
P-007_STD 1 (Lipemia)	5748	171032		
P-008_Blanco (Hemólisis)	82	1195	1.76	0.92
P-008_STD 1 (Hemólisis)	4671	130259		
P-009_Blanco (HEPARINA)	89	62	1.77	0.04
P-009_STD 1 (HEPARINA)	5042	156497		

Tabla 8. Prueba de Acarreo

Muestra	Área del pico			
	Acetato de Medroxiprogesterona	Progesterona d9		
LC 1	5114	147158		
LC 2	4912	144422		
LC 3	5154	150706		
LC 4	4777	139127		
LC 5	4908	143814	% Acarreo	
LC 6	4613	134281	Acetato de Medroxiprogesterona	Progesterona d9
Promedio (STD 1)	4913.0	143251.3		
Blanco	165	29	3.36	0.02
STD 8	551641	141946		
Blanco_Reinyección 1	133	0	2.71	0.00
Blanco_Reinyección 2	158	10	3.22	0.01

Tabla 9. Linealidad

Nivel de concentración	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Concentración nominal (ng/mL)	0.104	0.209	0.597	1.194	2.985	5.97	9.552	11.94
Curva 1								
Concentración recuperada (ng/mL)	0.114	0.212	0.583	1.148	2.854	5.655	9.884	12.102
% recuperación	109.62	101.44	97.65	96.15	95.61	94.72	103.48	101.36
Curva 2								
Concentración recuperada (ng/mL)	0.117	0.217	0.551	1.178	2.730	5.595	10.336	11.826
% Recuperación	112.50	103.83	92.29	98.66	91.46	93.72	108.21	99.05
Curva 3								
Concentración recuperada (ng/mL)	0.117	0.208	0.562	1.176	2.855	5.646	9.937	12.050
% Recuperación	112.5	99.52	94.14	98.49	95.64	94.57	104.03	100.92
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	0.116	0.212	0.565	1.167	2.813	5.632	10.052	11.993
% Recuperación promedio	111.54	101.59	94.70	97.77	94.24	94.34	105.24	100.44

LINEALIDAD ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

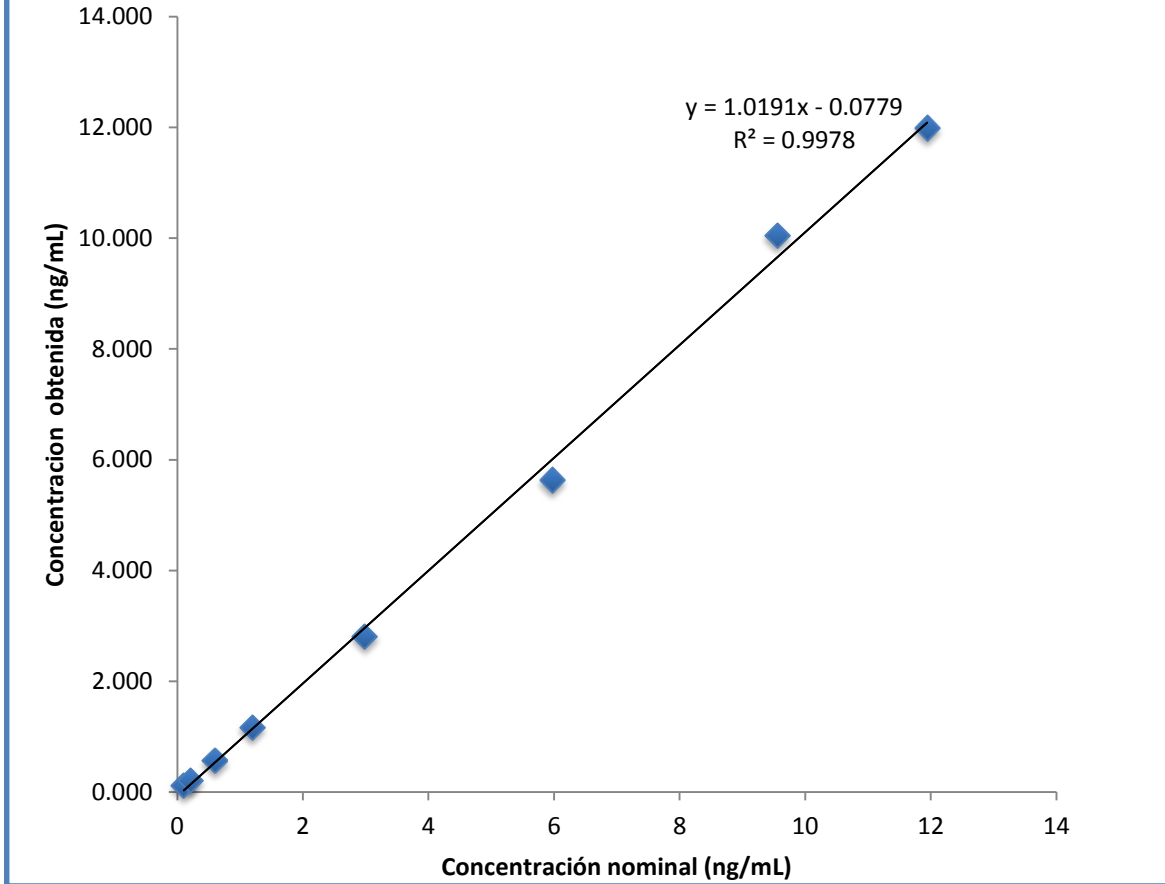


Figura 12. Gráfico de Linealidad

Tabla 10. Recobro de Acetato de Medroxiprogesterona

Medroxiprogesterona Acetato						
Muestra	Área					
	MCA_S	MCA	MCM_S	MCM	MCB_S	MCB
1	649337	427186	343113	238144	21278	15383
2	669294	424783	335901	211673	21065	12073
3	675034	445182	340399	236293	21426	13475
4	670511	429903	344741	218020	21350	13486
5	671673	438239	345850	227623	21482	13518
Promedio	667170	433059	342001	226351	21320	13587
D.E	10195.70	8466.76	3979.18	11449.73	162.15	1177.42
% CV	1.53	1.96	1.16	5.06	0.76	8.67
% Recuperado	64.91		66.18		63.73	

Tabla 11. Recobro de Progesterona D9

Progesterona D9						
Muestra	Área					
	MCA_S	MCA	MCM_S	MCM	MCB_S	MCB
1	233022	145582	240105	157472	241546	148150
2	232607	142171	233576	139259	239511	136892
3	231659	150329	229216	145780	239353	137367
4	238060	144468	228734	142593	241301	140223
5	237638	149365	241954	145775	238740	137103
Promedio	234597	146383	234717	146176	240090	139947
D.E	3013.00	3410.02	6098.44	6866.59	1253.73	4781.30
% CV	1.28	2.33	2.60	4.70	0.52	3.42
% Recuperado	62.40		62.28		58.29	

Tabla 12. Repetibilidad

Muestra	Concentración nominal (ng/mL)				
	MCA	MCM	MCB	LIC	MCD
	8.358	5.015	0.301	0.105	5.970
Concentración calculada (ng/mL)					
1	8.881	4.584	0.328	0.116	5.734
2	9.043	4.607	0.281	0.124	5.967
3	8.963	4.912	0.311	0.118	6.07
4	9.007	4.635	0.305	0.118	6.06
5	8.88	4.733	0.312	0.115	6.271
Promedio	8.9548	4.6942	0.3074	0.1182	6.0204
D.E	0.07351	0.13435	0.01704	0.00349	0.19475
%CV	0.82	2.86	5.54	2.96	3.23

Tabla 13. Reproducibilidad y Exactitud

Muestra	Concentración nominal									
	MCA		MCM		MCB		LIC		MCD	
	8.358		5.015		0.301		0.105		5.59	
	Conc. Obtenida	% Dev	Conc. Obtenida	% Dev	Conc. Obtenida	% Dev	Conc. Obtenida	% Dev	Conc. Obtenida	% Dev
1	8.881	106.26	4.584	91.41	0.328	108.97	0.116	110.48	5.734	102.58
2	9.043	108.20	4.607	91.86	0.281	93.36	0.124	118.10	5.967	106.74
3	8.963	107.24	4.912	97.95	0.311	103.32	0.118	112.38	6.070	108.59
4	9.007	107.77	4.635	92.42	0.305	101.33	0.118	112.38	6.060	108.41
5	8.880	106.25	4.733	94.38	0.312	103.65	0.115	109.52	6.271	112.18
Promedio	8.9548	107.140	4.6942	93.603	0.3074	102.126	0.1182	112.571	6.0204	107.699
D.E	0.07351	0.87947	0.13435	2.67887	0.01704	5.66053	0.00349	3.32652	0.19475	3.48384
%CV	0.82		2.86		5.54		2.96		3.23	
Muestra										
1	8.085	96.73	4.856	96.83	0.291	96.68	0.120	114.29	5.983	107.03
2	8.332	99.69	4.804	95.79	0.309	102.66	0.115	109.52	6.198	110.88
3	8.023	95.99	4.496	89.65	0.299	99.34	0.121	115.24	5.559	99.45
4	8.338	99.76	4.564	91.01	0.313	103.99	0.116	110.48	6.401	114.51
5	8.061	96.45	4.689	93.50	0.301	100.00	0.121	115.24	6.193	110.79
Promedio	8.1678	97.724	4.6818	93.356	0.3026	100.532	0.1186	112.952	6.0668	108.530
D.E	0.15424	1.84541	0.15308	3.05236	0.00865	2.87332	0.00288	2.74378	0.32004	5.72530
%CV	1.89		3.27		2.86		2.43		5.28	
Muestra										
1	7.806	93.40	4.448	88.69	0.299	99.34	0.108	102.86	6.013	107.57
2	7.781	93.10	4.387	87.48	0.289	96.01	0.109	103.81	5.514	98.64
3	7.966	95.31	4.452	88.77	0.292	97.01	0.107	101.90	6.117	109.43
4	7.981	95.49	4.270	85.14	0.285	94.68	0.108	102.86	5.890	105.37
5	7.924	94.81	4.626	92.24	0.302	100.33	0.116	110.48	6.043	108.10
Promedio	7.8916	94.420	4.4366	88.467	0.2934	97.475	0.1096	104.381	5.9154	105.821
D.E	0.09238	1.10530	0.12889	2.57018	0.00702	2.33269	0.00365	3.47325	0.23886	4.27299
%CV	1.17		2.91		2.39		3.33		4.04	
Max		108.20		97.95		108.97		118.10		114.51
Min		93.10		85.14		93.36		101.90		98.64

Tabla 14. Efecto matriz

MCA				MCB			
Muestra	Respuesta extraída	Respuesta solución	Factor matriz	Muestra	Respuesta extraída	Respuesta solución	Factor matriz
P-001_MCA 1	3.0522	2.9055	1.0505	P-001_MCB 1	0.1101	0.0978	1.1258
P-001_MCA 2	3.0948	2.9296	1.0564	P-001_MCB 2	0.1035	0.0985	1.0508
P-001_MCA 3	3.1059	2.8154	1.1032	P-001_MCB 3	0.1042	0.0954	1.0922
P-002_MCA 1	3.1958	2.9055	1.0999	P-002_MCB 1	0.1069	0.0978	1.0930
P-002_MCA 2	3.1683	2.9296	1.0815	P-002_MCB 2	0.1072	0.0985	1.0883
P-002_MCA 3	3.0677	2.8154	1.0896	P-002_MCB 3	0.1108	0.0954	1.1614
P-003_MCA 1	2.9353	2.9055	1.0103	P-003_MCB 1	0.1054	0.0978	1.0777
P-003_MCA 2	2.996	2.9296	1.0227	P-003_MCB 2	0.1042	0.0985	1.0579
P-003_MCA 3	3.0302	2.8154	1.0763	P-003_MCB 3	0.1119	0.0954	1.1730
P-004_MCA 1	3.0288	2.9055	1.0424	P-004_MCB 1	0.1075	0.0978	1.0992
P-004_MCA 2	3.2596	2.9296	1.1126	P-004_MCB 2	0.1023	0.0985	1.0386
P-004_MCA 3	3.0959	2.8154	1.0996	P-004_MCB 3	0.1091	0.0954	1.1436
P-005_MCA 1	3.0155	2.9055	1.0379	P-005_MCB 1	0.1033	0.0978	1.0562
P-005_MCA 2	3.0555	2.9296	1.0430	P-005_MCB 2	0.1108	0.0985	1.1249
P-005_MCA 3	3.0942	2.8154	1.0990	P-005_MCB 3	0.1047	0.0954	1.0975
P-006_MCA 1	3.1863	2.9055	1.0966	P-006_MCB 1	0.1063	0.0978	1.0869
P-006_MCA 2	3.1425	2.9296	1.0727	P-006_MCB 2	0.0962	0.0985	0.9766
P-006_MCA 3	3.1258	2.8154	1.1103	P-006_MCB 3	0.1179	0.0954	1.2358
P-007_MCA 1 (Lipemia)	2.9291	2.9055	1.0081	P-007_MCB 1 (Lipemia)	0.1045	0.0978	1.0685
P-007_MCA 2 (Lipemia)	3.0006	2.9296	1.0242	P-007_MCB 2 (Lipemia)	0.1058	0.0985	1.0741
P-007_MCA 3 (Lipemia)	2.9528	2.8154	1.0488	P-007_MCB 3 (Lipemia)	0.1016	0.0954	1.0650
P-008_MCA 1 (Hemólisis)	2.9779	2.9055	1.0249	P-008_MCB 1 (Hemólisis)	0.1038	0.0978	1.0613
P-008_MCA 2 (Hemólisis)	2.9222	2.9296	0.9975	P-008_MCB 2 (Hemólisis)	0.1015	0.0985	1.0305
P-008_MCA 3 (Hemólisis)	3.0259	2.8154	1.0748	P-008_MCB 3 (Hemólisis)	0.1046	0.0954	1.0964
P-009_MCA 1 (Heparina)	3.0648	2.9055	1.0548	P-009_MCB 1 (Heparina)	0.1096	0.0978	1.1207
P-009_MCA 2 (Heparina)	3.0427	2.9296	1.0386	P-009_MCA 2 (Heparina)	0.1077	0.0985	1.0934
P-009_MCA 3 (Heparina)	3.0525	2.8154	1.0842	P-009_MCA 3 (Heparina)	0.1075	0.0954	1.1268
		Promedio	1.0615			Promedio	1.0932
		SD	0.03424			SD	0.05036
		%CV	3.23			%CV	4.61

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

TUNING DE ANALITO Y ESTANDAR INTERNO

El estudio se llevó a cabo en un Espectrómetro de Masas/Masas Xevo TQ-S, con una interfase de Ionización de electrospray (ESI) en modo positivo, utilizando Nitrógeno como gas nebulizador y Argón como gas de colisión, los parámetros del detector son ajustados de acuerdo a las necesidades del analito (ver Tabla 3).

La relación m/z de Acetato de Medroxiprogesterona ha sido reportada previamente encontrando tres masas producto m/z 387>327, 387/123 y 387>97,¹⁷ también han sido reportadas las siguientes m/z 387.1>327.2, 387.1>309.2, 387.1>285.1, 387.1>267.2³⁵. La m/z determinada para el ion precursor al realizar el tuning de Acetato de Medroxiprogesterona fue de 387.22, utilizando cono de 2 y colisión de 13, bajo estas condiciones se obtiene un ion producto mayoritario y estable en 327.16. Progesterona D9 es utilizada como Estándar Interno, debido a la similitud estructural de las moléculas su m/z ha sido reportada en 324.3>100.1⁴³, también como 324.5>100.3⁴⁴ y 324.2>100.2⁴⁵, al realizar el tuning se obtiene una m/z del ion precursor de 324.19, utilizando cono de 2 y colisión de 21 el ion producto mayoritario y estable se presenta en 100. Estos resultados se muestran en las Figuras 1, 2, 3, y 4.

DETERMINACION DE CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Fase móvil

Se ha reportado como fase móvil el uso de mezclas binarias y terciarias entre las que se encuentran Ácido fórmico 1%: Metanol: Acetonitrilo (30:10:60 v/v/v), acetato de amonio 20 mM pH 4.0: Acetonitrilo (48:52 v/v) e hidróxido de amonio 0.1%: Acetonitrilo (gradiente).^{17, 35, 39} Al probar diferentes proporciones utilizando como fase móvil Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo, se observó buena forma de pico para las proporciones utilizada, estas pruebas también muestran que al incrementar la proporción de acuoso el pico incrementa su factor de capacidad, lo cual evita

interferencias con sus metabolitos por lo que este debe ser mayor a 1 y para cualquiera de las condiciones probadas se cumple este requisito; sin embargo, para obtener un método rápido se requiere de un tiempo de corrida corto por lo tanto se descarta la opción Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v; en el caso de la opción Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 30:70 v/v se observa inestabilidad de la línea base aproximadamente a tiempo 1.6 y 3.0 por lo tanto esta opción también es descartada, eligiendo de esta manera la cromatografía obtenida bajo las condiciones de Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 20:80 v/v. Figura 5.

- Columna cromatográfica.

Las columnas reportadas para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona en cromatografía de líquidos (CL) son C18^{17, 31, 34}, sin embargo existe una amplia gama de éstas, por lo que se decide comparar una columna de Acquity UPLC HSS C18 1.8 µm, 2.1 x 50 mm y una columna Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 3.5; ambas muestran resultados similares en cuanto tiempo de retención, forma de pico y el área obtenida; sin embargo, la elección de la columna Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 3.5 es debida al costo y la disponibilidad de este tipo de columnas. Figura 6.

RANGO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se propone un rango de calibración de 0.15 a 12 ng/mL basado en una administración intramuscular de Acetato de Medroxiprogesterona para la cual se han reportado un Cmax de 1.75 a 9 ng/mL.²¹

- Solución de reconstitución.

En métodos de Cromatografía de Líquidos en fase reversa, la fase móvil es utilizada como solución de reconstitución; sin embargo, cuando su composición comprende altos contenidos de solvente orgánico puede presentar inconvenientes en la precisión y exactitud del método debido a la evaporación de la solución de reconstitución, eso puede ser controlado disminuyendo la temperatura del

autosampler; sin embargo, modificar la composición de la solución incrementando la proporción de componente acuoso también es una opción, algunos estudios han demostrado que el incremento de acuoso en la solución de reconstitución en compuestos neutros mejora la forma de pico bajo condiciones de fase reversa,⁴¹ por lo que se analizó la forma de pico así como la precisión y exactitud del método al comparar la proporción de acuoso-orgánico en la solución de reconstitución comparando Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo en proporciones 20:80 v/v y 40:60 v/v; se elige la proporción Formiato de amonio 5mM: Acetonitrilo 40:60 v/v, debido a que mejora la exactitud para el límite de cuantificación, lo cual es ocasionado a una mejora en la forma de pico. Los resultados se muestran en la Tabla 4

- Ajuste de pH en la solución diluyente y solución de reconstitución

La bibliografía menciona que Acetato de Medroxiprogesterona muestra mayor estabilidad en un rango de pH de 4 a 5⁴², por esta razón se decide ajustar el pH a 4.5 para las soluciones Diluyente y Reconstitución, los resultados de este ajuste no muestran cambios significativos en la precisión y exactitud sin embargo, se considera importante ajustar el pH debido al incremento de proporción acuosa en la solución de reconstitución. Tabla 5.

- Soluciones de carga y muestras en solución

El rango de calibración se compone de 8 calibrantes y 5 puntos control, entre los cuáles se incluye la muestra que evalúa la dilución del método, estas soluciones son preparadas a partir de soluciones seriadas utilizando como solución diluyente Metanol: Formiato de Amonio 5mM pH 4.5 (80:20 v/v). Las muestras elución presentan un factor de concentración de 2 con respecto a las muestras plasmáticas.

EXTRACCIÓN LÍQUIDO- LÍQUIDO

- Preparación de las muestras plasmáticas

Las muestra plasmáticas son preparadas adicionando 10 µL de solución de carga en 190 µL de plasma libre de fármacos, por lo tanto el volumen de muestra de

proceso es de 200 μ L. El volumen de disolvente utilizado para la para la preparación de las muestras plasmáticas es menor al 5% con respecto al volumen total de la muestra plasmática⁶.

El tamaño de muestra a procesar se encuentra estrechamente ligado a la sensibilidad que se desea del método y del equipo de detección. Se han reportado métodos analíticos que con límites de cuantificación de 0.05 ng/mL, sin embargo el volumen de muestra plasmática a procesar es 1 mL³⁵; también se han reportado métodos que disminuyen el tamaño de muestra de proceso a 0.1 mL pero su límite de cuantificación es de 9 ng/mL³¹. Este método está diseñado para procesar un volumen de 0.2 μ L de muestra plasmática y el límite de cuantificación determinado fue de 0.105 ng/mL concentración suficiente para determinar el perfil farmacocinético.

- Prueba de solventes de extracción.

Acetato de Medroxiprogesterona ha sido extraído utilizando técnicas como líquido-líquido y fase sólida, los objetivos de utilizar estas técnicas es concentrar la muestra para obtener la sensibilidad deseada y disminuir el efecto matriz de las muestras extraídas.^{17, 35 y 39}

Se utilizó como primera opción extracción líquido- líquido probando éter etílico anhidro grado HPLC (100%), acetato de etilo grado HPLC (100%) y Hexano grado HPLC (100 Hexano%)³⁴. Hexano grado HPLC 100% mostro mayor eficiencia para extraer a Acetato de Medroxiprogesterona de la matriz biológica. Figuras 7 y 8.

- Modificador de pH en la muestra plasmática

En general un cambio en el pH para una extracción líquido- líquido puede modificar la solubilidad de compuestos orgánicos tal como productos provenientes de la matriz biológica.⁴⁰ Con el objetivo de determinar el efecto de acidificación en la técnica de extracción utilizando como extrayente Hexano 100%, se prueban diferentes volúmenes de una solución de Ácido fórmico 0.1% para determinar si este factor tiene algún impacto en la extracción. Los resultados mostraron una

interferencia en el tiempo de retención de Acetato de Medroxiprogesterona, sin embargo al incrementar el volumen de Ácido fórmico 0.1%, tanto la interferencia como el analito incrementan su respuesta, por tanto, se decide utilizar un volumen de 10 µL de Ácido fórmico 0.1% para incrementar el área del analito y modificar el efecto de posibles componentes de la matriz biológica, sin afectar la selectividad del método. Figuras 9 y 10.

ROBUSTES DEL MÉTODO ANALÍTICO

- Selectividad

El método desarrollado demuestra selectividad al evaluar 6 lotes de plasma, 1 lote de plasma lipémico y 1 lote de plasma hemolizado utilizando como anticoagulante EDTA K2, así como a Citratos como anticoagulante, los resultados muestran interferencias menores al 20 % para el Acetato de Medroxiprogesterona y del 5% para Progesterona D9, ambos con respecto al límite de cuantificación.⁶ Tabla 7.

- Acarreo

El equipo no muestra acarreo al re-inyectar un blanco de plasma después de la inyección del Límite superior de cuantificación, según los datos presentados en la Tabla 8.

- Linealidad

La linealidad fue demostrada, con 3 curvas de calibración cumpliendo con la concentración recuperada del 15% con respecto a la concentración nominal para cada nivel de concentración y menor al 20% para el límite de cuantificación.⁶ La curva de calibración fue lineal en un rango de 0.104 a 11.94 ng/mL, utilizando una ponderación 1/x. Tabla 9 y Figura 12.

Recobro

El recobro analizando en muestras procesadas para los niveles MCA, MCM y MCB para ser comparadas con muestras en solución de las mismas concentraciones, mostro un recobro total de 64.94% para Acetato de Medroxiprogesterona y de 60.99% para Progesterona D9. Tablas 10 y 11.

- Precisión y exactitud
 - o Repetibilidad

El método es repetible, ya que al analizar por quintuplicado las muestras control LIC, MCB, MCM, MCA y MCD se obtuvo un % CV entre 0.82 a 5.54 para los puntos control MCB, MCM, MCA y MCD y de 3.23 para el LIC. Tabla 12.

- o Reproducibilidad

La reproducibilidad del método muestra un % CV entre 0.082 a 5.54 para los puntos control MCB, MCM, MCA y MCD y de 3.23 a 5.82 para el LIC.

- Exactitud.

La exactitud promedio obtenida se encuentra entre 85.14 a 114.51 para los puntos control MCB, MCM, MCA y MCD y de 101.90 a 118.10 para el LIC. Tabla 13.

- Efecto matriz

El método no muestra efecto matriz a los lotes evaluados (hemolisis, heparina, lipemia) ya que presenta ya que se obtiene un %CV del Fm de 3.23 y 4.61 para el MCA y MCB respectivamente. Tabla 14

11. CONCLUSIONES

- Los parámetros de detector, así como las condiciones cromatográficas determinadas permiten la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona y su Estándar Interno (Progesterona D9), tanto en solución como en muestras plasmáticas procesadas.
- Las mejores condiciones cromatográficas encontradas son utilizando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm, 3.5 μ m a una temperatura de 35°C, con una Fase móvil binaria de Formiato de Amonio 5mM pH 4.5 con Acetonitrilo grado LCMS en proporción 20: 80 v/v a un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 2.0 μ L.
- Para una dosis IM de 150 mg de Acetato de Medroxiprogesterona, el método propuesto es lineal, preciso y exacto el intervalo de concentración de 0.105 a 12 ng/mL
- El mejor solvente de extracción para Acetato de Medroxiprogesterona y Progesterona D9 es Hexano al 100%, utilizando 10 μ L de ácido fórmico 0.1% como pretratamiento de la muestra plasmática.
- Se obtiene un método robusto el cual de acuerdo a la información obtenida durante el desarrollo puede ser validado para la cuantificación de Acetato de Medroxiprogesterona plasma humano utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a detección Masas/Masas, de acuerdo a los requerimientos de la NOM 177-SSA 1-2013.

12. REFERENCIAS

1. Gary D. Christian. Química Analítica. 6ª ed. Mexico: Mc Graw Hill; 2009. pp 1 – 19.
2. F. Burriel Martí, F. Lucena Conde, S. Arribas Jimeno, J. Hernández Méndez. Química Analítica Cualitativa. 18ª ed. España: Thomson; 2008. pp 3 – 39.
3. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis Instrumental. 6ª ed. México: CengageLearning; 2008. pp 4 – 25, 816- 851.
4. Vinod P. Shah, Kamal K. Midha, John W. A. Findlay, Howard M. Hill, James D. Hulse, Iain J. McGilveray, Gordon McKay, Krys J. Miller, Rabindra N. Patnaik, Mark L. Powell, Alfred Tonelli, C. T. Viswanathan, and Avraham Yacobi. Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. Pharmaceutical Research. 2000, 17 (12). pp1551 – 1557.
5. Flores JF, Castañeda G, Medina Santillan R. Biodisponibilidad y Bioequivalencia de los Medicamentos Genéricos. México: Asclepius XXI. pp39 – 53.
6. Norma Oficial Mexicana NOM- 177- SSA 1-2013, 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 de Intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de Biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas Biocomparabilidad. (10 de Abril del 2013).
7. Alfonso R. Gennaro. Remington Farmacia. 20ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana 2003. V. 1, pp 718 – 763.
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10ª ed. México D.F: Secretaria de Salud 2011. Vol. I y II.
9. M. C. Gutiérrez. La cromatografía líquida: Aplicación de la TLC a la separación de colorantes. Universidad Politécnica de Catalunya. Boletín Intexter 2002. No. 122.

10. Daniel C. Harris. Análisis químico cuantitativo. 3ª ed. México. Editorial Reverté. 2003. pp 607-639
11. Michael E. Swartz, Ph. D. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. Massachusetts. Waters Corporation. 2005. Separation Science Redefined. pp 8 – 14.
12. Jeevan K. Prasain. Tandem Mass Spectrometry- Applications and Principles [Monografía de internet]. InTech Journals. Croatia. February 29, 2012 [20 de febrero 2014].
13. Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. López- Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Rev. Toxicol. 2005 22:7-14.
14. Pfizer. PROVERA / PROVERA (medroxyprogesterone acetate) Products Monograph. Canada. Pfizer Canada 2011.
15. Drug Bank [base de datos en internet]. Genome Alberta & Genome Canadá, Canadá 2011 [fecha de acceso 23 de febrero 2014]. Disponible en: <http://beta.drugbank.ca/drugs/DB00603>
16. Chemspider [base de datos en internet]. Royal Society of Chemistry 2014 [fecha de acceso 23 de febrero 2014] Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6043.html?rid=612c186a-76a9-4330-89bf-a63af642ac2d>
17. L Giannetti, D. Barchi, F. Fiorucci, E. Gennuso, P. Sanna, M Pallagrosi, B. Neri. High- Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry Validation of Medroxyprogesterone Acetate in Products of Pork Origin and Serum. Journal of Chromatographic Science Vol. 43, August 2005: 333- 336.
18. U. S. Food and Drug Administration [Base de datos]. U. S. Department of Health and Human Services [actualizada el 27 de febrero de 2014]. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020246s036lbl.pdf

19. Adolf E. Schindler, Carlo Campagnoli, René druckmann, Johannes Huber, Jorge R. Pasqualini, Karl W. Schweppe, Jos H. H. Thijssen. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 46 S1; 2003; S7-S16.
20. H. Kuhl. Pharmacology of Progestogens. *J. ReproduktionsmedEndokrinol.* 2011; 8, 157-176.
21. Thanee Tessiri, Jinda Wangboonskul, Chalerm Ruangviriyachai, Saksit Chanthai. High- Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection of Medroxyprogesterone Acetate in Human Plasma with 2,4- Dinitrophenylhydrazine as Derivatizing Agent and Solid- Phase Extraction for sample Clean- Up. *Research Article.* 2007; 33: 405 – 410.
22. H. Adlercreutz, PB Eriksern, MS Christensen. Plasma concentrations of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate after single oral administration to healthy subjects. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis;* 1983; 1(2): 153 – 162.
23. E. Utaaker. S. Lunddgren, s. Kvinnsland, A. Aakvaag. Pharmacokinetics and metabolism of medroxyprogesterone acetate in patients with advanced breast cancer. *Journal of Steroid.* 1988; 31(4): 437 – 441.
24. Hiroi M, Stanczyk FZ, Goebelsmann U. Brenner PF, Lumkin ME, Mishell DR. Radioimmunoassay of serum medrosyprogesterone acetate (provera) in women following oral and intravaginal administration. *Steroids.* 1975; 26(3): 373 – 386.
25. Cho MM, Hodis HN, Mack WJ, Roy S, Paulson RJ, Stanczyk FZ. Medroxyprogesterone acetate and progesterone, used short term, donot adversely affect forearm reactive hyperemia in postmenopausal women on estradiol therapy. *Int J. EndocrinolMetab.* 2008; 2: 63 – 69.
26. Su-hua FANG, Dan-li SUN, Hai-ying JIANG, Hong-ying LUO. Concentration Changes of Medroxyprogesterone Acetate in serum and milk in lactating woman who used DepoGeston. *Journal of Reproduction & Contraception* 2004; 15(3): 157-162.

27. PA Canney, M Dowsett, TJ Priestman. The pharmacokinetics of medroxyprogesterone acetate following two different loading dose schedules in advanced carcinoma of the breast. *Journal Cancer*. 1988; 58: 73-76.
28. E. Rossi, A. de Pascale, P. Negrini, A. Frigerio. Quantitative gas - liquid chromatographic determination of medroxyprogesterone acetate in human plasma. *Journal of Chromatography*. 1979; 169: 416 – 421.
29. MH Choi, KR Kim, DH Kim, BC Chung. Rapid and sensitive analysis of medroxyprogesterone acetate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatography*. 2001; 54 (11 – 12); 765 - 769.
30. DG Kaiser, RG Carlson, KT Kinton. GLC determination of medroxyprogesterone acetate in plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1974; 63 (3): 420 - 424.
31. S Uzu, K Imai, K Nakashima, S Akiyama. Determination of medroxyprogesterone acetate in serum by HPLC with peroxyoxalate chemiluminescence detection using a fluorogenic reagent, 4-(N, N-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1992; 10 (10 – 12): 979-984.
32. Peng Chifang, Xu Chuanlai, JinZhengyu, Chu Xiaogang, Wang Liying. Determination of Anabolic Steroid Residues (Medroxyprogesterone Acetate) in Pork by ELISA and Comparison with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry and Toxicology*. 2006; 71(1): C44 – C50.
33. MC Etienne, G Milano, M Frenay, N Renee, E Francois, A Thyss, M Shneider, M Namer. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Medroxyprogesterone Acetate in Advanced Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 1992; 10 (7): 1176 – 1182.
34. J Read, G Mould. Simple high- performance liquid chromatographic method for the determination of medroxyprogesterone acetate in human plasma. *Journal of Chromatography*. 1985; 341; 437 – 444.
35. Seong-Mo Kim, Dong-Hyun Kim. Quantitative determination of medroxyprogesterone acetate in plasma by liquid chromatography/

- electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001; 15: 2041 – 2045.
36. H. Adlercreutz, M Härkönen. Enzymatic assay of medroxyprogesterone acetate in plasma. *Journal of steroid biochemistry*. 1980; 13(5): 507 – 515.
37. Norma Oficial Mexicana NOM- 177- SSA 1-2008, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las Prueba. (18 de Noviembre 1998).
38. Dams S, Huestis MA. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation and Biofluid. *American Society for Mass Spectrometry*. 2003, 14 pp 1290-1294.
39. A Bronshtein, A Krol, H Schlesinger, M Altstein. Development of Immunological Methods for Purification and Detection of the Steroid Drug Medroxyprogesterone Acetate. *Journal of Environmental Protection*, 2012, 3, pp 624 - 639.
40. SL Prabu, TNK Suriyaprakash. *Applied Biological Engineering- Principles and Practice*. INTECH [publicado en línea el 23 de Marzo del 2012]. pp 479 – 506.
41. W Naidong, YL Chen, W Shou, X Jiang. Importance of injection solution composition for LC-MS-MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26; 2001; pp 753 – 767.
42. T Loftsson, J Baldvinsdóttir, AM Sigurdardóttir. The effect of cyclodextrins on the solubility and stability of medroxyprogesterone acetate and megestrol acetate in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol 98; 1-3, Agosto 1993, pp 225-230.
43. Rayco Guedes-Alonso, Zoraida Sosa-Ferrera and Jose Juan Santana-Rodríguez. An on-line solid phase extraction method coupled with UHPLC-MS/MS for the determination of steroid hormone compounds in treated water samples from waste water treatment plants. *Analytical Method*, 72015, pp 5996–6005.
44. Rajeswara Rao P and Someswara Rao K. Intra Subject Variability of Progesterone 200 mg Soft Capsules in Indian Healthy Adult Postmenopausal

Female Subjects under Fasting Conditions. Bioequivalence & Bioavailability.
Volume 6(4), 2014, pp 139-143.

45. Paal Methlie, Steinar Hustad, Ralf Kellma, Bjorg Alma's, Martina M Erichse, Eystein S Husebye, Kristian Lovas. Multiteroid LC–MS/MS assay for glucocorticoids and androgens and its application in Addison's disease. Endocrine Connections, 2, 2013, pp 125–136.