



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ISOTRETINOÍNA EN PLASMA HUMANO
MEDIANTE UHPLC ACOPLADO A MS/MS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JOSÉ ALFREDO CERVANTES VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. JUAN MANUEL JIMÉNEZ VARGAS

ASESOR:

Q.F.B. MIREYA GARCÍA CASAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2017





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.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme arropado en su seno desde que tenía 12 años en iniciación universitaria, por darme la oportunidad de crecer como persona y cumplir mi sueño de convertirme en profesionista egresado de la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por formarme como Q.F.B., porque dentro de sus instalaciones tuve la fortuna de conocer grandes profesionales y aún mejores personas.

A la Unidad de Farmacología Clínica Facultad de Medicina, UNAM, por otorgarme las facilidades y permitirme llevar a cabo este proyecto el cual me introdujo en un mundo totalmente nuevo para mí en el cual me pudiera desarrollar. Por darme la oportunidad de incorporarme laboralmente a esta gran institución.

Al Q.F.B. Juan Manuel Jiménez Vargas por dirigir y darme la oportunidad de realizar este proyecto, pero sobre todo por compartir toda tu experiencia y conocimientos, por no ser solo mi jefe, sino también mi amigo y alentarme a dar lo mejor de mí siempre. Gracias.

A la Q.F.B. Mireya García Casas, por sus asesorías, consejos, disposición y tiempo para orientarme en la elaboración de este trabajo.

A la Q.F.B. Alejandra Cortés López por ser mi mentora dentro del mundo de la bioequivalencia, por tu paciencia, disposición y consejos no solo en el ámbito profesional sino en el ámbito personal, por tu cariño, amistad y comprensión en todos los momentos de mi vida, no hay forma en que pueda pagarte todo lo que has hecho por mí. Te adoro con todo mi corazón.

A la Q.F.B. Aracely Pérez Zavala por tus consejos, amistad y apoyo para poder culminar esta etapa de mi vida.

Finalmente, a todo el jurado evaluador, por su disposición y observaciones para enriquecer este trabajo.



DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, por todas las bendiciones que me ha dado tal vez sin merecerlas, por darme la fuerza de seguir adelante y de seguir creyendo en mí a pesar de las muchas situaciones adversas que se presentaron.

A mi mamá, la Sra. Mercedes Villegas † (q.e.p.d), el motor de mi vida, la mujer que más he amado, quien siempre me cuidó y veló por mí en las peores situaciones de mi vida, quien con su amor, cariño y comprensión supo abrigarme cuando más lo necesité. Sin duda alguna tu partida ha sido el momento más doloroso y difícil de mi vida, pero a pesar de eso, pude cumplir la promesa que te hice en tu lecho de muerte. No hay día ni momento que no deje de pensar en ti, contigo se fue una parte de mí, pero me dejaste con tu ejemplo valores como la perseverancia y el trabajo. Espero que estés orgullosa en donde quiera que te encuentres, tanto como yo siempre lo he estado de ser tu hijo, todo lo que soy te lo debo a ti. Sabré que hice algo bien en este mundo si al finalizar mis días, Dios me permite reunirme contigo, será el mejor regalo que pudiese recibir. Este trabajo es totalmente tuyo... te amaré por siempre mamá.

A mi papá, el Sr. Alfredo Bernardino Cervantes, por luchar por mí y mi hermano todos los días, por todos los sacrificios y horas de trabajo que tuviste que emplear para que no nos faltara nada. Sé que mediante mi persona pudiste realizar el sueño que de joven por circunstancias de la vida no pudiste concretar. Ese sueño se ha vuelto realidad. Gracias por tu amor y apoyo siempre. Te amo.

A mi hermano Juan Carlos, por ser mi primer amigo en esta vida, porque a pesar de que muchos momentos de nuestra vida tuvimos diferencias, sabes que daría mi vida por ti, te amo hermano.

A mis abuelitos, Lupita y José Luis, a mis tíos, Consuelo, Julio, Norma, Paco y Erendira por confiar en mí siempre, por darme el aliento y apoyo para seguir adelante, pero sobre todo por todo su amor. Los amo.



A mi hermana Delia, por ser mi mejor amiga, por estar conmigo tanto en las buenas como en las malas, por regañarme, aconsejarme y entenderme siempre. Te amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Iván, Sergio, Isaac y Montse, por su amistad desde hace poco más de 12 años, porque a pesar de todo este tiempo nunca me han abandonado, sin su compañía no hubiese conocido el valor de la verdadera amistad y la hermandad.

A mis hermanos que conocí en mi estancia en la universidad, Abigail, Yadira, Jorge, Nayeli, Lizbeth, Claudia, Paty y Melvin porque me demostraron siempre su apoyo durante la carrera y sobre todo en el peor momento de mi vida, como les dije alguna vez, nunca sabré como pagarles tanto cariño, los amo.

A Fabiola, porque a pesar de que tengo poco tiempo relativamente de conocerte, siempre me has apoyado y me has dado aliento para seguir adelante, gracias por estar en todo momento a mi lado, te agradezco que sigas en mi vida, te quiero mucho sapita.

A mis ex compañeros de trabajo del Hospital Ángeles México, en especial a Brenda, Adrián, Alejandra, Angélica y Reyna, por darme ánimos, por confiar en mí, por las experiencias a su lado y sobre todo por su lealtad. Ustedes se han convertido en mi familia. Los llevo siempre en mi corazón.

A Aurora, por compartir esta gran experiencia de vida, sin tu amistad no hubiese sido lo mismo. A Antonio, por ser mi amigo desde hace tantos años y demostrarme que las verdaderas amistades están en los peores momentos de la vida. A Yanin por creer en mí y brindarme su amistad. A Adriana por alentarme a dar mi mejor esfuerzo en todos los aspectos de mi vida. A la Sra. Juanita por todo tu cariño y afecto, por tratarme como si fuese su hijo.

Y a todas las personas que han estado compartiendo algún momento de sus vidas conmigo. Este trabajo no es mío, es de ustedes y para ustedes.



ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCOTEÓRICO	3
1.1. Bioequivalencia	3
1.2. Isotretinoína	3
1.2.1. Generalidades	3
1.2.2. Propiedades físicas y químicas	4
1.2.3. Farmacodinamia	5
1.2.4. Farmacocinética	5
1.2.5. Presentación y dosis	7
1.2.6. Efectos adversos	7
1.2.7. Métodos analíticos empleados para la cuantificación de Isotretinoína	8
1.3. Importancia del desarrollo analítico	9
1.4. Generalidades de fluidos biológicos	9
1.4.1. Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos	9
1.4.2. Características de los fluidos biológicos	10
1.4.2.1. Sangre	10
1.4.2.2. Suero	11
1.4.2.3. Plasma	11
1.4.2.4. Orina	11
1.4.2.5. Saliva	12
1.4.3. Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos	12
1.4.3.1. Precipitación de proteínas	12
1.4.3.2. Precipitación por sales	13
1.4.3.3. Precipitación isoeléctrica	13
1.4.3.4. Precipitación con solventes orgánicos	13
1.4.3.5. Precipitación por agentes ácidos	13
1.4.3.6. Precipitación por metales pesados	14
1.4.3.7. Precipitación por calor y ácido	14



1.4.4. Extracción	15
1.4.4.1 Extracción líquido-líquido (LLE)	15
1.4.4.2. Extracción en fase sólida (SPE)	16
1.5. Desarrollo de métodos analíticos	17
1.6. Consideraciones generales de la cromatografía de líquidos como método de separación	18
1.7. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC)	21
1.8. Acoplamiento a detectores de espectrometría de masas	23
1.9. Validación de métodos analíticos en fluidos biológicos	27
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	30
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivos particulares	30
5. MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. Material, equipo, reactivos y sustancias de referencia.	31
5.1.1. Material.	31
5.1.2. Material biológico	32
5.1.3. Equipos e instrumentos	32
5.1.4. Reactivos	32
5.1.5. Sustancias de referencia	33
5.2 Metodología	33
5.2.1. Desarrollo del método analítico para la cuantificación de isotretinoína en plasma humano mediante UHPLC-MS/MS.	33
5.2.2. Detección por espectrometría de masas	34
5.2.3. Separación cromatográfica mediante UHPLC	35
5.2.3.1. Preparación de soluciones	35
5.2.4. Condiciones cromatográficas por UHPLC	35
5.2.5. Procedimiento de extracción a partir de plasma	36
5.3. Validación del método analítico para la cuantificación de isotretinoína	36
5.3.1. Preparación de las soluciones de referencia	36
5.3.2. Preparación de las soluciones de trabajo	37



5.3.3. Preparación de otras soluciones.	37
5.3.4. Preparación de la curva de calibración y puntos control en solución.	37
5.3.5. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.	38
5.3.6. Validación del método.	39
5.3.6.1 Adecuabilidad del sistema.	39
5.3.6.2. Selectividad del método.	39
5.3.6.3. Interferencia iónica.	39
5.3.6.4. Efecto Matriz.	40
5.3.6.5. Prueba de acarreo.	40
5.3.6.6. Linealidad del método.	41
5.3.6.7. Precisión del método.	41
5.3.6.7.1. Repetibilidad (precisión intradía).	41
5.3.6.7.2. Reproducibilidad (precisión interdía).	41
5.3.6.8. Exactitud.	42
5.3.6.9. Recobro absoluto.	42
5.3.6.10. Tolerancia.	42
5.3.6.11. Estabilidades de las soluciones.	43
5.3.6.11.1. Estabilidad de las soluciones estándar madre.	43
5.3.6.11.2. Estabilidad de las soluciones de trabajo.	43
5.3.6.12. Estabilidad de la muestra	44
5.3.6.12.1. Estabilidad de la muestra procesada.	44
5.3.6.12.2. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.	44
5.3.6.12.2. Estabilidad de la muestra en el automuestreador.	44
5.3.6.12.3. Estabilidad a ciclos de congelación/descongelación.	44
5.3.6.12.4. Estabilidad a largo plazo a congelación.	44
5.3.6.12.5. Estabilidad a muestra evaporada post-extracción.	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1. Desarrollo del método analítico.	46
6.1.1. Detección por espectrometría de masas y selección del estándar inteno.	46
6.1.2. Condiciones cromatográficas por UHPLC.	48



6.1.2.1. Columna cromatográfica y fase móvil.	48
6.1.2.2. Condiciones finales del método analítico.	49
6.1.2.3. Método de extracción.	49
6.2. Validación.	50
6.2.1. Adecuabilidad del sistema.	50
6.2.2. Selectividad del método.	50
6.2.3. Interferencia iónica.	54
6.2.4. Efecto matriz.	55
6.2.5. Prueba de acarreo.	56
6.2.6. Linealidad del método.	58
6.2.7. Precisión y exactitud.	60
6.2.7.1. Repetibilidad y exactitud.	60
6.2.7.2. Reproducibilidad y exactitud.	61
6.2.8. Recobro Absoluto.	63
6.2.9. Tolerancia.	65
6.2.10. Estabilidad.	66
6.2.10.1. Estabilidad de las soluciones estándar madre.	66
6.2.10.2. Estabilidad de las soluciones estándar de trabajo.	67
6.2.10.3. Estabilidad de la muestra procesada.	68
6.2.10.4. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.	69
6.2.10.5. Estabilidad en automuestreador.	70
6.2.10.6. Estabilidad a ciclos de congelación/descongelación.	70
6.2.10.7. Estabilidad a largo plazo a congelación.	71
6.2.10.8. Estabilidad de la muestra evaporada.	72
6.3. Resumen de la validación.	74
7. CONCLUSIONES.	77
PERSPECTIVAS.	77
8. REFERENCIAS.	78



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de isotretinoína.	4
Figura 2. Proceso de desarrollo de un fármaco.	9
Figura 3. Proceso de desarrollo de métodos analíticos.	18
Figura 4. Componentes de una columna cromatográfica.	20
Figura 5. Esquema de un equipo HPLC.	20
Figura 6. Gráfico de la forma simplificada de la ecuación de van Deemter.	23
Figura 7. Formación de gotas cargadas por ESI y fuente de ionización.	25
Figura 8. Esquema general de un detector.	26
Figura 9. Proceso general para el desarrollo del método analítico en UHPLC acoplado a MS/MS.	34
Figura 10. Procedimiento para desarrollar el método por espectrometría de masas.	35
Figura 11. Espectros representativos de la fragmentación de isotretinoína (a) y de acitretina (b).	48
Figura 12. Cromatogramas representativos de isotretinoína (a) y de acitretina (b).	49
Figura 13. Método de extracción final para la cuantificación de isotretinoína en plasma.	50
Figura 14. Gráfica de la concentración nominal contra la concentración recuperada.	59



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos analíticos para la cuantificación de isotretinoína en matriz biológica.	8
Cuadro 2. Matrices biológicas utilizadas en el desarrollo de métodos analíticos.	10
Cuadro 3. Métodos de desnaturalización y precipitación de proteínas.	14
Cuadro 4. Preparación de la curva de calibración y puntos control en solución.	38
Cuadro 5. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma	39
Cuadro 6. Condiciones finales de la fuente.	48
Cuadro 7. Parámetros dependientes de los analitos.	48
Cuadro 8. condiciones cromatográficas finales determinadas en el desarrollo del método analítico.	50
Cuadro 9. Adecuabilidad del sistema.	51
Cuadro 10. Selectividad del método.	52
Cuadro 11. Interferencia iónica a ácido salicílico.	55
Cuadro 12. Interferencia iónica a naproxeno.	55
Cuadro 13. Interferencia iónica a cafeína.	55
Cuadro 14. Interferencia iónica a paracetamol.	55
Cuadro 15. Efecto matriz.	56
Cuadro 16. Cromatogramas representativos en prueba de arrastre.	57
Cuadro 17. Linealidad del método.	58
Cuadro 18. Concentración recuperada en la linealidad del método.	59
Cuadro 19. Repetibilidad y exactitud.	60



Cuadro 20. Reproducibilidad y exactitud del químico analista 1.	61
Cuadro 21. Reproducibilidad y exactitud del químico analista 2.	62
Cuadro 22. Recobro absoluto para isotretinoína.	63
Cuadro 23. Recobro absoluto para acitretina.	63
Cuadro 24. Tolerancia del método.	64
Cuadro 25. Estabilidad de la solución madre de isotretinoína.	65
Cuadro 26. Estabilidad de la solución madre de acitretina.	65
Cuadro 27. Estabilidad de la solución de trabajo de isotretinoína.	66
Cuadro 28. Estabilidad de la solución de trabajo de acitretina.	66
Cuadro 29. Estabilidad de la muestra procesada.	67
Cuadro 30. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.	67
Cuadro 31. Estabilidad en el automuestreador.	68
Cuadro 32. Estabilidad de la muestra a 3 ciclos de congelación/descongelación.	69
Cuadro 33. Estabilidad de la muestra a largo plazo en congelación (-40° a -80°C).	69
Cuadro 34. Estabilidad de la muestra evaporada.	70
Cuadro 35. Resumen de validación.	71



LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
NOM	Norma Oficial Mexicana
USP	United States Pharmacopeia
ACN	Acetonitrilo
μL	Microlitros
mL	Mililitros
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
μg	Microgramos
\leq	Menor o igual
Cmax	Concentración máxima plasmática
DAD	Diode-array detector
CN	Ciano
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
LLE	Extracción líquido-líquido
T.R.	Tiempo de retención
SPE	Extracción en fase sólida
LIC	Límite Inferior de Cuantificación
PCB	Punto Control Bajo
PCM	Punto Control Medio
PCA	Punto Control Alto
C.V.	Coficiente de variación
D.E.	Desviación estándar
UV	Ultravioleta
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgo Sanitario
%DEA	Porcentaje desviación absoluta
r^2	Coficiente de determinación



INTRODUCCIÓN.

Existen factores que impiden que el efecto terapéutico de un medicamento no se alcance; entre ellos la variedad de preparaciones de las farmacéuticas, la cantidad de excipientes utilizados en la fabricación del medicamento, las distintas dosificaciones, entre otros. Esto provoca que en muchas ocasiones no se logre el efecto terapéutico deseado. Para demostrar que dos formulaciones del mismo principio activo son terapéuticamente similares (bioequivalentes) es necesario evaluar el perfil de biodisponibilidad, para lo cual es necesario cuantificar el fármaco y/o sus metabolitos en el fluido biológico que se encuentren en mayor concentración. Estos estudios, son realizados en instituciones y laboratorios autorizados por la Secretaria de Salud, quienes pueden contar con tres áreas; la unidad analítica, la unidad clínica y la unidad de gestión de la calidad.

En el área clínica, se lleva a cabo la selección de los individuos con características de salud específicas para participar en el estudio, además, se elabora el protocolo clínico, la administración del medicamento, el manejo de reacciones adversas que pudiesen presentar los individuos y la recolección de las muestras que se analizaran en la unidad analítica, la cual, lleva a cabo la investigación bibliográfica pertinente que servirá como base para el desarrollo de métodos analíticos que permitirán la cuantificación de fármacos y/o sus metabolitos en matriz biológica, posteriormente, son validados conforme a la normatividad vigente para ser empleados durante el periodo de monitorización en un estudio clínico. Todos estos procesos son verificados por la unidad de gestión de calidad, quien verifica que todo lo que se realiza dentro del tercer autorizado cumpla con los requerimientos establecidos y esté debidamente registrado.

El desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos toma gran relevancia, ya que en esta etapa, el químico analista debe emplear sus conocimientos y creatividad para desarrollar un método capaz de cuantificar el analito en cuestión. Además, no sólo resulta importante en la



realización de estudios clínicos, sino también en otros campos como la medicina forense, la medicina del deporte o la toxicología por mencionar algunos.

Es de suma importancia la validación de los métodos analíticos por diversas razones: es principalmente, un requerimiento exigido por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, además, sirve de instrumento para asegurar la calidad de los datos e implica un conocimiento detallado del proceso analítico desarrollado.

Por lo tanto, en el presente trabajo se desarrolló un método analítico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para la cuantificación de isotretinoína en plasma humano, empleando como método de extracción, líquido-líquido, y se validó según los criterios que establece la NOM-177-SSA1-2013 demostrando ser lineal, reproducible y exacto en un rango de concentración de 10-600 ng/mL.



1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Bioequivalencia.

El incremento de los costos de los medicamentos se ha convertido en un aspecto trascendente en la política sanitaria de muchos países comprometiendo los presupuestos de los sistemas de salud públicos y privados¹. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 la bioequivalencia se define como la relación entre dos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que, al ser administradas bajo condiciones similares, producen biodisponibilidades semejantes². Los efectos clínicos y el balance riesgo-beneficio de un medicamento no dependen exclusivamente de la actividad farmacológica de la sustancia activa. En Europa y en los Estados Unidos de Norteamérica la autorización de medicamentos genéricos descansa en la demostración de la bioequivalencia mediante estudios de biodisponibilidad comparada in vivo. En México, conforme a la Ley General de Salud, la Secretaría de Salud ejercerá las atribuciones de regulación, control y fomento sanitario a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), siendo una de sus funciones realizar el control de los medicamentos, esto, a través de instituciones autorizadas. Estos argumentos son imprescindibles para la autorización de la comercialización de los fármacos genéricos por parte de las autoridades sanitarias³.

1.2. Isotretinoína.

1.2.1. Generalidades.

La Isotretinoína (13-cis-ácido retinoico) es un retinoide sintético derivado del retinol (vitamina A). Se ha utilizado para tratar el acné grave común durante 20 años. Sin embargo, la isotretinoína también representa una opción potencialmente útil en muchas enfermedades dermatológicas distintas de acné vulgar, tales como: la psoriasis, la pitiriasis rubra pilaris, condilomas acuminados, cáncer de piel, rosácea, hidradenitis supurativa, granuloma anular, lupus eritematoso y el liquen

plano se han demostrado para responder a la inmunomodulador, actividades antiinflamatorias y antitumorales del medicamento. La isotretinoína también ayuda a prevenir cánceres de piel, como el carcinoma de células basales o carcinoma de células escamosas. Una combinación de la isotretinoína sistémica e interferón- α -2a puede proporcionar un efecto más potente que la isotretinoína sola, en la prevención y tratamiento de cánceres de piel. Además, puede ser considerada como un medicamento alternativo en algunas enfermedades dermatológicas que no responden a modalidades de tratamiento convencionales⁴.

1.2.2. Propiedades físicas y químicas.

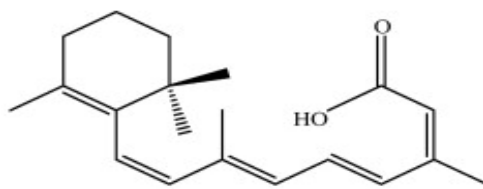


Figura 1. Estructura química de Isotretinoína⁵.

Fórmula condensada: $C_{20}H_{28}O_2$

Nombre químico: (2Z,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)nona-2,4,6,8-ácido tetraenoico.

Categoría química: Retinoide

Peso molecular: 300.43512 g/mol.

Apariencia: Polvo cristalino amarillento con tendencia a naranja-marón.

Punto de fusión: 174-175°C.

pka: 4.2.

Solubilidad: Insoluble en agua y poco soluble en alcohol⁶⁻⁷.



1.2.3. Farmacodinamia.

El mecanismo de acción de la isotretinoína no es totalmente conocido. Los retinoides ejercen sus efectos sobre las células diana mediante la unión y activación de receptores de retinoides nucleares. Existen dos tipos de receptores de retinoides: receptores del ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoides X (RXRs)⁸.

Después de la unión del ligando, los dímeros de RXR - RAR que se forman, son capaces de regular la expresión de genes implicados en el crecimiento y la diferenciación.

Los RARs son ligando reguladores de factores de transcripción que pertenecen a la súper familia de receptores nucleares que comprende 49 miembros del genoma humano. Mientras RXR son socios de dimerización promiscuos de varios otros receptores nucleares, RAR son activos in vivo sólo cuando se asocia con RXR.

Los receptores de retinoides pueden considerarse dianas terapéuticas en muchas enfermedades, tales como la hiperproliferación de la piel y cáncer. La isotretinoína es el fármaco más eficaz para reducir el tamaño de las glándulas sebáceas, que se logra in vivo por la disminución de la proliferación de sebocitos basales y la supresión de la producción de sebo, pero tiene poca afinidad por los RAR.

La Isotretinoína sistémica también se ha utilizado en el tratamiento de algunas enfermedades dermatológicas caracterizadas por la proliferación epidérmica.

El fármaco produce una inhibición profunda de la actividad de las glándulas sebáceas.

1.2.4. Farmacocinética.

La biodisponibilidad, el transporte de plasma, y la distribución de tejidos de diversos retinoides son determinados en gran parte por sus propiedades fisicoquímicas; algunos son extremadamente solubles en lípidos, mientras que otros son relativamente hidrofílicos. La isotretinoína no tiene la afinidad por la grasa, que es problemático para algunos otros retinoides. La biodisponibilidad de la isotretinoína oral es de aproximadamente 25%, el aumento de 1,5 a 2 veces con



alimentos. La isotretinoína se une preferentemente a la albúmina sérica, lo que reduce sus efectos inhibidores sobre los receptores de células epiteliales. El bloqueo de las interacciones de ácido retinoico albúmina con una fuente de ácido graso puede mejorar la biodisponibilidad de la isotretinoína y mejorar significativamente sus efectos terapéuticos in vivo. Después de 30 minutos el fármaco es detectable en la sangre y concentraciones máximas se alcanzan 1-4 horas después de la ingesta oral. El principal metabolito de la isotretinoína es 4-oxo-isotretinoína, que está presente en el plasma de 2 a 4 veces mayor concentración a las 6 horas después de una sola dosis. La isotretinoína atraviesa la placenta, y su alta actividad teratogénica se relaciona con esta transferencia placentaria.

La isotretinoína se metaboliza extensivamente y la concentración del metabolito supera a la del fármaco original con la administración a largo plazo. Sólo los restos de fármaco inalterado se eliminan por la orina. Los dos principales metabolitos de la isotretinoína (conjugados glucurónidos 4-oxo-isotretinoína y 16-hidroxi-isotretinoína) son detectables en la bilis. La excreción se produce en heces después de la conjugación o en la orina después del metabolismo. La vida media de eliminación de la isotretinoína es de hasta 20 horas. Sin embargo, se reportaron que las vidas medias eliminación de isotretinoína y su principal metabolito 4-oxo de 29 ± 40 horas y 22 ± 10 horas, respectivamente.

La concentración plasmática (C_{max}) para isotretinoína es de 208 ± 92 ng/mL y para su metabolito 4-oxo es de 473 ± 171 ng/mL después de una dosis oral de 30 mg administrada una vez al día hasta alcanzar un estado de equilibrio.

La concentración de isotretinoína es más bien baja en la epidermis. Después de suspender el tratamiento, desaparece del suero y la piel en un periodo de 2-4 semanas. Los niveles de retinol aumentan y los niveles de dihidrovitamina A disminuyen en algunos pacientes tratados con Isotretinoína⁹⁻¹².



1.2.5. Presentaciones y dosis.

En México, las formas farmacéuticas que se comercializan son las siguientes:

- Isotrex gel .05% tubo c/30 gr
- Roaccutan caps. 10 mg. caja c/ 30
- Roaccutan caps. 20 mg. caja c/ 30

La dosis inicial recomendada de la isotretinoína es de 1 a 2 mg / kg / día para 2 o más semanas, con una dosis máxima de 200 mg / día en los Estados Unidos, mientras que en Europa, Reino Unido y México, la dosis inicial es de 0,5 mg/kg/día. Posteriormente, la dosis se ajusta individualmente en función de la respuesta y la toxicidad, siendo reducida a la dosis efectiva más baja. En el acné, la duración habitual del tratamiento es de 15 a 20 semanas, aunque los cursos repetidos se pueden dar si es necesario. Cuando se administra por vía tópica la dosis va de una a dos aplicaciones diarias en capa delgada sobre el sitio afectado¹³.

1.2.6. Efectos adversos¹⁴.

Los efectos adversos más frecuentes asociados a la toma de Isotretinoína son:

- Aborto y anormalidades fetales: Hidrocefalia, microcefalia y alteraciones del oído externo.
- Alteraciones mucocutáneas: Quelitis (90%), fotosensibilidad, dermatitis facial, sequedad de piel y mucosas (80%), conjuntivitis (40%), y menos frecuentes pérdida de cabello (10%).
- Aumento de la VSG (40%), elevación del nivel de triglicéridos (25%), disminución de HDL-colesterol (16%), anormalidades transitorias de la función hepática (15%), y también se han descrito algunos casos de alteraciones del control de la glucemia en diabéticos.
- Síntomas mucoesqueléticos: Dolor de rigidez leves (16%). Se han descrito casos de hiperostosis en adultos y cierre prematuro de la epífisis en niños.



- Otros: Disminución de la visión nocturna, opacidades corneales, hipercalcemia, y pseudotumor cerebral.

1.2.7. Métodos analíticos empleados para la cuantificación de Isotretinoína.

En la literatura, existen varios métodos analíticos para cuantificar Isotretinoína en matriz biológica. Las condiciones de los métodos se resumen en la cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos analíticos para la cuantificación de isotretinoína en matriz

Columna	Condiciones cromatográficas	Matriz biológica	Procesamiento de muestra	Detector	Rango de cuantificación	Referencia
Superspher 100RP-18 endacapped 250x4mm.	Acetonitrilo: agua:acetato de amonio:ácido acético (600:300:60:10 v/v/v/v)	Plasma humano, rata, conejo, ratón y mono.	Precipitación de proteínas.	UV a 360nm.	0.3-100 ng/mL	15
Shimadzu Shim-pack VP-ODS C18.	Acetonitrilo: agua (90:10, v/v)	Plasma humano.	Extracción líquido-líquido.	MS-ESI.	10-1500 ng/mL	16
Suplex pKb-100 250x4.6mm, 5µm.	Ácido trifluoroacético-acetonitrilo (85:15 v/v)	Suero humano.	Extracción en fase sólida.	UV a 354 nm.	20-1000 ng/mL	17
Partisil PXS 10/25 ODS 250x4.6mm, 10µm.	Metanol-acetato de amonio 0.02M (50:50 v/v)	Sangre humana.	Extracción líquido-líquido.	UV a 365nm.	10-2000 ng/mL	18
LiChrosorb C18 250x3.2mm, 10µm.	Acetonitrilo:agua (80.20 v/v) con 1% de acetato de amonio.	Plasma humano.	Precipitación de proteínas.	UV a 350nm.	50-700 ng/mL	5
Poroshell 120 EC-C18 30x3.0mm, 2.7µm.	Metanol: acetonitrilo: solución ácida (76.5:1:22.5 v/v/v) (Ácido acético 2%+ tetrahidrofurano 5%)	Plasma humano.	Extracción líquido-líquido.	DAD	0.27-8.12 µg/mL	19
Partisil 10-ODS-2 25x4.6mm, 10µm.	Acetonitrilo 1%: acetato de amonio (65:35 v/v)	Plasma humano.	Extracción líquido-líquido.	UV a 350nm.	0.36-0.50 µg/mL	20
Spherisorb ODS-2 C18 100x4.6mm, 3µm.	Acetato de amonio 40 mM (pH5.75)-metanol (50:50 v/v)	Plasma humano.	Precipitación de proteínas.	UV a 350nm.	0.3-5000 nM	21
LiChrosorb SI-60 250x4mm, 5µm.	Hexano-diclorometano-dioxano (78:18:4 v/v/v)	Suero humano.	Extracción en fase sólida.	UV a 360nm.	1.5-3000 ng/mL	22
Nucleosil 100 200x4mm, 5µm.	n-hexano:2-propanol:ácido acético glacial (400:1:0.27 v/v/v)	Plasma humano.	Precipitación de proteínas.	UV a 350nm.	1-1000 ng/mL	23
Agilent Eclipse XDB C18 150x4mm, 5µm.	Acetonitrilo: ácido acético glacial al 0.5% (70.30 v/v)	Plasma humano.	Precipitación de proteínas.	UV a 350nm.	0.02-0.60 µg/mL	24



1.3. Importancia del desarrollo analítico.

Uno de los problemas de los tantos que enfrenta el químico analista, es encontrar un método analítico que permita la identificación y cuantificación de analitos de interés. El desarrollo analítico juega un papel importante en estos casos, ya que con su aplicación, se logran estrategias metodológicas que llevan a la creación, optimización y diseño de métodos analíticos.

1.4. Generalidades de fluidos biológicos.

1.4.1. Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

Anteriormente el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se aplicaba en la medicina forense. Sin embargo, su campo de aplicación ha crecido y actualmente ha tomado presencia en el desarrollo, investigación y comercialización de fármacos.

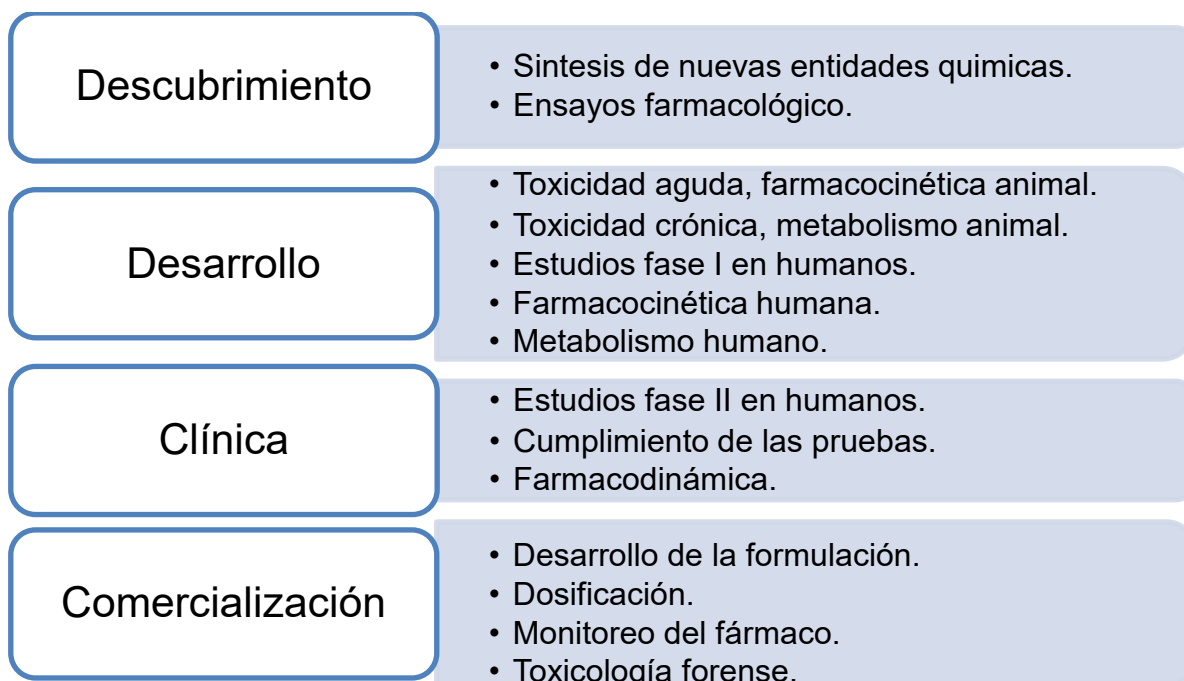


Figura 2. Proceso de desarrollo de un fármaco²⁶.



1.4.2. Características de los fluidos biológicos.

En los fluidos biológicos el fármaco de interés se puede encontrar rodeado de una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo con su determinación.

La selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos depende directamente de la farmacocinética del analito, ruta de eliminación, capacidad para unirse a proteínas y de los alcances del método.

El cuadro 2, se muestran las matrices biológicas en las que generalmente se cuantifican fármacos de interés.

Cuadro 2. *Matrices biológicas utilizadas en el desarrollo de métodos analíticos*²⁵

Muestras biológicas de mayor a menor grado de dificultad de análisis.	
Sólidos	Cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, musculo, hueso.
Mezclas	Plasma, suero, sangre, heces.
Líquidos	Líquido cerebro espinal, lágrimas, sudor, saliva, orina, bilis.

La sangre, el plasma, el suero y la orina son de los fluidos biológicos más comunes para el análisis de fármacos, debido a su naturaleza no invasiva en la recolección y su sencilla obtención y manipulación.

1.4.2.1. Sangre.

Es el tejido biológico más usado para la identificación y cuantificación de fármacos que presentan alta afinidad o permeabilidad a las membranas celulares de eritrocitos, linfocitos, etc. Consiste de un líquido amortiguado con proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Los eritrocitos son el



principal componente de la sangre y pueden separarse del componente líquido por centrifugación.

1.4.2.2. Suero.

Se deriva de la sangre a partir de la coagulación y posterior centrifugación, eliminando de esta forma las células y factores de coagulación presentes. El suero es comúnmente empleado para la cuantificación de fármacos cuando el analito no presenta afinidad por células ni por proteínas.

1.4.2.3. Plasma.

Al igual que el suero, es obtenido a partir de la centrifugación de la sangre a la que se le ha adicionado un anticoagulante. El plasma es suero que contiene fibrinógeno y factores de coagulación. En la cuantificación de fármacos, el plasma se utiliza cuando el analito presenta alta afinidad por proteínas.

1.4.2.4. Orina.

Es una mezcla constituida por sustancias solubles en agua. Generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos. El pH depende en gran medida de la dieta. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puede excretar en un intervalo de tiempo fijo, es importante la cantidad de fármaco excretada y no la concentración. Es comúnmente utilizado en estudios de farmacocinética y bioequivalencia, cuando la eliminación renal del fármaco inalterado es de cuando menos el 50%.



1.4.2.5. Saliva.

La determinación de medicamentos en saliva es conveniente, ya que es un muestreo no invasivo. La muestra es fácilmente recolectada y comparada con otras muestras biológicas los niveles de proteínas y de lípidos son bastante bajas, haciéndola dócil para la microextracción.

1.4.3. Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos.

El procesamiento de muestra, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, ya que debe ser de aplicación fácil, rápida, de bajo costo y debe eliminar la fuente principal de interferencias. Por esta razón es deseable que el procesamiento sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener de esta forma métodos rápidos, económicos y reproducibles.

Las técnicas tradicionalmente empleadas en el procesamiento de muestras son: precipitación de proteínas y extracción.

1.4.3.1. Precipitación de proteínas²⁵⁻²⁶.

Cuando los fármacos se encuentran unidos a las proteínas plasmáticas, se dificulta la cuantificación del analito por la baja concentración que existe en forma libre (no unida a proteínas). Este problema se resuelve con la destrucción física de esta unión que causa la liberación del fármaco, logrando obtener una solución acuosa libre de proteínas que suele ser analizada o sometida a otros procesos de extracción.



1.4.3.2. Precipitación por sales.

Generalmente, las sustancias de alto peso molecular pueden ser precipitadas por la adición de la solución por la adición de sales. Cuando una sal inorgánica como el sulfato de amonio, o el sulfato de sodio son agregadas a la solución que contiene proteínas la concentración efectiva de agua disponible para la proteína se reduce y la proteína es precipitada. Este proceso es conocido como saturación salina.

1.4.3.3. Precipitación isoeléctrica.

Las proteínas tienen una solubilidad mínima en su pH isoeléctrico. Muchas proteínas son fácilmente precipitadas de su solución por ajustes de pH cercano a su punto isoeléctrico por la adición de ácido o bases como puede ser el caso.

1.4.3.4. Precipitación con solventes orgánicos.

La adición de solventes orgánicos como la acetona y el alcohol, disminuye la constante dieléctrica del solvente y desplaza moléculas de agua asociadas a la proteína y disminuyendo su concentración en la solución. Este efecto tiende a disminuir la solubilidad de la proteína.

1.4.3.5. Precipitación por agentes ácidos.

La carga negativa de iones como ácido pícrico, ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico son agentes precipitantes. Estos agentes neutralizan las cargas positivas de las proteínas causando desnaturalización, resultando la precipitación de proteínas.



1.4.3.6. Precipitación por metales pesados.

Cuando las soluciones de acetato de plomo, nitrato de mercurio y otras sales de metales pesados son adicionadas a la solución con proteínas la interacción de los cationes con la carga negativa de los grupos de las proteínas, causa precipitación de éstas y muchas veces desnaturalización.

1.4.3.7. Precipitación por calor y ácido.

Las proteínas son fácilmente desnaturalizadas cuando son sometidas a un tratamiento con calor. Esto es, por que el calentamiento provoca desorganización de la cadena de péptidos. En la cuadro 3 se presentan distintas técnicas de precipitación y las ventajas y desventajas que ofrece cada una.²⁵⁻²⁶.

Cuadro 3. Técnicas de desnaturalización y precipitación de proteínas²⁵.

Desnaturalización y precipitación de proteínas presentes en suero y plasma para el análisis de fármacos	
Método	Comentario
Calentamiento a 90°C por 5-10 min.	No es muy eficiente, puede descomponer al analito.
Ciclos de congelación-descongelación.	No es muy eficiente, consume mucho tiempo.
Saturación con sulfato de amonio.	Moderadamente eficiente, alta concentración de sal en el sobrenadante, pH final alrededor de 7.0.
Sulfato de zinc/hidróxido de sodio.	Excelente eficiencia, pH al final de precipitación de 7. Puede llevarse a cabo a temperaturas bajas.
Ácido metafosfórico.	Excelente eficiencia, el pH ácido puede descomponer a la sustancia de interés.
Ácido perclórico.	Excelente eficiencia, el pH puede descomponer a la sustancia de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.
Ácido tricloroacético.	Buena eficiencia, el reactivo debe de permanecer frío y puede resultar difícil remover la sustancia de interés.
Etanol.	Se requiere de dos volúmenes para una desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido.
Acetonitrilo.	Se requiere de 1.5 volúmenes para desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido. Particularmente adecuado para HPLC.
Cloruro de amonio.	Es mejor que el sulfato de amonio para compuestos básicos.



Las ventajas de esta técnica en comparación con la extracción son:

- ✓ Rápido de realizar y de bajo costo.
- ✓ Se dispone de una gran cantidad de agentes precipitantes.
- ✓ No se requieren de equipos especiales en comparación de la extracción.

Algunos inconvenientes de esta técnica en comparación con la extracción son:

- ✗ Solo es efectivo para la remoción de proteínas, por lo que otros componentes endógenos de la matriz pueden interferir con el análisis.
- ✗ No concentra la muestra por lo que la sensibilidad en analitos a bajas concentraciones puede verse afectada.

1.4.4. Extracción²⁵⁻²⁶.

Para la purificación parcial de muestras de fluidos biológicos que contienen fármacos, el procedimiento más ampliamente utilizado es la extracción en un disolvente orgánico.

El fármaco necesita estar en su forma no ionizada para ser extraído por los solventes orgánicos de la solución acuosa. Por lo tanto, el pH de la fase acuosa debe ser ajustado, para asegurar que esto suceda.

El proceso de extracción consiste en aplicar la muestra en estado líquido a un sistema de disolventes (extracción líquido-líquido) o a un medio de adsorción (extracción en fase sólida), cada una de ellas se tratan a continuación.

1.4.4.1. Extracción líquido-líquido (LLE).

Por muchos años, la extracción líquido-líquido fue la técnica clásica para la preparación de muestras líquidas en análisis orgánico. El principio básico consiste en que el fármaco al encontrarse en su forma no ionizada, es afín a la fase orgánica. La completa remoción de un fármaco de interés hacia la fase orgánica



depende de varios factores, como el porcentaje de ionización dependiente del pH del medio y del pKa del fármaco, el volumen de las dos fases en la extracción y el número de extracciones realizadas.

Las ventajas de esta técnica en comparación con la precipitación son:

- ✓ Alta eficiencia (recobro alto).
- ✓ Las muestras resultan con menos interferencias.
- ✓ Aumento de la selectividad de un método.
- ✓ Confiere estabilidad a la muestra.
- ✓ Permite la concentración del analito de interés por lo que la sensibilidad en analitos a puede verse beneficiada.

Algunos inconvenientes de esta técnica en comparación con la precipitación son:

- ✗ El uso de grandes cantidades de solventes orgánicos, lo que conduce a un aumento en su costo considerable tanto en adquisición como en disposición.
- ✗ La formación de emulsiones durante el procedimiento de mezclado.
- ✗ La pérdida de tiempo durante la ejecución del procedimiento de evaporación.
- ✗ La coextracción de proteínas y de algunos otros componentes de la matriz.
- ✗ Operación lenta y tediosa.
- ✗ Depende de la habilidad del operador.

1.4.4.2. Extracción en fase sólida (SPE).

El principio de la extracción sólido-líquido es similar a la extracción líquido-líquido, involucrando la interacción de compuestos entre las dos fases. Esto es similar a la extracción líquido-líquido, donde el procedimiento de extracción consiste en agitar la muestra por un tiempo adecuado con un material absorbente adecuado (fase sólida). En la extracción en fase sólida, el analito, que será extraído se encuentra interaccionando entre la fase sólida y la fase líquida, con la finalidad de eliminar



posibles interferencias de la matriz. Los analitos pueden tener gran afinidad por la fase sólida que por la muestra matriz (retención o adsorción) y que subsecuentemente pueden ser removidos por elución con un solvente que tenga gran afinidad por el analito (elución o desorción). Los diferentes mecanismos de retención o de elución se deben a fuerzas intermoleculares entre tres componentes: el analito, los sitios activos en la superficie del absorbente y la fase líquida.

Las ventajas de la extracción en fase sólida son:

- ✓ Poco consumo de disolventes orgánicos.
- ✓ No presenta problemas de emulsiones.
- ✓ Posibilidad de automatización total.

Las desventajas de la extracción en fase sólida son:

- ✗ Depende de la habilidad del operador.
- ✗ Control en la velocidad de flujo.
- ✗ El cartucho puede obstruirse debido al volumen de la muestra utilizado.
- ✗ Se requiere de equipo especializado.

1.5. Desarrollo de métodos analíticos.

Antes de iniciar el desarrollo de un método analítico, se debe definir si es necesario analizar el fármaco y/o sus metabolito(s), o ambos para establecer el intervalo de concentraciones que debe cumplir el método analítico, debe conocerse la dosis que se administrará durante el estudio y su concentración plasmática esperada.

Para establecer una metodología analítica que permita la cuantificación de un analito en una matriz biológica para ser empleada en un estudio de biodisponibilidad, generalmente se siguen los siguientes pasos.

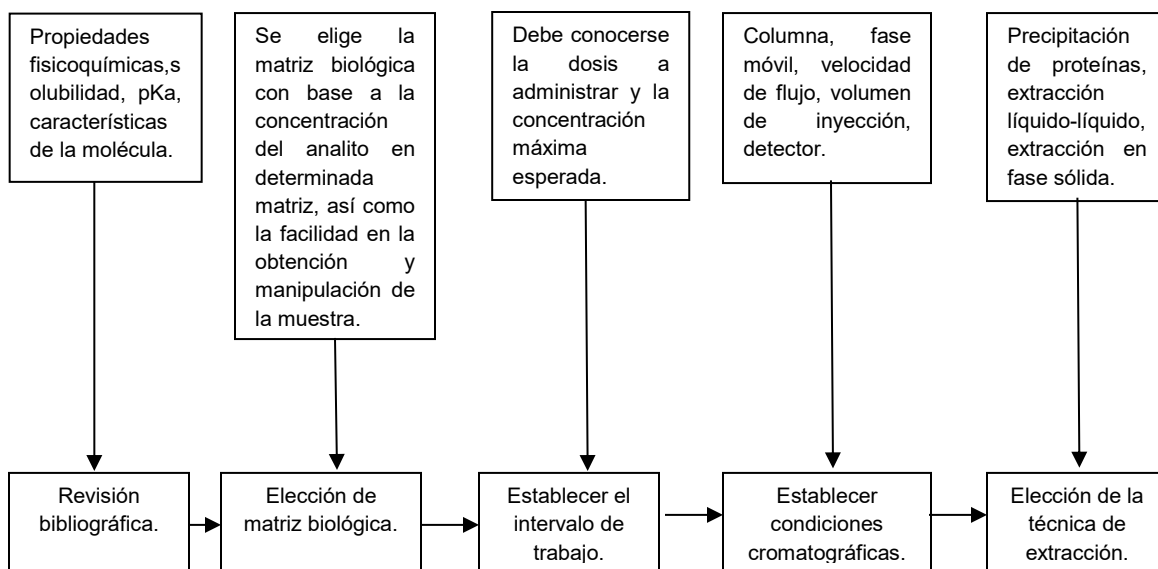


Diagrama 2. Proceso para desarrollar métodos analíticos por UHPLC²⁷.

1.6. Consideraciones generales de la cromatografía de líquidos como método de separación.

La medición y cuantificación de sustancias químicas es una parte vital de la ciencia. Esta no puede concebirse sin la existencia de la Química Analítica.

En esta disciplina a lo largo de la historia, se han desarrollado numerosas técnicas, tanto físicas como químicas, y unas mucho más versátiles y con un campo de aplicación más amplio que otras. Este es el caso de la cromatografía.

Los procesos cromatográficos implican en general, la distribución de un soluto entre dos fases, una de las cuales es la fase móvil y el otro la fase estacionaria.

La cromatografía es por lo tanto un método de separación que permite ya sea la identificación, separación o medición cuantitativa de algún compuesto.

En 1906 el botánico ruso Mikhail Tswett realizó diversos experimentos para separar pigmentos vegetales. Estos experimentos consistían en hacer pasar soluciones de pigmentos vegetales a través de tubos de vidrio rellenos de yeso pulverizado. Encontró que algunos pigmentos podían ser separados entre sí. De



hecho éstos aparecían como bandas coloreadas en los tubos. Debido a la separación de estas bandas coloreadas llamó a esta separación “método cromatográfico”. El término deriva del griego que significa escritura en color.

La Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una técnica de separación que se puede utilizar para el análisis de moléculas orgánicas e iones. Se basa en mecanismos de adsorción, intercambio iónico y partición, dependiendo del tipo de fase estacionaria utilizada. HPLC implica una fase sólida estacionaria, normalmente envasados dentro de una columna de acero inoxidable, y una fase móvil líquida. La separación de los componentes de una solución a partir de los resultados de la diferencia en las proporciones de distribución relativos de los solutos entre las dos fases, ya sea por intercambio iónico, por permeación en gel, adsorción según el tipo de fase estacionaria empleada.

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables: suministro de fase móvil, bombas de alta presión, sistema de inyección, columna y detector.

- 1. Sistema de suministro de fase móvil:** Contiene los disolventes elegidos para la separación cromatográfica filtrados y desgasificados.
- 2. Bombas:** Se encargan de succionar la fase móvil y tiene la capacidad para trabajar a altas presiones, lo que genera el caudal para realizar la mezcla de la composición de la fase móvil que se indique. Si la elución es isocrática (fase móvil constante) se utilizan un solo canal de disolvente. Si la elución es en gradiente (la composición de la fase móvil se va modificando a lo largo del tiempo durante la separación) normalmente se necesita una bomba con sistema de dosificación para cada uno de los eluyentes.
- 3. Sistema de inyección:** Se encarga de introducir y tomar volúmenes exactos de la muestra sin tener que parar el flujo. Son automáticos y de volumen variable.
- 4. Columna:** La columna analítica es el dispositivo en el cual se lleva a cabo el proceso de separación cromatográfica. Está constituida por el contenedor

y el material de empaque, cada uno de estos componentes influyen de manera significativa en la eficiencia del proceso de separación.

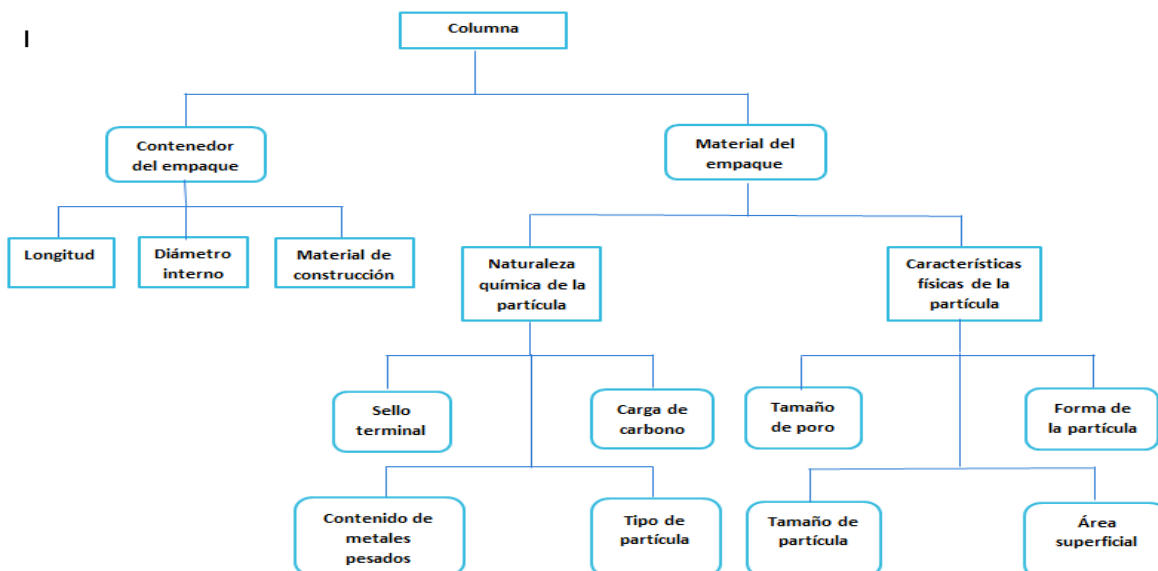


Figura 2. Diagrama de las características de una columna cromatográfica²⁶.

5. Detector: El detector responde a alguna propiedad característica de los compuestos a analizar. El cromatógrafo de líquidos se puede acoplar a diversos tipos de detectores como UV, fluorescencia, arreglo de diodos y más reciente espectrometría de masas. Estos transforman la señal en una respuesta gráfica en función al tiempo (cromatograma).

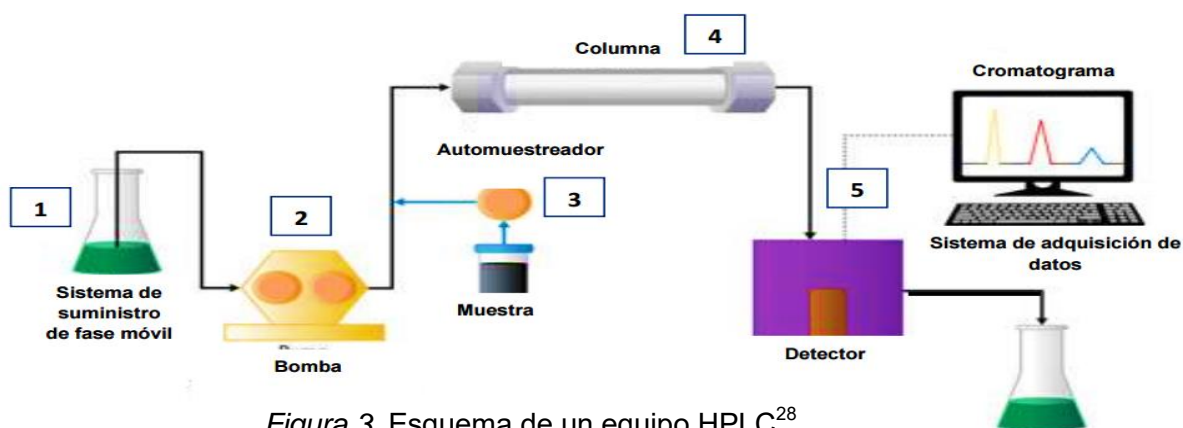


Figura 3. Esquema de un equipo HPLC²⁸.



1.7. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC).

El análisis por cromatografía de líquidos ha evolucionado constantemente con la finalidad de lograr separaciones más rápidas, sensibles y con un incremento en la resolución introduciéndonos a la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución por sus siglas en inglés).

La metodología de separación convencional mediante HPLC ofrece ventajas como la robustez, la facilidad de uso y la selectividad, sin embargo, su principal limitación es la falta de eficiencia debido a los bajos coeficientes de difusión en fase líquida y la lenta difusión de los analitos en la fase estacionaria.

Se distinguen dos factores principales que afectan directamente con la eficiencia de la columna cromatográfica, la longitud de la columna y el tamaño de partícula del empaquetamiento. De ahí, que uno de los avances que ha experimentado la cromatografía líquida en estos últimos años, ha sido obtener un aumento de la selectividad y resolución de pico mediante la disminución del tamaño de partícula a sub-2 μm . Teóricamente, según la ecuación de van Deemter se ha demostrado que al disminuir el tamaño de partícula es posible aumentar y mantener el número de platos teóricos de la columna, es decir, la capacidad resolutive de la columna, incluso aumentando la velocidad de flujo de la fase móvil. Esto se observa de mejor forma en la figura 4.

Esta nueva tecnología ha obligado a desarrollar instrumentación capaz de trabajar a altas presiones que generan estos flujos, mayores a las comunes con columnas cromatográficas de tamaño de partícula de 3 a 5 μm ; utilizar inyectores automáticos más rápidos y detectores con mayor velocidad de captura y medida. Por otro lado, este tipo de cromatografía de alta presión ha permitido trabajar con flujos de alta velocidad sin pérdida de resolución, pudiéndose establecer flujos de 300-800 $\mu\text{L}/\text{min}$ en comparación de los tradicionales 10-300 $\mu\text{L}/\text{min}$ con interfaces electrospray, disminuyendo considerablemente el tiempo de la cromatografía.

Debido a estas características, se ha etiquetado de diferentes formas a esta nueva aproximación de cromatografía líquida según la casa comercial: *Ultra Performance Liquid Chromatography* o *Ultra-Pressure Liquid Chromatography* (UPLC), *Rapid*



Resolution High Throughput (RRHT) o Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC); considerando finalmente como una etiqueta más imparcial y universal Ultra-High Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) ²⁹⁻³¹.

En definitiva, los beneficios de este tipo de cromatografía son muy interesantes y prácticos aumentando la resolución y sensibilidad además de disminuir el tiempo de trabajo, además, es una técnica que ha sido gradualmente adoptada por laboratorios industriales, especialmente por la industria farmacéutica.

El mecanismo de la separación puede describirse mediante la ecuación de Van Deemter, la cual describe la influencia del caudal en la fase móvil y la eficiencia de la columna. Esta ecuación relaciona la altura equivalente de plato teórico (H) con la velocidad lineal media de la fase móvil (v).

$$H=A+\frac{B}{v}+Cv$$

Se comprueba que para cada columna existe un caudal óptimo, correspondiente al mínimo de la curva representativa de la ecuación donde se obtiene la máxima eficacia de la separación.

A, B y C son constantes que contribuyen al ensanchamiento de banda disminuyendo la eficacia de la separación y se describen a continuación:

-Difusión turbulenta (A): Representa los distintos trayectos viajan las moléculas de un soluto en particular durante su paso a través de la columna.

-Difusión longitudinal (B/v): El soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona, cuanto menor es el caudal de fase móvil mayor es el ensanchamiento por difusión.

-Transferencia de masa (C/v): El soluto requiere cierto tiempo para transferirse entre ambas fases, cuando el caudal es demasiado rápido no puede alcanzarse el equilibrio.

Por lo tanto, es posible incrementar la resolución y la velocidad de análisis sin afectar el rendimiento cromatográfico empleando una nueva metodología de

análisis con una mayor capacidad de separación donde la eficiencia es proporcional a la longitud de columna e inversamente proporcional al tamaño de partícula.

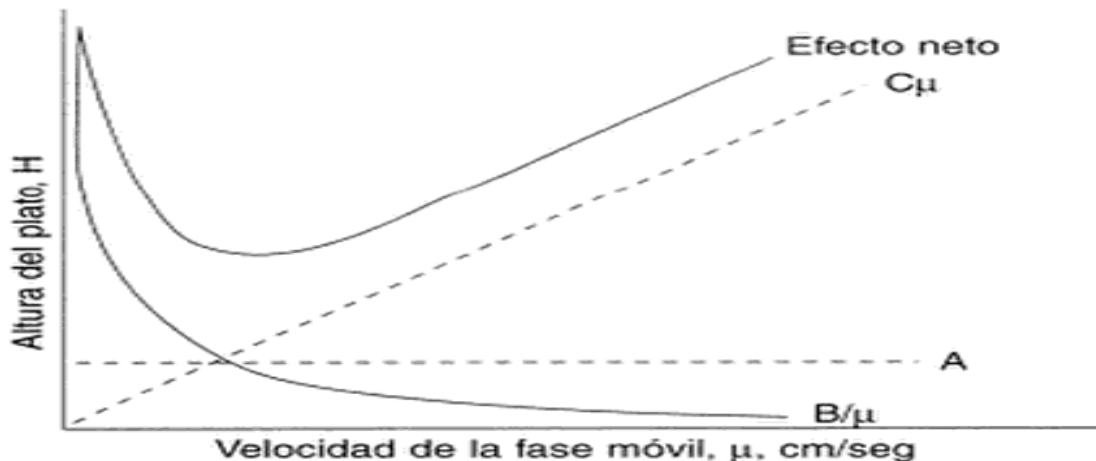


Figura 4. Gráfico de la forma simplificada de la ecuación de van Deemter³².

1.8. Acoplamiento a detectores de espectrometría de masas³³⁻³⁵.

Mientras la cromatografía de líquidos combina el poder de separación de diversas mezclas de compuestos con gran eficiencia, la espectrometría de masas tiene la capacidad de detectar selectivamente la identidad molecular del compuesto.

La asociación de ambas técnicas analíticas permite llevar a cabo análisis más sensibles y específicos en menor tiempo empleando un volumen menor de muestra.

La espectrometría de masas es una técnica analítica de alta sensibilidad y especificidad que permite determinar la composición molecular de una gran variedad de compuestos a través del análisis de iones determinando su relación masa-carga (m/z). Los compuestos ionizados son acelerados y seleccionados a través de un campo electromagnético en condiciones de vacío donde finalmente son detectados.

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas: el sistema de introducción de la muestra, la fuente de ionización, el analizador de iones y el detector.



- 1) **Introducción de la muestra:** La muestra puede provenir del sistema cromatográfico o bien a partir de la infusión lo que permite realizar el ajuste y la optimización del espectrómetro de masas.
- 2) **Fuente de ionización:** En esta se origina la transformación de los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones. La técnica de ionización a presión atmosférica mediante electrospray (ESI) permite el análisis de moléculas no volátiles y termolábiles mediante la formación de iones en solución mediante la aplicación de altos voltajes y un flujo de nitrógeno de manera que el eluyente se convierte en un aerosol cargado.

En general, ESI comprende tres etapas: formación de gotas cargadas, evaporación del solvente (fisión de la gota) y la formación de los iones en fase gaseosa. El flujo proveniente del cromatógrafo de líquidos entra en la interface a través del capilar mediante la aplicación de altos voltajes y en presencia de un gas de desolvatación de manera que el flujo se convierte en un aerosol cargado en función del potencial aplicado al capilar. El flujo de nitrógeno ayuda a la evaporación del disolvente a través de la fuente y como consecuencia las gotas emitidas por el capilar de electrospray disminuyen su tamaño mientras la carga de la gota permanece constante. La disminución del radio de la gota a carga constante supone un aumento de la repulsión de cargas en la superficie de la gota que supera la tensión superficial y produce la ruptura de esta. Esta secuencia se repite muchas veces formando gotas en forma de spray que dirigen a los iones a través del cono de muestra, cono de extracción y las lentes RF (octopolo) hasta el analizador mediante la aplicación de voltajes y diferencias de presión.

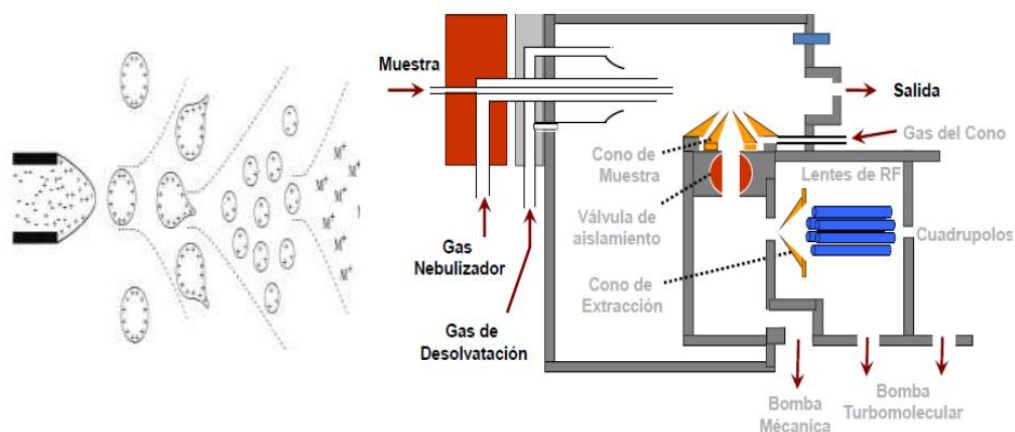


Figura 5. Formación de gotas cargadas por ESI y fuente de ionización³⁵.

- 3) **Analizador de iones:** Se trata del componente principal del espectrómetro. A pesar de existir diferentes analizadores. La estructura delimita una zona de vuelo a través de la cual los iones son acelerados adquiriendo una elevada energía cinética y durante este trayecto se separan según su relación masa/ carga (m/z).
- 4) **Detector:** Proporciona información sobre el flujo de iones que salen del analizador de masas. Convierte el flujo de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada y detectada por el fotomultiplicador y un dinodo de conversión de alto voltaje para conseguir alta sensibilidad, tanto en modo positivo como en modo negativo. Cada uno de los iones es detectado y representado en un espectro de masas de acuerdo a su abundancia relativa.

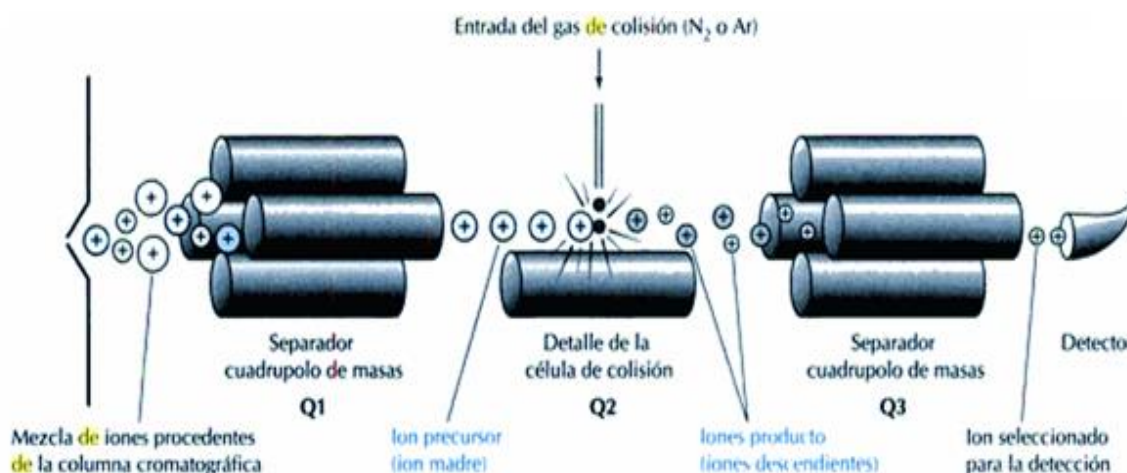


Figura 6. Fundamento de la espectrometría de masas tándem (MS/MS)³⁶.

Las ventajas que se obtienen al realizar análisis mediante UHPLC-MS/MS son:

- ✓ Selectividad, resolución y sensibilidad del equipo.
- ✓ Empleo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) como método para la cuantificación simultánea de diferentes compuestos.
- ✓ Incremento de la especificidad de la detección.
- ✓ Emplea menores volúmenes de muestra por análisis.
- ✓ Incrementa la relación señal/ruido, con lo cual los análisis son más sensibles y los límites de cuantificación alcanzan el orden de picogramos (pg).

Las limitaciones que se deben tomar en cuenta son:

- ✗ Si no hay una adecuada limpieza de la muestra se corre el riesgo de generar problemas de acarreo y/o supresión iónica que generan resultados imprecisos.
- ✗ El espectrómetro de masas no es compatible con fases móviles que contengan sales no volátiles.
- ✗ La disponibilidad es limitada.
- ✗ Formación de aductos.
- ✗ Se requiere de personal calificado para su manejo.



1.9. Validación de métodos analíticos en fluidos biológicos^{2, 37-45}.

La validación garantiza la calidad del método desarrollado, puesto que le confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el método cumpla con los parámetros de calidad establecidos.

Además, permite un conocimiento profundo del método, así como de sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad en el método analítico que ha sido validado, se traduce en: disminución en el número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados y consecuentemente cumplir los plazos previstos de análisis.

Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias contempladas por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013).

- a) **Linealidad:** A la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.
- b) **Precisión:** 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.
- c) **Repetibilidad:** A la precisión bajo las mismas condiciones de operación de un intervalo corto de tiempo.
- d) **Reproducibilidad:** A la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.
- e) **Exactitud:** A la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- f) **Selectividad:** A la capacidad del método analítico de diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.



- g) **Estabilidad:** A la capacidad de un fármaco, biofármaco o medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil.
- h) **Recobro:** Es la cantidad recuperada del analito de la matriz biológica comparada con la concentración del analito en el disolvente.
- i) **Efecto matriz:** Es un aumento o disminución no esperada de la respuesta de los analitos de interés, que se produce por la coelución de otros componentes presentes en la matriz extraídos de la muestra. El mecanismo exacto que justifica, no se ha definido, sin embargo se han mostrado tras una serie de experimentos, que es el resultado de una competición entre los componentes no volátiles de la matriz y los iones de los analitos para acceder a la superficie de las gotas y pasar a estado gaseoso.
- j) **Efecto o prueba acarreo:** El efecto del arrastre es un tipo de contaminación atribuido al remanente de la muestra analizada anteriormente que contiene una mayor concentración de analito que la muestra siguiente a esta. Representa uno de los problemas que compromete la exactitud y la precisión de los resultados. Este tipo de contaminación debe ser evaluado y eliminado durante el desarrollo del método ya que el remanente puede absorberse en los diversos componentes del sistema cromatográfico y comprometer los resultados durante la validación del método⁴¹⁻⁴².
- k) **Tolerancia:** Capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal⁴³.
- l) **Adecuabilidad del sistema:** La adecuabilidad del sistema se basa en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones de análisis y las muestras para ser analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar y establecer. Los parámetros serán determinados dependiendo del tipo de procedimiento que sea evaluado, resultando importantes en los procedimientos cromatográficos si las medidas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas⁴⁴⁻⁴⁵.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La dosificación de un medicamento de diferentes fabricantes representan gran diferencia al momento de evaluar su respuesta ante determinado tratamiento en los pacientes, es decir, se presenta mayor o menor absorción de las sustancias activas provocando fallas terapéuticas. Para poder determinar que dos formulaciones con el mismo principio activo son terapéuticamente equivalentes, es necesario evaluar el perfil de biodisponibilidad, para lo cual es necesario cuantificar el fármaco y/o sus diferentes metabolitos en los diferentes fluidos biológicos. Los estudios de bioequivalencia son la principal herramienta considerada para demostrar que un medicamento genérico cumple con las mismas características de calidad, seguridad y eficacia que un medicamento de referencia, considerando importante la intercambiabilidad de un medicamento por otro. En México, los estudios de bioequivalencia son realizados a través de las unidades clínicas y unidades analíticas de terceros autorizados, para realizar estudios de intercambiabilidad de medicamentos autorizados por la Secretaría de Salud.

El desarrollo de métodos analíticos es de vital importancia para la determinación y cuantificación de analitos en fluidos biológicos los cuales deben ser puestos a prueba mediante una validación, ya que con esto, se busca garantizar la confiabilidad y calidad de los resultados, proporcionando un alto grado de confianza y seguridad del método analítico, se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer, además de que no existe una farmacopea en el mundo que tenga una monografía que indique el método analítico de cuantificación de un fármaco o metabolito en fluido biológico.

Para tal caso está la isotretinoína medicamento que amerita un método analítico validado para ser empleado en un estudio de bioequivalencia y determinar así su intercambiabilidad y por lo tanto su seguridad y eficacia.



Que lo lleve a la comercialización en México, ya que su uso se ha extendido particularmente en tratar los tipos leves y moderados de acné, en el control de la seborrea, así como el foto daño, lo que aumenta el riesgo en la salud de quien lo usa, siendo las mujeres en edad reproductiva las principales consumidoras.

Con lo anterior, cabe preguntarse ¿el método analítico para cuantificar la isotretinoína en plasma humano mediante UHPLC acoplado MS/MS, lo hará dentro de los criterios planteados, así como demostrar su validez con base en la NOM-177-SSA1-2013.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El método desarrollado basado en la técnica analítica de Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas, permitirá cuantificar el fármaco isotretinoína, garantizando que el método será lineal, reproducible y exacto, una vez validado con la NOM-177-SSA1-2013 siendo útil para aplicarlo a un estudio de bioequivalencia.

4. OBJETIVO.

Desarrollar un método analítico para la cuantificación de isotretinoína en plasma humano utilizando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) acoplado a espectrometría de masas y validarlo con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 para ser empleado en un estudio de bioequivalencia.

4.1. Objetivos particulares.

- Establecer un rango de concentración que permita la cuantificación de isotretinoína en plasma humano.
- Establecer un método de extracción que permita la separación de la isotretinoína de los componentes del plasma.
- Establecer las condiciones cromatográficas adecuadas para la identificación y cuantificación de isotretinoína en plasma humano.



5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Lo correspondiente a la parte experimental comprende dos etapas, el desarrollo del método analítico, en el cual se buscaron las condiciones adecuadas para la extracción y cuantificación de isotretinoína y la validación del método en el cual se determina mediante varios parámetros que es lineal, reproducible y exacto.

5.1. Material, equipo, reactivos y sustancias de referencia.

5.1.1. Material.

- Matraz volumétrico de 2 mL.
- Matraz volumétrico de 10 mL.
- Matraz volumétrico de 250 mL.
- Matraz volumétrico de 500 mL.
- Probeta graduada de 50 mL.
- Probeta graduada de 100 mL.
- Vaso de precipitado de 20 mL.
- Vaso de precipitado de 25 mL.
- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Vaso de precipitado de 150 mL.
- Vaso de precipitado de 250 mL.
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L.
- Puntas para micropipeta de 5000 μ L.
- Puntas para micropipeta de 100 μ L.
- Placa de 96 pozos (wellplates) de 500 μ L, Agilent Technologies.
- Cubierta de silicón para placas de 96 pozos.
- Puntas combitips de 1, 5, 10, 25 y 50 mL.
- Microtubos.



5.1.2. Material biológico.

La matriz biológica utilizada en la validación del método es plasma humano, proporcionado por Alternativas Hematológicas S. A. de C.V. quien acredita que las muestras resultaron negativas en las pruebas de bioseguridad.

5.1.3. Equipos e instrumentos.

- Equipo HPLC acoplado a detector MS-MS, Agilent Technologies, modelo 6460.
- Detector, Agilent Technologies, G6460A.
- Horno, Agilent Technologies, G1316C.
- Bomba, Agilent Technologies, G4220A.
- Automuestreador, Agilent Technologies, G4226A.
- Generador de nitrógeno, Peak scientific, Gennius2 3010.
- Microcentrífuga, Hermle, Z216 MK.
- Micropipeta 1000-5000 μL , Brand, transferpette.
- Micropipeta 100-1000 μL , Brand, transferpette.
- Micropipeta 10-100 μL , Brand, transferpette.
- Micropipeta repetitiva, Eppendorf, Multipette Plus.
- Balanza analítica, Scientific, SM50.
- Balanza semi analítica, Adam, PW 254.
- Ultracongelador, Thermo Scientific, 88300.
- Refrigerador, Victor, VPC 10C.

5.1.4. Reactivos.

- Acetonitrilo, Merck, grado HPLC.
- Agua, Merck; grado HPLC.
- Formiato de amonio; J.T. Baker, Reactivo analítico.
- Metilterbutil éter, Merck, grado HPLC.
- Metanol, Merck, grado HPLC.



- Dimetil sulfóxido, J.T. Baker, Reactivo analítico.
- Alcohol isopropílico, Merck, grado HPLC.

5.1.5. Sustancias de referencia.

- Isotretinoína, estándar primario, 99.70%, USP, lote; R017X0.
- Acitretina, estándar primario, 99.80%, USP, lote; F0E266.
- Acetaminofén, estándar primario, 99.80%, USP; lote K0I244.
- Cafeína, estándar primario, 99.90%, USP; lote K0K210.
- Naproxeno, estándar primario, 99.90%, USP; lote J0H044.
- Ácido salicílico, estándar primario, 99.80%, USP; lote K0F112.

5.2. Metodología.

5.2.1 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de isotretinoína en plasma humano mediante UHPLC-MS/MS.

El desarrollo del método analítico mediante UHPLC-MS/MS, como lo muestra el siguiente esquema, involucró una serie de pasos lógicos y bien esquematizados que permitieron hacer ajustes fácilmente rastreables.

Como el primer punto se definió las condiciones de detección por espectrometría de masas en tándem, una vez definidas se procedió a desarrollar las condiciones de separación cromatográficas y finalmente desarrollar una metodología apropiada de extracción a partir de plasma humano.



Diagrama 3. Proceso general para el desarrollo del método analítico en UHPLC acoplado a MS/MS.

5.2.2. Detección por espectrometría de masas.

Se prepararon soluciones individuales de isotretinoína y de acitretina con una concentración de 100 ng/mL y 1000ng/mL respectivamente en metanol al 100%.

La fuente de ionización utilizada fue electrospray (ESI), la cual permite que los analitos puedan cargarse positivamente o negativamente para su análisis.

Cada uno de los fármacos se infundió en el modo positivo (ES+) y negativo (ES-) y se determinó su modo de ionización, masa del ion precursor y condiciones dependientes de la fuente (voltaje del capilar, voltaje del cono, temperatura y flujo del gas de desolvatación; así como el flujo del gas de cono). Estos parámetros permitieron caracterizar la señal precursora (ion padre).

Posteriormente se fragmento cada fármaco con un voltaje de colisión característico lo cual le confirió una alta especificidad en la detección para cada compuesto transición). Los fragmentos seleccionados para cada fármaco (ion hijo) provenían de la relación de señal más abundante a partir del ion precursor, las cuales debían mostrar un comportamiento gaussiano,

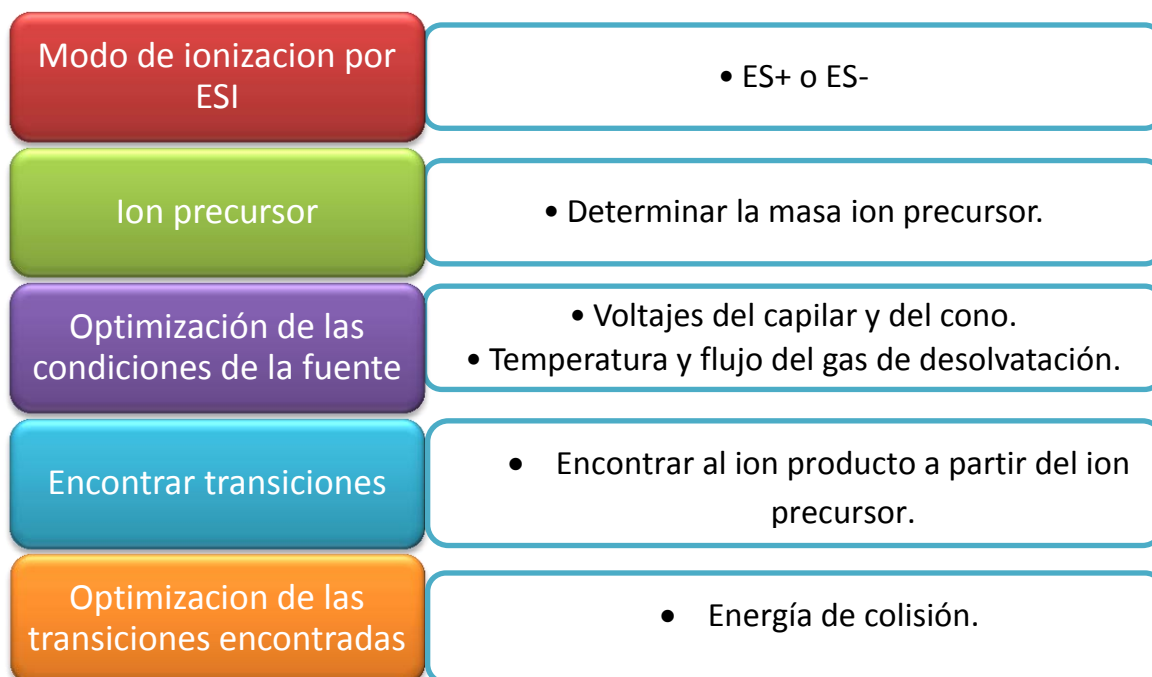


Diagrama 4. Procedimiento para desarrollar el método por espectrometría de masas.



5.2.3. Separación cromatográfica mediante UHPLC.

5.2.3.1. Preparación de soluciones.

- **Preparación de ácido fórmico al 0.2% v/v.**

Se midieron 500 μL de ácido fórmico y se colocaron en un matraz de 250mL, llevar al volumen con agua HPLC y mezclar.

- **Preparación de la solución de formiato de amonio 10mM.**

Se pesó aproximadamente 0.1664 g de formiato de amonio, los cuales fueron transferidos a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevaron a volumen de aforo con agua HPLC, mezclar.

- **Preparación de la solución de lavado ACN: agua: isopropanol: metanol 25:25:25:25 v/v.**

Se midieron por separado 250 mL de acetonitrilo HPLC y, 250 mL de agua HPLC, 250 mL de isopropanol HPLC, 250 mL de metanol HPLC y se transfirieron a un reservorio de 1000 mL donde se mezcló la solución.

5.2.4. Condiciones cromatográficas por UHPLC.

Las condiciones se establecieron mediante la elección de posibles candidatos a fase estacionaria y fase móvil. Esta elección se basó principalmente en la naturaleza y la estructura química de los analitos.

Se seleccionó la columna y el pH de la fase móvil donde se definieran mejor las señales cromatográficas, considerando la resolución de los picos cromatográficos, el tiempo de retención, así como la señal generada en el cromatograma para elegir las mejores condiciones para la separación cromatográfica.

Una vez elegidas ambas fases, se optimizó el gradiente mediante el ajuste del tiempo y la composición orgánica a partir de la elución de los compuestos así como el flujo de fase móvil, la temperatura de la columna el volumen de inyección.



5.2.5. Procedimiento de extracción a partir de plasma.

Para la selección de una metodología adecuada de extracción se tomaron en cuenta las características del plasma humano, sin perder de vista las propiedades fisicoquímicas de los analitos. El primer objetivo del proceso de extracción fue asegurar que mediante el procesamiento se eliminara la mayor cantidad de sustancias endógenas presentes en la matriz biológica para evitar que tuvieran un impacto perjudicial sobre el rendimiento analítico y que se obtuviera una señal adecuada una vez analizada en el equipo. Se realizaron pruebas de extracción por precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido, inclinándose por la extracción líquido-líquido debido a que las muestras procesadas presentaron una señal más alta en comparación a las procesadas mediante precipitación por proteínas.

5.3. Validación del método analítico para la cuantificación de isotretinoína.

5.3.1. Preparación de las soluciones de referencia.

- **Solución madre de Isotretinoína de 1 mg/mL (solución A).**

Se pesó el equivalente a 10 mg de Isotretinoína, los cuales fueron colocados en un matraz de 10mL, se disolvió y llevó a volumen con solución de metanol. La solución fue almacenada en refrigeración.

- **Solución de Acitretina de 1mg/mL (solución I).**

Se pesó el equivalente a 10 mg de acitretina, los cuales se disolvieron con 2 mL de Dimetilsulfóxido y se llevó a volumen con metanol. Se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se almacenó en refrigeración.



5.3.2. Preparación de soluciones de trabajo.

- **Solución de Isotretinoína de 100 µg/mL (solución B).**

Se tomaron 500µL de isotretinoína 1mg/mL, se llevó a volumen con ACN:formiato de amonio 70:30% v/v y se colocó en un matraz volumétrico de 10mL. Fue almacenada en refrigeración.

- **Solución de Acitretina de 15 µg/mL (solución II).**

Fueron tomados 75µL de Acitretina 1mg/mL los cuales se llevaron a volumen en un matraz de 5 mL con ACN:formiato de amonio 10mM 70:30% v/v.

5.3.3. Preparación de otras soluciones.

- **ACN:formiato de amonio 10mM 70:30 % v/v.**

Se midieron 70 mL de ACN y 30 mL de formiato de amonio 10 mM, se mezcló en un vaso de precipitado.

- **ACN:formiato de amonio 10mM 90:10 % v/v.**

Se midieron 90 mL de ACN y 10 mL de formiato de amonio 10 mM los cuales fueron mezclados en un vaso de precipitado.

5.3.4. Preparación la curva de calibración y puntos control en solución.

A partir de la solución de trabajo B de isotretinoína se tomaron 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 y 240µL para cada uno de los ocho puntos que conformaron la curva de calibración respectivamente, y 30, 100 y 180 µL para los puntos control, los cuales se agregaron a matraces volumétricos de 5 mL para el C1,C2 y PCB y a matraces de 2mL para los puntos restantes de la curva como para los PCM y PCA y aforándose con la solución de ACN:formiato de amonio 10mM 70:30 % v/v. Las concentraciones obtenidas son veinte veces mayor a la concentración en plasma y se muestran en el siguiente cuadro:



Cuadro 4. Preparación de la curva de calibración y puntos control en solución.

Muestras en solución					Alicuota de plasma de concentración final Isotretinoína (µL)
Muestra	Alicuota Sol. B Isotretinoína 100 µg/mL (µL)	Alicuota diluyente (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final Isotretinoína (ng/mL)	
CC1	10	4990	5000	200	50
CC2	20	4980	5000	400	50
CC3	40	1960	2000	2000	50
CC4	80	1920	2000	4000	50
CC5	120	1880	2000	6000	50
CC6	160	1840	2000	8000	50
CC7	200	1800	2000	10000	50
CC8	240	1760	2000	12000	50
PCB	30	4970	5000	600	50
PCM	100	1900	2000	5000	50
PCA	180	1820	2000	9000	50

5.3.5 Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.

Con base a las concentraciones finales en solución de isotretinoína, se tomaron 50µL de cada punto de la curva y de cada punto control, que fueron vertidos a un microtubo, adicionalmente se agregaron 950µL hasta obtener un volumen final de 1 mL. Las concentraciones finales se presentan en el siguiente cuadro (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.

Solución		Muestras en Plasma				Concentración final Isotretinoína (ng/mL)	Alicuota de plasma de concentración final Isotretinoína (µL)
Volumen final (µL)	Concentración final Isotretinoína (ng/mL)	Alicuota en plasma de concentración final Isotretinoína (µL)	Alicuota plasma (µL)	Volumen final en plasma (µL)	Concentración final en plasma (ng/mL)		
5000	2000	50	4990	1000	10	200	50
5000	4000	50	4950	1000	20	400	50
2000	2000	50	950	1000	100	2000	50
2000	4000	50	950	1000	200	4000	50
2000	6000	50	950	1000	300	6000	50
2000	8000	50	950	1000	400	8000	50
2000	10000	50	950	1000	500	10000	50
2000	12000	50	950	1000	600	12000	50
5000	600	50	4970	1000	30	600	50
2000	5000	50	950	1000	250	5000	50
2000	9000	50	950	1000	450	9000	50



5.3.6. Validación del método analítico.

5.3.6.1. Adecuabilidad del sistema.

Previo a cada corrida y con la finalidad de evaluar el sistema cromatográfico se realizó 6 inyecciones de forma consecutiva de 5 μ L de las soluciones de PCM en solución.

Criterios de aceptación: C.V. en TR \leq 2.0 % y C.V. en Área Relativa \leq 5 %.

5.3.6.2. Selectividad del método.

La selectividad del método fue determinada, analizando la muestra blanco del plasma (muestras de plasma de seis donadores y mezcla de plasma de estas muestras) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como Ac. Salicílico, Paracetamol, Naproxeno, Cafeína y el anticoagulante Heparina (143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de isotretinoína y de Acitretina. Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas.

Criterios de aceptación: Respuesta \leq 20% del Límite de cuantificación para el analito y respuesta \leq 5% para el estándar interno.

5.3.6.3. Interferencia iónica.

Se evaluó la interferencia iónica que pueden ejercer fármacos de uso común que impidan la cuantificación de forma precisa y exacta de isotretinoína en plasma. Se prepararon muestras por quintuplicado con la concentración del Punto Control Bajo (30 ng/mL).

Criterios de aceptación: C.V. \leq 15%, Desviación \leq 15%, cumplimiento \geq 80 % del total de puntos control.



5.3.6.4. Efecto matriz.

Se evaluó por triplicado el efecto matriz a 6 diferentes lotes de plasma y adicionalmente a plasmas lipémico, hemolizado y a plasma con heparina como anticoagulante, para lo cual se realizó la extracción de los blancos sin analitos, una vez realizada la extracción se adicionaron los analitos de interés a concentración del control bajo, medio y alto (post-extracción) y se compararon con muestras en solución a la misma concentración que las muestras post-extracción. La diferencia entre la respuesta relativa en las muestras post-extracción, dividida entre la respuesta relativa de las muestras en solución determinó el grado de efecto matriz normalizado. El efecto matriz normalizado debe ser constante en los plasmas evaluados.

Se determinó el efecto matriz normalizado promedio para cada unidad de matriz biológica. De acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto matriz normalizado} = \left(\frac{\text{Área relativa de muestra postextracción}}{\text{Área relativa de muestra en solución}} \right)$$

Criterios de aceptación: C.V. % Efecto Matriz Normalizado \leq 15%, 100% de cumplimiento.

5.3.6.5. Prueba de acarreo.

Se inyectaron blancos de reactivos una vez antes y dos veces posterior a la inyección del punto más alto de la curva de calibración. Con el fin de demostrar que el sistema de inyección no presenta arrastre de los analitos previo a una inyección de concentración alta de los analitos

Criterios de aceptación: Respuesta \leq 20% del Límite de cuantificación para el analito y respuesta \leq 5% para el estándar interno.



5.3.6.6. Linealidad del método.

La linealidad se evaluó analizando tres curvas de calibración durante tres días de análisis en el rango de 10.000 a 600.000 ng/mL y graficando la concentración nominal contra concentración recuperada (Isotretinoína/Acitreína).

Criterios de aceptación: % Desviación $\leq 20\%$ para el límite de cuantificación y $\leq 15\%$ para el resto de los puntos de calibración, 75% de cumplimiento del total de los puntos, al menos el 50% de los puntos por nivel de cumplir y $r \geq 0.99$.

5.3.6.7. Precisión del método.

La precisión fue evaluada como Repetibilidad (precisión intradía) y Reproducibilidad (precisión interdía).

5.3.6.7.1. Repetibilidad (precisión intradía).

Se analizaron por quintuplicado en un solo día las muestras con las concentraciones respectivas a los controles bajo, medio y alto, además del límite inferior de cuantificación y las muestras con factor de dilución 1:2 y 1:4.

Criterios de aceptación: C.V. $\leq 15\%$ por nivel de concentración, C.V. $\leq 20\%$ para el límite de cuantificación y % Cumplimiento = 100%.

5.3.6.7.2. Reproducibilidad (precisión interdía).

Se analizaron por quintuplicado las muestras con las concentraciones respectivas a los controles bajo, medio y alto, además del límite inferior de cuantificación, preparadas por pesada independiente durante tres días de validación.

Criterios de aceptación: C.V. $\leq 15\%$ por nivel de concentración durante los 3 días y % Cumplimiento = 100%.



5.3.6.8. Exactitud.

Se evaluó la exactitud de los resultados obtenidos en la prueba de Repetibilidad (Exactitud intradía) y de los resultados de Reproducibilidad (Exactitud interdía). Para lo cual se calcula el porcentaje de desviación absoluta, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desv abs} = \text{abs} \left[100 \times \left(\frac{\text{Concentración adicionada} - \text{concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right) \right]$$

Criterios de aceptación: % Desviación \leq 15% por nivel de concentración y % Cumplimiento = 100%.

5.3.6.9. Recobro absoluto.

Se procesaron muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en solución y de la misma forma en plasma.

Criterios de aceptación: Se aceptarán si no presenta más del 15% de desviación con respecto al valor obtenido.

5.3.6.10. Tolerancia.

Se evaluó modificando alguna de las condiciones establecidas en el método analítico, en este caso el volumen de inyección de 5 μ L a 2 μ L.

Criterios de aceptación: Los puntos control presenten menos del 15% de desviación absoluta con respecto a la concentración nominal y cumplan más del 80% de los controles por nivel, el promedio de la condición a evaluar no presenta una desviación mayor al 15% del promedio de la concentración obtenida de la condición original, además de la variación de las determinaciones por nivel de concentración es menor o igual al 15%.



5.3.6.11. Estabilidades de las soluciones.

5.3.6.11.1. Estabilidad de las soluciones estándar madre.

Las soluciones estándar de referencia de isotretinoína y acitretina se prepararon el día 09-Feb-2015 y se almacenaron en congelación. Después del periodo establecido para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar, se prepararon por quintuplicadas, muestras en solución a la concentración del control medio con las soluciones almacenadas y se compararon las áreas relativas obtenidas de cada analito con controles medios en sistema preparados con soluciones estándar de pasada reciente de los analitos.

Los criterios de aceptación son: por lo menos el 100% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta $\leq 15\%$ con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta $\leq 15\%$ del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 10%.

5.3.6.11.2. Estabilidad de las soluciones de trabajo

Las soluciones estándar de referencia de isotretinoína y Acitretina se prepararon el día 09-Feb-2015 y se almacenaron en congelación. Después del periodo establecido para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar, se prepararon por quintuplicadas, muestras en solución a la concentración del control medio con las soluciones almacenadas y se compararon las áreas relativas obtenidas de cada analito con controles medios en sistema preparados con soluciones estándar de pasada reciente de los analitos.



5.3.6.12. Estabilidad de la muestra.

5.3.6.12.1. Estabilidad de la muestra procesada.

Se evaluaron muestras por quintuplicado a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se almacenaron en refrigeración, el tiempo de estabilidad fue de 3.5 h.

5.3.6.12.2. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Se evaluaron muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado y se dejaron a temperatura ambiente protegidas de la luz, después del periodo que fue de 19.2h se procesaron.

5.3.6.12.3. Estabilidad de la muestra en el automuestreador.

Se evaluaron muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado y se colocaron en el automuestreador, después del periodo que fue de 10.4h se procesaron.

5.3.6.12.4. Estabilidad a ciclos de congelación/descongelación.

Se evaluaron muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica y se almacenaron en congelación (-40 a -80°C) por lo menos 12 horas, periodo después del cual se descongelaron, se congelaron nuevamente y se repitió el proceso hasta completar tres ciclos. Cumplidos los tres ciclos, las muestras se procesaron y se inyectaron al sistema cromatográfico.

5.3.6.12.5. Estabilidad a largo plazo en congelación.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica y se almacenaron en congelación (-40 a -80°C), una serie por quintuplicado de cada nivel de concentración, después del periodo de evaluación se descongelaron las muestras y se procesaron para ser inyectadas en el sistema cromatográfico.



5.3.6.12.6. Estabilidad a muestra evaporada post-extracción.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica, se procesaron con base a la metodología hasta la evaporación de la muestra, las muestras evaporadas permanecen durante un periodo sin ser reconstituidas, posterior a este tiempo se procedió a reconstituir y a inyectar al sistema cromatográfico¹.

¹ Los criterios de aceptación son los mismos para todas las estabilidades evaluadas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1.1. Desarrollo del método analítico.

Debido a la creciente demanda para emplear y desarrollar metodologías analíticas con una mayor sensibilidad, así como la necesidad de reducir tiempos de análisis en la determinación de diferentes fármacos que se emplean como terapia, el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a detectores de espectrometría de masas se ha convertido en el método analítico más adecuado permitiendo el análisis simultáneo de fármacos en diversas matrices con gran especificidad.

Para ello, fue necesario realizar una investigación bibliográfica con la finalidad de recabar información acerca de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y sobre los métodos de análisis existentes para la cuantificación del fármaco de interés.

El método desarrollado mediante UHPLC-MS/MS abarca la detección por espectrometría de masas, las condiciones de separación mediante cromatografía y el desarrollo de un método de extracción eficiente que logre cuantificar isotretinoína en plasma humano.

1.1.1. Detección por espectrometría de masas y selección del estándar interno.

Se observó una señal definida y de mayor intensidad por ESI-, tanto para isotretinoína como para el estándar interno. Se determinó los fragmentos seleccionados para cada fármaco (ion hijo) los cuales presentaban una señal abundante a partir de un ion precursor (ion padre). A continuación se muestran las condiciones finales de la fuente.

La adecuada selección de un estándar interno toma gran importancia, pues minimiza los errores que se pueden presentar en el procesamiento de la muestra y sirve como referencia interna para cuantificar con exactitud las concentraciones del



fármaco estudiado. Se evaluó como estándar interno acitretina debido a su gran similitud en cuanto a estructura química y propiedades con isotretinoína.

Cuadro 6. Condiciones finales de la fuente.

Parámetro	Valor (+)	Valor (-)
Gas Temp (°C)	NA	300
Gas Flow (L/min)	NA	8
Nebulizer (psi)	NA	55
SheathGasHeater	NA	250
SheathGasFlow	NA	5
Capillary (V)	NA	2500
Vcharging	NA	500

Una vez establecidas las condiciones de la fuente, se evaluaron los parámetros dependientes de cada analito mediante la aplicación de diferentes voltajes de cono y energías de colisión, con la finalidad de favorecer la ruptura característica de cada uno de ellos. En el cuadro se observan los parámetros dependientes de los analitos.

Cuadro 7. Parámetros dependientes de los analitos.

Analito	Polaridad	m/z Precursor	m/z Producto	Dwell	Frag (v)	Collision
Isotretinoína	Negativa	299.1	255.1	300	135	20
Acitretina	Negativa	324.9	251.1	300	135	20

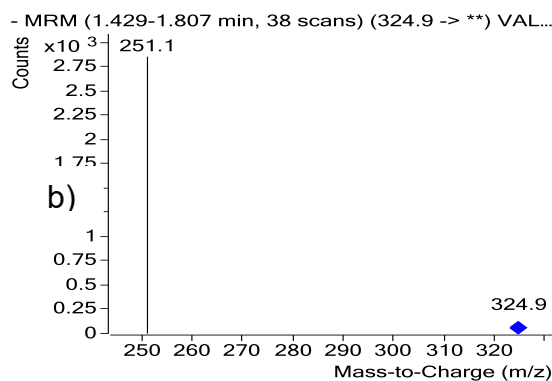
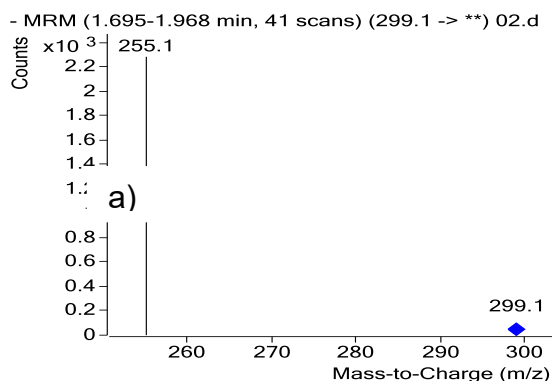


Figura 7. Espectros representativos de la fragmentación de isotretinoína (a) y de acitretina (b).

1.1.2. Condiciones cromatográficas por UHPLC.

1.1.2.1. Columna cromatográfica y fase móvil.

La selección de la columna es de gran importancia, debido a que en esta se realiza la separación del analito de interés de las demás sustancias de la matriz biológica. Una columna adecuada debe suministrar picos resueltos y simétricos, que permitan cuantificar el analito.

Para el desarrollo de este proyecto, se seleccionó la columna Phenomenex Luna CN 2.0*100mm, 3 μ m, ya que con esta columna fue posible obtener una buena respuesta de los analitos, picos simétricos y definidos, además de tiempos de retención cortos.

Para la elección de la fase móvil, se eligió trabajar con una solución de ácido fórmico al 0.2% y ACN al 100%. Para esto se consideró las características de solubilidad del analito de interés.

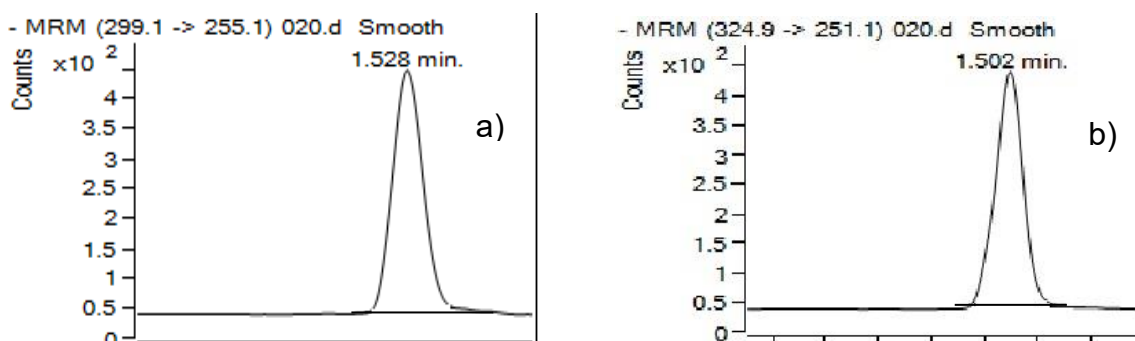


Figura 8. Cromatogramas representativos de isotretinoína (a) y de acitretina (b) bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas.

1.1.2.2. Condiciones finales del método analítico.

Cuadro 8. Condiciones cromatográficas finales determinadas en el desarrollo del método analítico.

Condiciones cromatográficas										
Detector empleado	Espetrometría de Masas									
Columna	Phenomenex Luna CN(CPH-B/C-02) 2.0*100mm, 3 µm									
Solución de lavado	Lavado de aguja en puerto y asiento Acetonitrilo:Agua:Isopropanol:Metanol (25:25:25:25 v/v) 20 seg									
Volumen de inyección	5 µL									
Temperatura columna	40 ° C									
Temperatura automuestreador	4 ° C									
Fase móvil	ACN 100% (A) : Ácido Fórmico 0.2% v/v (B) Isocrático: 60:40 (%A:%B)									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Proporción de Fase Móvil</th> </tr> <tr> <th>Tiempo (Minutos)</th> <th>Velocidad de Flujo (mL/min)</th> <th>% Disolvente A</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0.25</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	Proporción de Fase Móvil			Tiempo (Minutos)	Velocidad de Flujo (mL/min)	% Disolvente A	0	0.25	60
Proporción de Fase Móvil										
Tiempo (Minutos)	Velocidad de Flujo (mL/min)	% Disolvente A								
0	0.25	60								
Tiempos de retención aproximados	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Isotretinoína</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>Acitretina</td> <td>1.6</td> </tr> </tbody> </table>	Isotretinoína	1.5	Acitretina	1.6					
Isotretinoína	1.5									
Acitretina	1.6									

1.1.2.3. Método de extracción.

Para la elección del método de extracción, se realizó una extracción líquido-líquido. El método general se muestra en la siguiente figura.

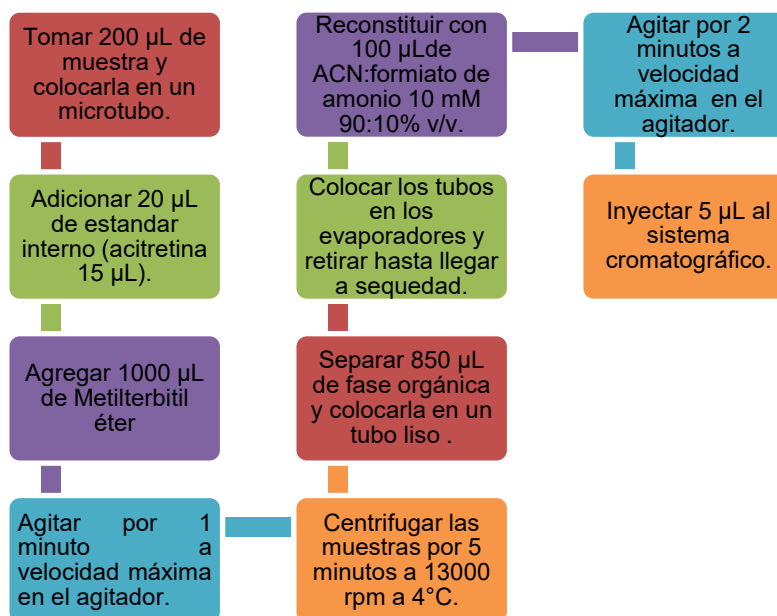


Diagrama 5. Método de extracción final para la cuantificación de isotretinoína en plasma (Elaboración propia).



6.2. Validación.

6.2.1. Adecuabilidad del sistema.

Antes de cada corrida analítica se verificó el adecuado funcionamiento del sistema para las determinaciones analíticas. En el cuadro 9 se muestran los resultados de la adecuabilidad de los días de trabajo donde se observan el C.V. promedio por día de análisis de cada analito y el área relativa.

Cuadro 9. Adecuabilidad del sistema.

Fecha de Análisis	Isotretinoína		Acitretina		Área Relativa % C.V. Promedio
	Área (%C.V. Promedio)	Retención (%C.V. Promedio)	Área (%C.V. Promedio)	Retención (%C.V. Promedio)	
19-feb-2015	2.097	0.536	3.459	0.399	4.939
20-feb-2015	3.638	0.578	2.878	0.437	3.562
23-feb-2015	5.443	0.443	3.966	0.420	4.675
24-feb-2015	1.973	0.349	2.532	0.785	4.086
25-feb-2015	3.310	0.301	3.457	0.266	1.633
26-feb-2015	3.000	0.331	2.095	0.361	2.958
02-mar-2015	4.523	0.040	4.555	0.117	1.663

El sistema cromatográfico se comportó de forma estable durante todos los días de validación, ya que el coeficiente de variación para el área relativa obtenido fue menor al 5 % y el coeficiente de variación del tiempo de retención fue menor al 2% en cada uno de los días, verificando así un constante funcionamiento durante los días de análisis.

6.2.2. Selectividad del método.

La selectividad del método fue determinada, analizando la muestra blanco del plasma (muestras de plasma de seis donadores y mezcla de plasma de estas muestras) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como Ac.



Salicílico, Paracetamol, Naproxeno, Cafeína y el anticoagulante Heparina (143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de isotretinoína y de acitretina. Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas. Ver cuadro 10.

Cuadro 10. Selectividad del método.

Plasma/Fecha	Señal Isotretinoína	Señal Acitretina
Lote L007/14 19-feb-2015		
Lote L008/14 19-feb-2015		
Lote L009/14 19-feb-2015		
Lote L010/14 19-feb-2015		
Lote L011/14 19-feb-2015		



Plasma/Fecha	Señal Isotretinoína	Señal Acitretina
Lote L012/14 19-feb-2015		
MMB-15/01 19-feb-2015		
Heparina 24-feb-2015		
Lipémico 24-feb-2015		
Hemolizado 24-feb-2015		



Fármaco/Fecha	Señal Isotretinoína	Señal Acitretina
Ac. Salicílico 24-feb-2015		
Paracetamol 24-feb-2015		
Cafeína 24-feb-2015		
Naproxeno 24-feb-2015		



En cuanto a lo que refiere a la selectividad, el método demostró serlo, puesto que no presenta interferencias significativas en los tiempos de retención para la detección de cada uno de los analitos en los diferentes lotes de plasma evaluados.

6.2.3. Interferencia iónica.

Además de la selectividad, se evaluó la interferencia iónica que pueden ejercer fármacos de uso común que impidan la cuantificación de forma precisa y exacta de isotretinoína en plasma. En este caso se evaluó ácido salicílico, naproxeno, cafeína y paracetamol, los resultados se presentaron en los siguientes cuadros.

Cuadro 11. Interferencia iónica a ácido salicílico. Cuadro 12. Interferencia iónica a

A. SALICÍLICO	
Fecha	24-feb-2015
Muestra	Control Bajo (30.000 ng/mL)
1	*41.468
2	33.632
3	33.422
4	34.024
5	34.101
Promedio	30.778
D.E.	2.434
C.V. (%)	7.907
Desv.abs. (%)	2.594

NAPROXENO	
Fecha	25-feb-2015
Muestra	Control Bajo (30.000 ng/mL)
1	31.074
2	31.649
3	33.422
4	34.024
5	34.101
Promedio	32.854
D.E.	1.402
C.V. (%)	4.269
Desv.abs. (%)	9.513

*Puntos control fuera de especificación.



Cuadro 13. Interferencia iónica cafeína.

CAFEINA	
Fecha	24-feb-2015
Muestra	Control Bajo (30.000 ng/mL)
1	32.542
2	33.523
3	25.584
4	34.094
5	34.040
Promedio	31.957
D.E.	3.616
C.V. (%)	11.317
Desv.abs. (%)	6.522

Cuadro 14. Interferencia iónica a paracetamol.

PARACETAMOL	
Fecha	24-feb-2015
Muestra	Control Bajo (30.000 ng/mL)
1	32.578
2	*44.887
3	33.294
4	33.876
5	29.515
Promedio	32.316
D.E.	1.941
C.V. (%)	6.006
Desv.abs. (%)	7.719

*Puntos control fuera de especificación.

Con base en los resultados que se observan en los cuadros 11, 12,13 y 14, los fármacos evaluados no interfieren en la ionización de los analitos por lo que la cuantificación del analito se realiza de forma precisa y exacta, ya que la desviación absoluta con respecto al valor nominal no fue mayor al 15 % y la variación de las determinaciones fue menor o igual al 15.

6.2.4. Efecto matriz.

Se evaluó el efecto matriz normalizado, los resultados se presentan en el siguiente cuadro. (Ver cuadro 15).



Cuadro 15. Efecto matriz.

23-feb-2015	EFECTO MATRIZ NORMALIZADO		
Muestra	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
LOTE 1	0.804	0.802	0.954
LOTE 2	0.692	0.743	0.698
LOTE 3	0.854	0.890	0.716
LOTE 4	0.606	0.790	0.864
LOTE 5	0.571	0.882	0.962
LOTE 6	0.604	0.773	0.694
MEZCLA	0.721	0.669	0.766
LIPÉMICO	0.650	0.946	0.932
HEPARINA	0.636	0.969	0.842
HEMOLIZADO	0.645	0.857	0.877
Promedio	0.678	0.832	0.830
D. E.	0.091	0.094	0.105
C.V. (%)	13.434	11.253	12.679

Para el efecto matriz, fueron utilizados 6 diferentes lotes de plasma además de plasma hemolizado, lipémico y con heparina que fue utilizado como anticoagulante. En los plasmas evaluados se encontró efecto por parte de los componentes de la matriz biológica que modifican la ionización de los analitos, sin embargo es constante ya que el C.V. (%) del efecto matriz normalizado en cada nivel de concentración no fue mayor a 13.434 %, cumpliendo con el criterio establecido de no mayor al 15%.

6.2.5. Prueba de acarreo.

Con el fin de demostrar que el sistema de inyección no presenta arrastre de los analitos previo a una inyección de concentración alta, se inyectaron blancos de reactivos una vez antes y dos veces posterior a la inyección del punto más alto de la curva de calibración. (Ver cuadro 16).

Cuadro 16. Cromatogramas representativos en prueba de arrastre.

Muestra/Fecha	Señal Isotretinoína	Señal Acitretina
Límite Superior de Cuantificación 19-feb-2015		
Blanco de Reactivos Previo 19-feb-2015		
Blanco de Reactivos Arrastre 19-feb-2015		
Blanco de Reactivos Arrastre 19-feb-2015		



Se evaluó la prueba de acarreo, comprobándose que el sistema de lavado que se estableció es el adecuado (ACN: agua: isopropanol: metanol 25:25:25:25: v/v) ya que los blancos de reactivo inyectados posteriormente al punto más alto de la curva, no presentaron interferencia que pudiesen interferir con la cuantificación de isotretinoína.

6.2.6. Linealidad del método.

En el presente estudio, el mejor ajuste obtenido fue el de regresión lineal por mínimos cuadrados el cual fue definido por el coeficiente de correlación (r). La linealidad fue evaluada analizando tres curvas de calibración durante tres días de análisis en el rango de 10 a 600ng/mL y graficando la concentración nominal contra la concentración recuperada (isotretinoína/acitretina). En el cuadro 17 se presenta de manera detallada los valores de la pendiente (m), ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación (r). En el cuadro 18 se presenta la concentración recuperada, así como en la gráfica 9 se observa la concentración nominal contra la concentración recuperada.

Cuadro 17. Linealidad del método.

Linealidad del método							
Curva/Fecha	Concentración nominal (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de Correlación r
1	10.000	0.035	9.980	-0.203	0.0033	0.0029	0.9964
	20.000	0.066	19.364	-3.178			
	100.000	0.346	104.909	4.909			
	200.000	0.709	216.018	8.009			
	300.000	0.919	280.294	-6.569			
	400.000	1.144	349.280	-12.680			
19-feb-2015	500.000	1.769	540.578	8.116			
	600.000	1.995	609.576	1.596			
2	10.000	0.034	10.073	0.731	0.0031	0.0028	0.9997
	20.000	0.068	20.919	4.594			
	100.000	0.306	96.801	-3.199			
	200.000	0.616	196.031	-1.984			
	300.000	0.911	290.039	-3.320			
	400.000	1.252	399.199	-0.200			
20-feb-2015	500.000	1.620	516.681	3.336			
	600.000	1.882	600.257	0.043			
3	10.000	0.027	11.859	18.590	0.0029	-0.0066	0.9982
	20.000	0.046	18.367	-8.164			
	100.000	0.251	90.089	-9.911			
	200.000	0.309	*110.351	-44.824			
	300.000	0.847	298.644	-0.462			
	400.000	1.089	383.418	-4.146			
23-feb-2015	500.000	1.378	484.356	-3.129			
	600.000	1.832	643.267	7.211			
Promedio					0.003	0.000	0.998
Desv. Estandar					0.000	0.005	0.002
C. V. (%)					6.762	-1706.096	0.164

*Valor que no cumple con criterios de aceptación, excluido de la estadística.



Cuadro 18. Concentración recuperada en la linealidad del método.

Concentración recuperada (ng/mL)			Promedio (ng/mL)	C.V. (%)
Curva 1	Curva 2	Curva 3		
9.980	10.073	11.859	10.637	9.956
19.364	20.919	18.367	19.550	6.578
104.909	96.801	90.089	97.267	7.630
216.018	196.031	*110.351	206.024	6.860
280.294	290.039	298.644	289.659	3.170
349.280	399.199	383.418	377.299	6.763
540.578	516.681	484.356	513.872	5.491
609.576	600.257	643.267	617.700	3.663

*Valor que no cumple con criterios de aceptación, excluido de la estadística.

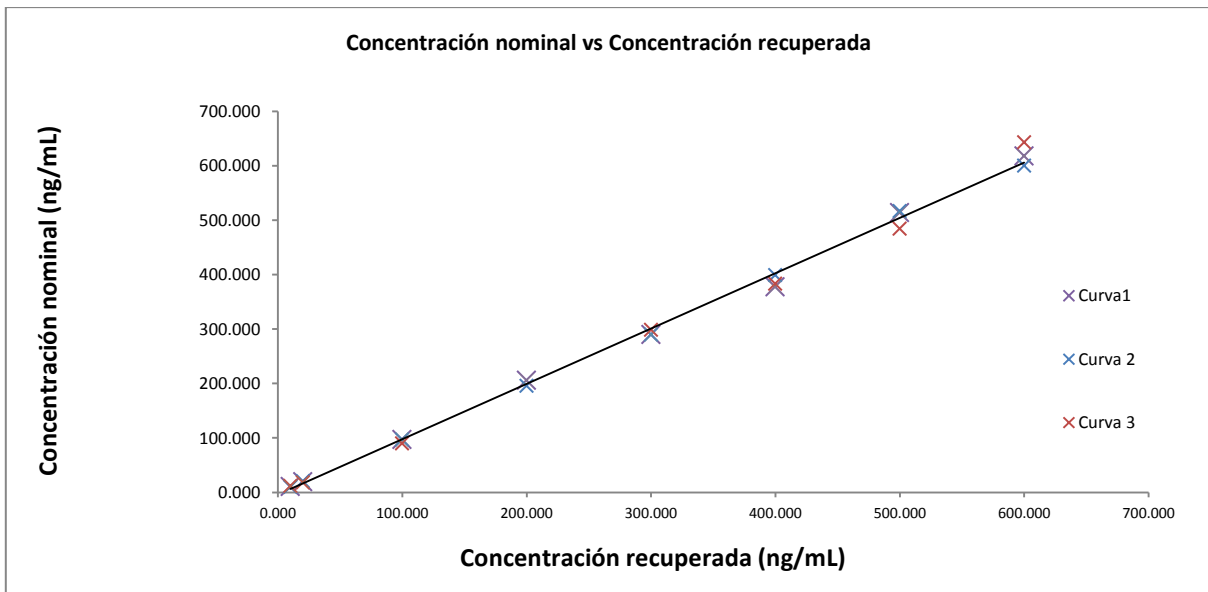


Figura 9. Gráfica de la concentración nominal contra la concentración recuperada.

A lo que corresponde a la linealidad del método, este, resulta serlo en el rango propuesto. Los puntos promedio de las tres curvas evaluadas cumplen con un C.V. menor al 15 %, incluyendo al punto más bajo de la curva de calibración. Además, no se descartaron de la estadística ni el punto más bajo ni el más alto de la curva, ni tampoco puntos de concentraciones consecutivas y presentó un valor mayor de r al 0.99 que es lo que establece la norma



6.2.7. Precisión y exactitud del método.

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

En el caso de las Muestras Control Diluidas (MCD), se les aplicó un factor de dilución de 1:2 y 1:4 como puede observarse en el cuadro 19.

La exactitud del método se evaluó de los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad y de los resultados de la prueba de reproducibilidad, para lo cual se calcula el porcentaje de desviación absoluta mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desv abs} = \text{abs} \left[100 \times \left(\frac{\text{Concentración adicionada} - \text{concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right) \right]$$

6.2.7.1. Repetibilidad y exactitud.

Cuadro 19. Repetibilidad y exactitud intradía del método.

Fecha 20-feb-2015	Repetibilidad y exactitud del método					
Muestra	Límite Cuantificación (10.000 ng/mL)	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)	MCD 1:2 (900.000 ng/mL)	MCD 1:4 (900.000 ng/mL)
1	11.964	29.227	276.311	444.846	897.351	877.417
2	11.775	29.409	277.488	404.786	940.671	955.943
3	8.675	28.224	277.277	441.548	838.248	1008.570
4	10.915	33.886	277.615	456.866	914.411	843.957
5	10.054	31.865	268.876	414.951	781.685	840.911
Promedio	10.677	30.522	275.514	432.599	874.473	905.360
D.E.	1.352	2.309	3.746	21.817	64.075	74.020
C.V. (%)	12.664	7.563	1.359	5.043	7.327	8.176
Desv.abs. (%)	6.766	1.740	10.205	3.867	2.836	0.596



El método cumplió con el criterio de repetibilidad ya que con base en la normatividad mexicana vigente la concentración interpolada para el LIC no debe ser mayor al 20%. De igual manera, los demás niveles de concentración y las muestras control diluidas (1:2 y 1:4) no sobrepasan el % C.V. del 15%. De la misma forma, podemos decir que es exacto ya que el promedio de la desviación absoluta no sobrepasa el 15% para las muestras evaluadas, a excepción del LIC, el cual no debe ser mayor al 20%.

6.2.7.2. Reproducibilidad y exactitud

Para evaluar la reproducibilidad, se procesó con pesada independiente y por quintuplicado puntos control a nivel bajo, medio y alto, adicionalmente el límite inferior de cuantificación durante tres días de validación.

La concentración recuperada de las muestras control se determinó interpolando en la curva de calibración de cada día de análisis. Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos control de los tres días de validación.

Se evalúa también la reproducibilidad de un segundo Químico Analista preparando y procesando de manera independiente y con pesada independiente por quintuplicado curva de calibración con puntos control a nivel bajo, medio y alto y adicionalmente el límite inferior de cuantificación durante tres días de validación. Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes cuadros (ver cuadro 20 y 21).



Cuadro 20. Reproducibilidad y exactitud del químico analista 1 (Interdía).

Reproducibilidad y exactitud del Q. Analista 1 (Interdía)				
Día/Fecha	Límite Cuantificación (10.000 ng/mL)	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1 19-feb-2015	9.831	29.745	280.496	398.675
	8.670	30.950	247.724	403.440
	9.746	31.071	274.803	387.331
	9.708	34.360	231.434	466.890
	8.961	29.201	257.534	436.055
2 20-feb-2015	10.463	30.775	277.559	472.286
	10.502	33.058	255.517	393.843
	9.289	33.775	244.598	441.869
	10.498	33.842	278.950	444.842
	10.524	29.067	253.088	479.321
3 23-feb-2015	11.224	29.991	215.073	435.108
	8.551	33.990	228.308	450.982
	11.241	32.185	229.320	408.823
	10.439	33.554	230.101	462.704
	10.865	34.233	257.868	405.521
Promedio	10.034	31.987	250.825	432.513
D.E.	0.869	1.958	21.018	30.802
C.V.(%)	8.665	6.120	8.379	7.122
Desv.abs. (%)	0.342	6.622	0.330	3.886

Cuadro 21. Reproducibilidad y exactitud del químico analista 2 (Interdía).

Reproducibilidad y exactitud del Q. Analista 2 (Interdía)				
Día/Fecha	Límite Cuantificación (10.000 ng/mL)	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1 25-feb-2015	8.890	31.926	264.960	445.664
	11.742	29.733	255.331	419.752
	11.156	34.179	282.621	403.716
	11.173	25.975	264.129	423.355
	9.344	28.608	266.577	441.858
2 26-feb-2015	8.885	28.048	264.483	413.043
	8.328	25.665	257.160	421.825
	8.899	26.504	232.939	421.219
	10.057	25.997	237.115	438.600
	10.272	27.676	216.347	459.611
3 02-mar-2015	8.264	27.062	260.903	399.009
	8.496	26.440	247.256	410.213
	8.890	25.917	263.599	435.846
	9.271	27.340	247.155	429.327
	8.252	28.503	236.219	421.240
Promedio	9.461	27.972	253.120	425.618
D.E.	1.149	2.408	16.913	16.440
C.V.(%)	12.143	8.610	6.682	3.863
Desv.abs. (%)	5.386	6.761	1.248	5.418



Para evaluar la reproducibilidad, se realizó por dos analistas, demostrando ser reproducible al ser ejecutado tanto por el Químico Analista 1 y por el Químico Analista 2, debido a que el coeficiente de variación fue menor al 15% para cada nivel de concentración y menor al 20% para el límite inferior de cuantificación. En conclusión, podemos afirmar que al aplicar el método repetidas veces, bajo diferentes condiciones de trabajo como son diferentes días y diferentes analistas, obtendremos poca variabilidad en los resultados.

Según lo establecido en la normatividad mexicana, el método es exacto cuando el promedio de % de la desviación absoluta de los datos de la repetibilidad y de la reproducibilidad no sobrepasan el 15% para los puntos control evaluados mientras que para el LIC no debe ser mayor al 20%. Teniendo en cuenta que la exactitud tiene que ver con cuan cerca se está del valor real y la precisión que cuan cerca entre sí, están un conjunto de medidas, es correcto decir que en cuanto menor sea el sesgo entre las concentraciones calculadas más exacta es una medición, por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos (ver cuadro 17) el %DEA, el método cumple con el criterio de aceptación, por lo tanto podemos decir que la cuantificación de isotretinoína se realizó de forma exacta durante los días evaluados.

6.2.8. Recobro absoluto.

El recobro absoluto fue definido como el porcentaje recuperado del analito y del estándar interno obtenido después de aplicar la método de extracción en el plasma “muestras método”, entre la concentración obtenida contra sus correspondientes muestras que no fueron sometidas al proceso de extracción, puntos control post-extracción. Para lo cual se procesaron muestras control de calidad (bajo, medio y alto) por quintuplicado. Los resultados obtenidos de esta prueba se muestran en los siguientes cuadros. (Ver cuadro 22 y 23).



Cuadro 22. Recobro absoluto para isotretinoína.

23-feb-2015	Recobro Absoluto para ISOTRETINOINA			
Control	Área método	Área sistema	Recobro	Desviación (%)
Control Bajo (30.000 ng/mL)	405.418	513.186		
	282.309	441.634		
	238.548	697.661		
	354.112	494.952		
	213.521	431.071		
Promedio	298.781	515.701	57.937	5.590
Control Medio (250.000 ng/mL)	1679.860	2274.440		
	1465.158	518.342		
	1160.861	*		
	1673.041	1221.787		
	1471.841	4573.150		
Promedio	1490.152	2146.930	69.409	13.103
Control Alto (450.000 ng/mL)	2320.088	5496.344		
	4296.752	7668.612		
	5962.688	6234.245		
	2952.547	8400.917		
	3568.031	5852.091		
Promedio	3820.021	6730.442	56.757	7.513
Recobro promedio global			61.368	

*Valor que no cumple con criterios de aceptación, excluido de la estadística.

Cuadro 23. Recobro absoluto para acitretina.

23-feb-2015	Recobro Absoluto para ACITRETINA			
Control	Área método	Área sistema	Recobro	Desviación (%)
Control bajo	5126.325	5316.710		
	3118.914	3951.065		
	2794.794	6369.489		
	3966.847	5204.541		
	2341.006	3927.676		
Promedio	3469.577	4953.896	70.037	0.764
Control medio	2762.840	3522.761		
	2268.593	962.994		
	1789.423	*		
	2570.079	2230.805		
	2015.332	5363.238		
Promedio	2281.253	3019.949	75.539	7.032
Control alto	1875.813	4598.929		
	3351.049	5276.470		
	5132.612	4205.583		
	2244.072	5570.222		
	3096.468	4082.097		
Promedio	3140.003	4746.660	66.152	6.269
Recobro promedio global			70.576	

*Valor que no cumple con criterios de aceptación, excluido de la estadística.



El método demostró obtener un recobro constante tanto para cuantificar isotretinoína como acitretina. Si bien, no es del 100% (del 61.368% y del 70.576% respectivamente) para los tres niveles de concentración que fueron evaluados, y cumple con el criterio de aceptación establecido ya que no se desviaron más del 15% del promedio obtenido. Por lo tanto el método de extracción es eficiente.

6.2.9. Tolerancia.

Se evaluó la tolerancia del método los resultados se pueden observar en el siguiente cuadro (Ver cuadro 24).

Cuadro 24. Tolerancia del método.

Tolerancia a cambio de volumen de inyección			
Fecha 26-feb-2015	Condición original 5 µL		
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	27.611	258.164	514.390
2	31.718	280.908	486.278
3	27.487	283.848	470.147
4	29.539	286.990	448.715
5	27.802	271.948	439.696
Promedio	28.831	276.371	471.845
Desv. Estándar	1.816	11.622	29.958
% C.V.	6.298	4.205	6.349
Fecha 26-feb-2015	Condición a evaluar 2 µL		
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	29.913	277.839	449.034
2	33.082	269.286	510.957
3	25.662	286.537	513.253
4	27.017	*305.878	458.289
5	*40.095	265.729	429.628
Promedio	28.918	274.848	472.232
Desv. Estándar	3.294	9.304	37.849
% C.V.	11.390	3.385	8.015
Desv. Abs. (%)	0.302	0.551	0.082

*Valor que no cumple con criterios de aceptación, excluido de la estadística.



Con base en los resultados obtenidos (ver cuadro 24), el método es tolerante al cambio de volumen de inyección de muestra, ya que al menos el 80% de los controles por nivel de concentración presentaron desviación absoluta menor al 15% con respecto a la concentración nominal y el promedio no se desvió más del 15% del promedio de concentración obtenida en la condición original. Además la variación de las determinaciones por nivel de concentración fue menor o igual a 15%.

6.2.10. Estabilidad.

6.2.10.1. Estabilidad de la solución estándar madre.

Las soluciones de referencia de isotretinoína y acitretina se prepararon el día 09 de febrero del 2015 y se almacenaron en congelación.

Después del periodo establecido para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar, se prepararon por quintuplicado, muestras en solución a la concentración del punto control medio con las soluciones almacenadas y se compararon las áreas relativas obtenidas de cada analito con controles medios en sistemas separados con soluciones estándar de pesada reciente de los analitos (Ver cuadro 25 y 26).

Cuadro 25. Estabilidad de la solución madre de isotretinoína.

Estabilidad de la solución madre de Isotretinoína en Congelación durante 11 días	
Día preparación	Solución reciente
20-feb-2015	Área relativa
1	0.537
2	0.502
3	0.517
4	0.517
5	0.541
Promedio	0.523
Desv. Estándar	0.016
C.V. (%)	3.095
Preparación To	Solución evaluada
09-feb-2015	Área relativa
1	0.550
2	0.567
3	0.530
4	0.577
5	0.517
Promedio	0.548
Desv. Estándar	0.025
C.V. (%)	4.518
Desv. Abs. (%)	4.638

Cuadro 26. Estabilidad de la solución madre de acitretina.

Estabilidad de la solución madre de Acitretina en Congelación durante 11 días	
Día preparación	Solución reciente
20-feb-2015	Área relativa
1	0.537
2	0.502
3	0.517
4	0.517
5	0.541
Promedio	0.523
Desv. Estándar	0.016
C.V. (%)	3.095
Preparación To	Solución evaluada
09-feb-2015	Área relativa
1	0.550
2	0.567
3	0.530
4	0.577
5	0.517
Promedio	0.548
Desv. Estándar	0.025
C.V. (%)	4.518
Desv. Abs. (%)	4.638

6.2.10.2. Estabilidad de la solución estándar de trabajo.

Las soluciones de referencia de isotretinoína y acitretina se prepararon el día 09 de febrero del 2015 y se almacenaron en congelación.

Después del periodo establecido para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar, se prepararon por quintuplicado, muestras en solución a la concentración del punto control medio con las soluciones almacenadas y se compararon las áreas relativas obtenidas de cada analito con controles medios en sistemas separados con soluciones estándar de pesada reciente de los analitos (Ver cuadro 27 y 28).



Cuadro 27. Estabilidad de la solución trabajo de isotretinoína.

Estabilidad de la solución de trabajo de Isotretinoína en Congelación durante 11 días	
Día preparación	Solución reciente
20-feb-2015	Área relativa
1	0.537
2	0.502
3	0.517
4	0.517
5	0.541
Promedio	0.523
Desv. Estándar	0.016
C.V. (%)	3.095
Preparación To	Solución evaluada
09-feb-2015	Área relativa
1	0.461
2	0.434
3	0.500
4	0.501
5	0.495
Promedio	0.478
Desv. Estándar	0.030
C.V. (%)	6.204
Desv. Abs. (%)	9.349

Cuadro 28. Estabilidad de la solución trabajo de acitretina.

Estabilidad de la solución de trabajo de Acitretina en Congelación durante 11 días	
Día preparación	Solución reciente
20-feb-2015	Área relativa
1	0.537
2	0.502
3	0.517
4	0.517
5	0.541
Promedio	0.523
Desv. Estándar	0.016
C.V. (%)	3.095
Preparación To	Solución evaluada
09-feb-2015	Área relativa
1	0.468
2	0.496
3	0.466
4	0.511
5	0.468
Promedio	0.482
Desv. Estándar	0.020
C.V. (%)	4.247
Desv. Abs. (%)	8.433

6.2.10.3. Estabilidad de la muestra procesada.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada en plasma se prepararon muestras por quintuplicado a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se almacenaron en refrigeración, posterior al tiempo se inyectan en sistema cromatográfico. El tiempo mínimo que cumplieron con estabilidad fueron 3.5 h. Los resultados se muestran en el cuadro 29.



Cuadro 29. Estabilidad de la muestra procesada.

Estabilidad de la muestra procesada durante 3.5 horas			
Fecha inicio estab. 26-feb-2015 15:00		Fecha final estab. 26-feb-2015 18:30	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	31.078	283.063	436.988
2	28.585	281.274	*544.526
3	*23.491	260.870	503.622
4	28.418	261.979	421.199
5	25.906	282.636	474.123
Promedio	28.497	273.965	458.983
Desv. Estándar	2.113	11.473	37.118
% C.V.	7.413	4.188	8.087
Desv. Abs. (%)	5.011	9.586	1.996

*Puntos control fuera de especificación.

6.2.10.4. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado y se colocaron sobre la mesa de trabajo del laboratorio de preparación protegidas de la luz, después del periodo de evaluación se procesaron y se inyectaron en el sistema cromatográfico. El tiempo mínimo que cumplieron con estabilidad fueron 19.2 h. Los resultados se muestran en el siguiente cuadro (ver cuadro 30).

Cuadro 30. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Estabilidad de la muestra a Temp. Ambiente durante 19.2 horas			
Fecha inicio estab. 23-feb-2015 18:00		Fecha final estab. 24-feb-2015 13:10	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	29.242	216.011	*
2	*23.779	219.948	397.895
3	29.755	227.256	386.171
4	29.581	*194.223	385.561
5	27.078	223.520	398.833
Promedio	28.914	221.684	392.115
Desv. Estándar	1.242	4.817	7.230
% C.V.	4.296	2.173	1.844
Desv. Abs. (%)	3.621	11.326	12.863

*Puntos control fuera de especificación



6.2.10.5. Estabilidad de la muestra en el automuestreador.

Se prepararon y procesaron muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado y se colocaron en el automuestreador, después de un periodo de tiempo se inyectaron en el sistema cromatográfico. El tiempo mínimo que cumplieron con estabilidad fueron 10.4 h. Los resultados se muestran en el siguiente cuadro (Ver cuadro 31).

Cuadro 31. Estabilidad de la muestra en el automuestreador.

Estabilidad de la muestra en el automuestreador 10.4 horas			
Fecha inicio estab. 25-feb-2015 12:39		Fecha final estab. 25-feb-2015 23:04	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	34.052	260.514	463.582
2	30.788	254.203	469.171
3	*34.781	253.575	465.434
4	29.340	280.592	443.827
5	31.564	260.567	444.512
Promedio	31.436	261.890	457.305
Desv. Estándar	1.973	10.973	12.161
% C.V.	6.275	4.190	2.659
Desv. Abs. (%)	4.788	4.756	1.623

*Puntos control fuera de especificación ya que se desvían más del 15% de su valor nominal.

6.2.10.6. Estabilidad a ciclos de congelación y descongelación.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica y se almacenaron en congelación (-40 a -80 °C) por al menos 12 horas, periodo de tiempo después del cual se descongelaron las muestras se congela nuevamente y se repite el proceso para completar tres ciclos. Cumplidos los tres ciclos las muestras se procesan e inyectan al sistema cromatográfico. Los resultados del tercer ciclo se muestran en el cuadro 32.



Cuadro 32. Estabilidad de la muestra a 3 ciclos de congelación/descongelación.

Estabilidad de la muestra a 3 ciclo(s) de congelación/descongelación			
Fecha preparación 20-feb-2015 12:27		Fecha del ciclo. 25-feb-2015 09:50	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	*18.243	240.284	*352.911
2	30.536	245.841	411.239
3	25.675	227.853	416.510
4	32.751	229.515	403.555
5	29.368	233.048	414.200
Promedio	29.583	235.308	411.376
Desv. Estándar	2.959	7.582	5.643
% C.V.	10.001	3.222	1.372
Desv. Abs. (%)	1.391	5.877	8.583

*Puntos control fuera de especificación ya que se desvían más del 15% de su valor nominal.

6.2.10.7. Estabilidad a largo plazo a congelación.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica y se almacenaron en congelación (-40 a -80 °C), una serie por quintuplicado de cada nivel de concentración, después del periodo de tiempo de evaluación, se descongelaron las muestras y procesaron para poder ser inyectadas al sistema cromatográfico (el resto de las muestras de estabilidad se evaluarán en un periodo posterior de tiempo). Los resultados se muestran en el cuadro 33.

Cuadro 33. Estabilidad de la muestra a largo plazo en congelación (-40 a -80°C).

Estabilidad a largo plazo en congelación (-40 a -80 °C) durante 53 Días			
Fecha inicio estab. 15-ene-2015 12:35		Fecha final estab. 09-mar-2015 09:00	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (300.000 ng/mL)	Control Alto (750.000 ng/mL)
1	31.521	265.146	849.186
2	32.975	324.994	649.844
3	34.388	300.688	818.757
4	34.051	319.672	836.497
5	33.883	330.987	*931.328
Promedio	33.363	308.297	788.571
Desv. Estándar	1.155	26.659	93.323
% C.V.	3.462	8.647	11.834
Desv. Abs. (%)	11.211	2.766	5.143

* Puntos control que se desvían más del 15% de su concentración nominal



6.2.10.8. Estabilidad de la muestra evaporada.

Se prepararon muestras control bajo, medio y alto por quintuplicado en matriz biológica, se procesaron quedando la metodología hasta la evaporación de la muestra, las muestras evaporadas permanecen durante un periodo sin ser reconstituidas, posterior a este tiempo se procedió a reconstituir y a inyectar al sistema cromatográfico. Los resultados de la estabilidad se muestran en la cuadro 34.

Cuadro 34. Estabilidad de la muestra evaporada.

Estabilidad de la muestra evaporada post-extracción durante 3.5 horas			
Fecha inicio estab. 26-feb-2015 15:00		Fecha fin estab. 26-feb-2015 18:30	
Control	Control Bajo (30.000 ng/mL)	Control Medio (250.000 ng/mL)	Control Alto (450.000 ng/mL)
1	27.550	*306.346	413.524
2	28.795	278.287	511.106
3	*21.896	284.194	470.571
4	28.324	278.915	467.239
5	30.628	269.328	514.896
Promedio	28.824	277.681	475.467
Desv. Estándar	1.307	6.166	41.090
% C.V.	4.536	2.221	8.642
Desv. Abs. (%)	3.919	11.072	5.659

La NOM-177-SSA1-2013 especifica que una muestra se considera estable a determinadas condiciones cuando al ser interpolada en una curva de calibración recién preparada, la desviación promedio calculada se encuentra dentro del 15% con respecto al valor nominal.

Se evaluaron estabilidad de la soluciones estándar madre, de trabajo, de la muestra procesada, a temperatura ambiente, en el automuestreador, ciclos de congelación/descongelación, a largo plazo (-40 a -80°C) y de la muestra evaporada.

Con respecto a las muestras destinadas a evaluar las soluciones tanto estándar madre, como solución de trabajo, podemos observar que las soluciones pueden utilizarse hasta por un periodo de 11 días, ya que la desviación absoluta que



presentaron fue menor al 10% que especifica la normatividad vigente, con respecto a las soluciones recientes.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las muestras procesadas (ver cuadro 29) las cuales fueron evaluadas después de 3.5 horas, se mantuvieron estables después de este periodo de tiempo, ya que al menos el 80% de los controles por nivel de concentración presentaron desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor nominal.

Por otro lado, las muestras procesadas y almacenadas a temperatura ambiente (ver cuadro 30) y en el automuestreador (ver cuadro 31) muestran una desviación permitida por la norma, por lo tanto las muestras se consideran estables a las 19.2 y 10.4 horas ante una posible reinyección.

Ante el posible reanálisis de alguna muestra que fue descongelada con anterioridad, esta puede ser procesada sin que se vea comprometida la estabilidad de los analitos, como podemos observar en la cuadro de resultados de los ciclos de congelación/ descongelación, ya que se al menos el 80% de los controles por niveles de concentración presentaron una desviación absoluta menor al 15% de la concentración nominal. De la misma manera, la estabilidad a muestras evaporadas y a largo plazo en congelación, cumplen de acuerdo los criterios de aceptación que ya se mencionaron con anterioridad.



6.3. Resumen de la validación.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados obtenidos durante la validación, incluyendo los resultados de las estabildades.

Cuadro 35. Resumen de la validación.

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado obtenido			Dictamen	
Selectividad a Lotes de Matriz biológica	No debe presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta deberá ser menor del 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración y para el estándar interno no debe ser mayor del 5%.	LOTE	% (ANALITO)	% (E.I.)	CUMPLE	
		Lote 1	0.000	0.000		
		Lote 2	0.000	0.000		
		Lote 3	0.000	0.000		
		Lote 4	0.000	0.000		
		Lote 5	0.000	0.000		
		Lote 6	0.000	0.000		
Selectividad a Lotes de Matriz biológica	No debe presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta deberá ser menor del 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración y para el estándar interno no debe ser mayor del 5%.	LOTE	% (ANALITO)	% (E.I.)	CUMPLE	
		LIPÉMICO	0.000 %	0.000 %		
		HEPARINA	0.000 %	0.000 %		
		HEMOLIZADO	0.000 %	0.000 %		
Selectividad a fármacos	No debe presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta deberá ser menor del 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración y para el estándar interno no debe ser mayor del 5% de su respuesta.	LOTE	% (ANALITO)	% (E.I.)	CUMPLE	
		Ac. Salicílico	0.000 %	0.000 %		
		Cafeína	0.000 %	0.000 %		
		Paracetamol	0.000 %	0.000 %		
		Naproxeno	0.000 %	0.000 %		
Prueba de Acarreo	En los blancos de reactivo inyectados posterior al punto alto no deben presentar interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta deberá ser menor al 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración y para el estándar interno deberá ser menor al 5% de su respuesta.	Muestra	% Respuesta	% (E.I.)	CUMPLE	
		Replica 1	Bco inicial	0.000 %		0.000 %
			Blanco 1	0.000 %		0.000 %
			Blanco 2	0.000 %		0.000 %
		Replica 2	Bco inicial	0.000 %		0.000 %
			Blanco 1	0.000 %		0.000 %
Repetibilidad y exactitud del método	El coeficiente de variación del promedio de cada nivel debe ser menor o igual al 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20%. la concentración recuperada para cada muestra y del promedio de cada nivel de concentración debe presentar desviación absoluta menor o igual al 15% de su concentración nominal, excepto para el límite de cuantificación que debe ser menor o igual al 20%. Y no se debe excluir ningún punto control de ningún nivel de concentración.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Lím. inferior	12.664 %	6.766 %	100 %	
		Control Bajo	7.563 %	1.740 %	100 %	
		Control Medio	1.359 %	10.205 %	100 %	
		Control Alto	5.043 %	3.867 %	100 %	
		Dilución 1:2	7.327 %	2.836 %	100 %	
Linealidad del método	El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0.99 y las diferencias entre los valores de concentración recuperada y el valor nominal en términos porcentuales, no deben ser mayores al 15% en cada nivel de concentración a excepción del límite de cuantificación que no debe ser mayor al 20%. Para la evaluación de la linealidad al menos el 75% del total de los niveles de concentración deben cumplir. En caso de excluir puntos, estos no deben ser los límites inferior ni superior de la curva de calibración, y no deben encontrarse contiguos. 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		%cumplimiento	r	CUMPLE	
		Curva de calibración 1	100.000 %	0.9964		
		Curva de calibración 2	100.000 %	0.9997		
		Curva de calibración 3	87.500 %	0.9982		



Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado obtenido				Dictamen
Recobro Absoluto para ISOTRETINOINA	El porcentaje de recobro absoluto no deberá ser necesariamente del 100%, pero deberá ser constante en los niveles de concentración evaluados. Los valores promedio individuales deben presentar una desviación absoluta con respecto al promedio total menor al 15%.		% Recobro	% Dev. Abs.		CUMPLE
		Control Bajo	57.937 %	5.590 %		
		Control Medio	69.409 %	13.103 %		
		Control Alto	56.757 %	7.513 %		
		Recobro Promedio:	61.368 %			
Recobro Absoluto para ACITRETINA	El porcentaje de recobro absoluto no deberá ser necesariamente del 100%, pero deberá ser constante en los niveles de concentración evaluados. Los valores promedio individuales deben presentar una desviación absoluta con respecto al promedio total menor al 15%.		% Recobro	% Dev. Abs.		CUMPLE
		Control Bajo	70.037 %	0.764 %		
		Control Medio	75.539 %	7.032 %		
		Control Alto	66.152 %	6.269 %		
		Recobro promedio:	70.576 %			
Reproducibilidad y Exactitud del Químico Analista 1	El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 15% para cada nivel de concentración, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor o igual a 20%. La concentración recuperada para cada muestra y del promedio de cada nivel de concentración debe presentar desviación absoluta menor o igual al 15% de su concentración nominal, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor o igual a 20%. No se debe excluir puntos dentro de cada nivel de concentración.		C.V. (%)	Dev. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Lím. inferior	8.665 %	0.342 %	100 %	
		Control Bajo	6.120 %	6.622 %	100 %	
		Control Medio	8.379 %	0.330 %	100 %	
		Control Alto	7.122 %	3.886 %	100 %	
Reproducibilidad y Exactitud del Químico Analista 2	El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 15% para cada nivel de concentración, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor o igual a 20%. La concentración recuperada para cada muestra y del promedio de cada nivel de concentración debe presentar desviación absoluta menor o igual al 15% de su concentración nominal, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor o igual a 20%. No se debe excluir puntos dentro de cada nivel de concentración.		C.V. (%)	Dev. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Lím. inferior	12.143 %	5.386 %	100 %	
		Control Bajo	8.610 %	6.761 %	100 %	
		Control Medio	6.682 %	1.248 %	100 %	
		Control Alto	3.863 %	5.418 %	100 %	
tolerancia a cambio de volumen de inyección	El método será tolerante si al comparar la desviación absoluta de las concentraciones recuperadas promedio en cada condición de cambio con respecto a la condición original es menor o igual al 15%. Por lo menos el 80% del total de las muestras por nivel de concentración tengan desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal.	Curva de Calibración	% cumplimiento: 100 %			CUMPLE
			r: 0.9969			
			C.V. (%)	Dev. (%)	% Cumplimiento	
		Control Bajo	11.390 %	0.302 %	80 %	
		Control Medio	3.385 %	0.551 %	80 %	
	Control Alto	8.015 %	0.082 %	100 %		
Efecto Matriz	El porcentaje de coeficiente de variación (%CV) del efecto matriz normalizado de los lotes analizados y por nivel de concentración no debe ser mayor al 15%. No se puede excluir ningún punto de la prueba.		% CV		CUMPLE	
		Control Bajo	13.434 %			
		Control Medio	11.253 %			
		Control Alto	12.679 %			
Estabilidad de la muestra en automuestreador 10.4 horas	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Dev. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	6.275 %	4.788 %	80 %	
		Control Medio	4.190 %	4.756 %	100 %	
		Control Alto	2.659 %	1.623 %	100 %	



Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado obtenido			Dictamen	
Estabilidad de las soluciones Madre en Congelación durante 11 días	Las respuestas promedio obtenidas de las muestras preparadas con las soluciones almacenadas no deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 10% del promedio obtenido al emplear controles en sistema preparados con soluciones recién preparadas. El porcentaje del Coeficiente de variación debe ser menor o igual a 10%. No se puede excluir ningún resultado para los cálculos.	Días de estabilidad = 11		% Devs. Con respecto a solución	CUMPLE	
		Solución Madre de ISOTRETINOINA		4.638 %		
		Solución Madre de ACITRETINA		0.017 %		
Estabilidad de las soluciones de Trabajo en Congelación durante 11 días	Las respuestas relativas promedio obtenidas de las muestras preparadas con las soluciones almacenadas deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 10% del promedio obtenido de controles en sistema preparados con soluciones recién preparadas. El porcentaje del Coeficiente de variación debe ser menor o igual a 10%. No se debe excluir ningún resultado para los cálculos.	Días de estabilidad = 11		% Devs. Con respecto a solución	CUMPLE	
		Solución de Trabajo de ISOTRETINOINA		9.349 %		
		Solución de Trabajo de ACITRETINA		8.433 %		
Estabilidad de la muestra procesada durante 3.5 horas	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	7.413 %	5.011 %	80 %	
		Control Medio	4.188 %	9.586 %	100 %	
		Control Alto	8.087 %	1.996 %	80 %	
Estabilidad de la muestra a Temp. Ambiente durante 19.2 horas	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	4.296 %	3.621 %	80 %	
		Control Medio	2.173 %	11.326 %	80 %	
		Control Alto	1.844 %	12.863 %	80 %	
Estabilidad a largo plazo en congelación (-40 a -80 °C) durante 16 días	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	2.587 %	10.569 %	80 %	
		Control Medio	2.705 %	10.312 %	80 %	
		Control Alto	7.247 %	3.456 %	100 %	
Estabilidad de la muestra a 3 ciclo(s) de congelación/descongelación	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	10.001 %	1.391 %	80 %	
		Control Medio	3.222 %	5.877 %	100 %	
		Control Alto	1.372 %	8.583 %	80 %	
Estabilidad de la muestra evaporada post-extracción durante 3.5 horas	Por lo menos el 80% de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15% con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15% del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15%.		C.V. (%)	Desv. (%)	% Cumplimiento	CUMPLE
		Control Bajo	4.536 %	3.919 %	80 %	
		Control Medio	2.221 %	11.072 %	80 %	
		Control Alto	8.642 %	5.659 %	100 %	



7. Conclusiones.

- Se logró establecer las condiciones de detección y separación para desarrollar el método analítico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (UHPLC-MS/MS) por sus siglas en inglés, para la cuantificación de isotretinoína en plasma humano.
- El método desarrollado cumplió con los criterios establecidos en la NOM-177-SSA-2013 demostrando que es preciso, exacto, selectivo y reproducible en el rango de concentración de 10 a 600 ng/mL resultando útil para ser empleado en un estudio de bioequivalencia en el cual se pretenda cuantificar isotretinoína en plasma humano.
- El método de extracción líquido- líquido mostró ser eficiente y adecuado a partir de un volumen relativamente pequeño (200 μ L) resultando adecuado para utilizarse durante un estudio de bioequivalencia debido a que se obtiene poco volumen de las muestras y se requieren de tomas periódicas.

Perspectiva.

Dado que el estudio demostró cumplir con los requisitos establecidos en la NOM-177-SSA-2013, se propone emplearlo en un estudio de farmacocinética poblacional en individuos sanos, dentro de la Unidad de Farmacología Clínica Facultad de Medicina UNAM, así como herramienta de monitoreo clínico.



8. Referencias.

1. Loasa, O., Guerra, P., y López, J., (2009). Estudios de bioequivalencia: la necesidad de establecer la fiabilidad de los medicamentos genéricos. *Med. Exp. Salud Pública*, 26(4): 553-562.
2. 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 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 de biocomparabilidad.
3. Di Maio, R., y Moreale, J., (2012). Entendiendo los estudios de bioequivalencia. *Biomedicina*, 7(2): 6-14.
4. Akyol, M., y Özcelik S.,(2005). Non-Acne Dermatologic Indications for Systemic Isotretinoin. *Am J Clin Dermatol*, 6 (3): 175-184.
5. Lili, W., Jingjing, W., Ke, Z., Fang, C., y Yun, C., (2011). Determination of isotretinoin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56: 324-329.
6. Clarke's, *Analysis of Drug and Poisons*, London: Pharmaceutical Press. Electrónica versión, 2005.
7. Pubchem databases [en línea] [fecha de acceso 14 de diciembre de 2014]; URL disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?term=isotretinoin>
8. Brelsford, M., y Clarke, T., (2008). Preventing and Managing the Side Effects of Isotretinoin. *Semin Cutan Med Surg* 27:197-206.
9. Piquero, J., (2004). Isotretinoína: su uso en el acné del adolescente. *Dermatol Pediatr Lat* 2004; 2(1): 72-81.
10. Goulden V, Layton AM, Cunliffe WJ. (1994). Long-term safety of isotretinoin as treatment for fact acne vulgaris. *Br J Dermatol*.131:360-363.



11. Norris, J., y Cunliffe, WJ.(1987) Isotretinoin: An explanation for its long-term benefit. *Dermatológica*. 175 (suppl 1):133-137.
12. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 12^a ed. México: Mc Graw Hill; 2012.1936-1972.
13. Wardr, A., Brogden N.,Heel, T., Speight, G., y Avery, S., (2012). A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Acne and Other Skin Disorders. *Drugs*. 8(1): 6-37.
14. Alcalá, J., (2011). Depresión y crisis de pánico en acné tratado con isotretinoína. *Semergen*. 38(3):188-191.
15. Wyss, R., y Bucheli, F., (1997). Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolite, in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*. 700:31-47.
16. Gundersen, E., Lundanes, E., y Blomhoff, R., (1997). Quantitive high-performance liquid chromatography determination of retinoids in human serum using on-line solid phase extraction and switching . Determination of 9-cis retinoic acid, 13-cis retinoic acid, all-trans-retinoic acid.4-oxo-all-trans-retinoic acid and 4-oxo-13-cis-retinoic. *Journal of Chromatography*. 691:43-58.
17. Vane, F., Stoltenborg, J., y Buggé, C., (1982). Determination of 13-cis-retinoic acid and its major metabolite, 4-oxo-13-cis-retinoic acid, in human blood by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 227:471-484.
18. Besner, J., y Leclair R., (1980). High performance liquid chromatography of 13-cis-retinoic acid of endogenous retinol in human plasma. *Journal of Chromatography*. 183:346-351.
19. Teglia, C., Cámara, M., y Goicochea, H., (2014). Rapid determination of retinoica acid and its main isomers in plasma by second-order high



- performance liquid chromatography data modeling. *Anal Bioanal Chem.*406:7989-7998.
20. Frolik, C., Tavela, T., Peck, G., y Sporn, M. (1978). High-Pressure Liquid Chromatographic determination of 13-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid in human plasma. *Analytical Biochemistry.*86:743-750.
21. Teerlink, T., Copper, M., Klaassen, I., y Braakhuis B., (1997). Simultaneous analysis of retinol, all-trans-and 13-cis-4-oxoretinoic acid in plasma by liquid chromatography using on-column concentration after single-phase fluid extraction. *Journal of Chromatography.* 696:83-92.
22. Levebvre, P., Agadir, A., Cornic, M., Gourmel. B., Hue, B., Dreux, C., Degos, L., y Chomienne C. (1995). Simultaneous determination of all-trans and 13-cis retinoic acids and their 4-oxo metabolites by adsorption liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography.* 666:55-61.
23. Lanvers, C., Hempel, G., Blaschke, G., y Boos, J. (1996). Simultaneous determination of all-trans, 13-cis- and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 685:233-240.
24. Abo-Talib, N., Tammam, M., y Hassan, E. (2012) Determination of isotretinoin in human plasma: Application to pharmacokinetic study. *Elsevier.*50:127-132.
25. Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids in Analysis of Drugs in Biological Fluids. USA. CRC Press.1987: 25-31
26. Jiménez Vargas J. Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar doxiciclina en plasma mediante CLAR [Tesis licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
27. Amador Cabrera N. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar carvedilol en plasma y su aplicación en un estudio de biodisponibilidad en población



- mexicana. [Tesis licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
28. Grumbach, E., Arsenault, J., y McCabe, D. (2012). *Beguiners Guide to UPLC*. Milford: Waters Corporation.
29. Peña F. Zamora M. Reducción de costos y tiempos de análisis en la determinación de guaifenesina, dextrometorfano, metilparabeno y propilparabeno en un jarabe expectorante por Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) [Tesis licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
30. Capcha Espiniza H. Llanos Rebaza G. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú [Tesis licenciatura]. Perú; 2007.
31. Sacristan, M., Díaz, E., Alarcón, B., Vicente, C., y Legaz, ME. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. *Reduca* (biología). Serie técnicas y métodos. 4(3).48-78.
32. Gennaro, A.R., (2003). *Remington Farmacia* 20^a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana: 693.
33. Gienéz, Pérez A. (2012). Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por espectrometría de masas para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos en leche y tejido muscular de origen animal. Tesis de maestría en producción animal, Universidad Politécnica de Valencia.
34. Griffiths, WJ., Johnson, AP., Liu, S., Rai, Dk., y Wang Y. (2001). Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry, *Biochem J*. 355: 545-61.
35. Martínez M.A. Desarrollo y validación de un método analítico por UPLC-MS/MS para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en plasma humano. [Tesis licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.



36. Harris, D., (2001). *Análisis químico cuantitativo*. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=RFRfxIDEp9EC&pg=PA720&dq=componentes+de+un+espectro+C3%B3metro&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiZwaX1zLLUahVKJCYKHSJqBsYQ6AEITDAH#v=onepage&q=componentes%20de%20un%20espectro+C3%B3metro&f=false>.
37. Instituto de Salud Pública. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Guía Técnica No. 1.
38. Guidance for Industry. Method validation (2001) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
39. European Medicines Agency, (2011). Guideline on Bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use.
40. Briscoe, C., Stiles M. y Hage F. (2007). System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. *J. Pharma Biomed. Anal.* 44; 484-491.
41. Kebarle, P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* 35, 804-817.
42. King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 942-950.
43. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
44. Comisión de validación de métodos. Guía de Validación de Métodos analíticos 2ª ed. Colegio Nacional de Químicos Biológicos Ac. México. 2002.
45. USP 30-NF 25. United States of America, The United States Pharmacopeial convention. Vol. 1; 2007: 680-683.