



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)  
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TEOFILINA EN  
MUESTRAS SANGUÍNEAS**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS ANGEL YRRA DE LA CRUZ**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**AÑO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: Inés Fuentes Noriega

**VOCAL:** Profesor: Juan Manuel Rodríguez

**SECRETARIO:** Profesora: Ernestina Hernández García

**1er. SUPLENTE:** Profesora: Liliana Aguilar Contreras

**2° SUPLENTE:** Profesor: José Mojica Reyes

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA, TORRE DE INVESTIGACIÓN “DR. JOAQUÍN  
CRAVIOTO”**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. en F. Ernestina Hernández García**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.F.B. Mónica Janette Cervantes Arellano**

### **SUSTENTANTE (S):**

---

**Luis Angel Yrra de la Cruz**



## Contenido

<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>1. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Apnea del prematuro</b>	<b>5</b>
1.1.1. Tratamiento y control de la apnea del prematuro	5
<b>1.2. Asma</b>	<b>5</b>
1.2.1. Tipos de asma	6
1.1.2. Tratamiento y control del asma	6
<b>1.3. Teofilina</b>	<b>7</b>
1.3.1. Características fisicoquímicas	7
1.3.2. Mecanismo de acción	7
<b>1.4. Farmacocinética</b>	<b>8</b>
1.4.1. Farmacocinética de la teofilina	8
<b>1.5. Biodisponibilidad</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Tipos de estudios</b>	<b>11</b>
1.6.1. Estudios preclínicos	11
1.6.2. Estudios clínicos	11
<b>1.7. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos</b>	<b>11</b>
<b>1.8. Recolección de muestra</b>	<b>13</b>
1.8.1. Tarjetas de tamizaje neonatal	13
1.8.2. Recolección en tubos	14
<b>1.9. Extracción de fármacos en matriz biológica</b>	<b>14</b>
1.9.1. Precipitación de proteínas	14
1.9.2. Extracción líquido-líquido	15
1.9.3. Extracción en fase sólida	16
<b>1.10. Cromatografía de Líquidos</b>	<b>17</b>
1.10.1. Cromatografía de exclusión molecular	17
1.10.2. Cromatografía de intercambio iónico	17
1.10.3. Cromatografía de afinidad	17
1.10.4. Cromatografía de líquidos de Alta Resolución o Eficacia (HPLC)	17

1.10.5. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC)	18
1.10.6. Modos de separación en cromatografía	19
1.10.7. Calibración por estándares interno y externo.	20
<b>1.11. Tipos de detectores en cromatografía</b>	<b>21</b>
1.11.1. Detector UV/Visible	21
1.11.2. Detector de Índice de Refracción	21
1.11.3. Detector de fluorescencia	22
1.11.4. Detector de arreglo de fotodiodos	23
1.11.5. Detector de dispersión de luz evaporativa	24
1.11.6. Espectrometría de masas (MS)	25
<b>1.12. Método bioanalítico</b>	<b>30</b>
1.12.1. Validación de métodos bioanalíticos	30
1.12.1.1. Adecuabilidad o desempeño del sistema	31
1.12.1.2. Especificidad	31
1.12.1.3. Exactitud	31
1.12.1.4. Límite de cuantificación	31
1.12.1.5. Límite de detección	31
1.12.1.6. Linealidad	31
1.12.1.7. Precisión	31
1.12.1.8. Recobro	31
1.12.1.9. Repetibilidad	32
1.12.1.10. Reproducibilidad	32
1.12.1.11. Robustez	32
1.12.1.12. Estabilidad analítica de la muestra	32
1.12.1.13. Efecto de matriz	32
1.12.1.14. Efecto de acarreo	33
1.12.1.15. Efecto de dilución	33
<b>Objetivos</b>	<b>35</b>
Objetivo general	35
Objetivos particulares	35
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>36</b>
2.1. Materiales	37

<b>2.1.1. Mezclas cromatográficas</b>	<b>38</b>
<b>2.1.2. Preparación de disoluciones estándar de teofilina y etofilina</b>	<b>39</b>
<b>2.1.3. Preparación de disoluciones para extracción</b>	<b>41</b>
<b>2.1.4. Condiciones instrumentales</b>	<b>42</b>
2.1.4.1. Equipo para UPLC	42
<b>2.2. Métodos</b>	<b>43</b>
2.2.1. Desarrollo del método de extracción en HPLC-UV	43
2.2.2. Desarrollo del método bioanalítico en UPLC-MS/MS	46
2.2.3. Validación del método bioanalítico	50
2.2.4. Cuantificación de teofilina en plasma de un voluntario adulto sano en un estudio piloto de farmacocinética	58
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Desarrollo del método de extracción en HPLC-UV</b>	<b>60</b>
3.1.1. Extracción de la teofilina a partir de tarjetas Guthrie	60
3.1.2. Extracción de la teofilina a partir de muestras sanguíneas	62
<b>3.2. Desarrollo del método de extracción en UPLC-MS/MS</b>	<b>65</b>
3.2.1 Extracción a partir de tarjetas de tamizaje neonatal	66
3.2.2. Extracción a partir de plasma humano	67
<b>3.3. Validación del método bioanalítico</b>	<b>70</b>
3.3.1. Desempeño del sistema	70
3.3.2. Selectividad	71
3.3.3. Efecto de matriz	76
3.3.4. Efecto de acarreo	76
3.3.5. Curva de calibración	77
3.3.6. Precisión y exactitud	78
3.3.7. Estabilidad	80
3.3.8. Recobro	85
3.3.9. Cuantificación de teofilina en plasma de un voluntario sano	86
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>Referencias</b>	<b>91</b>

## ***Índice de figuras y tablas***

Figura 1. Estructura química de la teofilina .....	7
Figura 2. Mecanismo de acción de la teofilina .....	8
Figura 3. Proceso de separación de diferentes analitos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). .....	18
Figura 4. Esquema general del funcionamiento de un equipo de HPLC/UPLC y elución de una muestra.....	19
Figura 5. Separación de analitos por fase reversa. ....	20
Figura 6. Esquema de funcionamiento de un detector de índice de refracción (RI).....	22
Figura 7. Diseño óptico de un detector de fluorescencia Agilent 1100.....	23
Figura 8. Representación de un detector de arreglo de fotodiodos (PDA).....	24
Figura 9. Conformación de un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD).....	25
Figura 10. Representación del funcionamiento de un equipo de espectrometría de masas.....	26
Figura 11. Proceso de ionización por ESI.....	29
Figura 12. Esquema de espectrómetro de masas Waters Quattro Micromass .....	43
Figura 13. Metodología de extracción de la teofilina a partir de tarjetas de tamizaje neonatal. ....	45
Figura 14. Metodología de extracción de la teofilina a partir de muestras sanguíneas.....	46
Figura 15. Cromatogramas correspondientes a cinco extracciones de una concentración de 30 µg/mL de teofilina, a partir de las tarjetas Guthrie, utilizando la metodología original.....	60
Figura 16. Extracción de estándares a partir de tarjetas Guthrie .....	62
Figura 17. Extracción de curva de calibración en plasma, empleando el intervalo de concentraciones de 0.5 a 30 µg/mL. ....	63
Figura 18. Extracción de estándares de teofilina de concentración de 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL.....	64
Figura 19. Espectro de masas del ion padre para la teofilina .....	65
Figura 20. Espectro de masas del ion hijo para la teofilina .....	66
Figura 21. Prueba de curva de calibración para la evaluación del desarrollo del método. ....	70
Figura 22. Cromatogramas de selectividad a compuestos concomitantes. ....	73
Figura 23. Cromatogramas para la extracción de LIC utilizando EDTA como anticoagulante.....	74
Figura 24. Cromatogramas de la extracción de LIC utilizando Heparina 10 UI/mL como anticoagulante. ....	75
Figura 25. Comparación de las tres curvas de calibración evaluadas para la validación. ....	78
Figura 26. Perfil farmacocinético del voluntario 1. ....	87



Tabla 1. Valores de tmax y Cmax de la teofilina en diferentes formas farmacéuticas para diferentes poblaciones a nivel mundial. ....	9
Tabla 2. Métodos de extracción y análisis de la teofilina reportados por diferentes autores. ....	13
Tabla 3. Sustancias de referencia de teofilina y etofilina. ....	37
Tabla 4. Reactivos utilizados para la extracción del fármaco y para la elución cromatográfica. ....	38
Tabla 5. Disolventes para la fase móvil. ....	42
Tabla 6. Condiciones de adquisición para el detector MS/MS por el método de MRM. ....	47
Tabla 7. Condiciones de la fuente de ionización del detector MS/MS. ....	47
Tabla 8. Preparación de la curva de calibración y muestras control. ....	51
Tabla 9. Criterios de aceptación para la prueba de desempeño del sistema. ....	51
Tabla 10. Criterios de aceptación para la prueba de selectividad a compuestos endógenos. ....	52
Tabla 11. Criterios de aceptación para la prueba de selectividad a compuestos concomitantes y anticoagulantes. ....	53
Tabla 12. Fármacos utilizados para la prueba de selectividad a compuestos concomitantes. ....	53
Tabla 13. Criterio de aceptación para la prueba de efecto de matriz. ....	54
Tabla 14. Preparación de las disoluciones de reconstitución para efecto de matriz. ....	54
Tabla 15. Criterios de aceptación para la prueba de efecto de acarreo. ....	55
Tabla 16. Criterios de aceptación para la prueba de curva de calibración. ....	55
Tabla 17. Criterios de aceptación para la prueba de límite inferior de cuantificación. ....	56
Tabla 18. Criterios de aceptación para las pruebas de precisión y exactitud. ....	56
Tabla 19. Condiciones de almacenamiento de muestras para las pruebas de estabilidad. ....	57
Tabla 20. Criterios de aceptación para las pruebas de estabilidad. ....	58
Tabla 21. Criterio de aceptación para la prueba de recobro. ....	58
Tabla 22. Resultados del desempeño del sistema. ....	71
Tabla 23. Resultados de selectividad a compuestos endógenos. ....	72
Tabla 24. Resultados para la prueba de efecto de matriz. ....	76
Tabla 25. Resultados del efecto de acarreo. ....	77
Tabla 26. Resultados de la evaluación de curva de calibración. ....	77
Tabla 27. Parámetros de linealidad y modelo matemático que describen la curva de calibración. .	77
Tabla 28. Resultados de precisión intradía. ....	79
Tabla 29. Resultados de la precisión interdía. ....	79
Tabla 30. Resultados de la evaluación de la exactitud del método. ....	80
Tabla 31. Resultados de estabilidad de la muestra después de 12 h de su preparación y almacenamiento a 4°C. ....	81
Tabla 32. Resultados de estabilidad a los 8 días de preparación de las muestras y almacenamiento en utracongelación a -80°C. ....	81
Tabla 33. Resultados de estabilidad de muestra procesada sin reconstituir. ....	82
Tabla 34. Resultados para la muestra procesada reconstituida. ....	82

Tabla 35. Resultados de la estabilidad en ciclos de congelación-descongelación. ....	83
Tabla 36. Resultados de la estabilidad en automuestreador. ....	84
Tabla 37. Resultados de estabilidad en solución para muestras control alta y baja. ....	84
Tabla 38. Estabilidad en solución para el estándar interno .....	85
Tabla 39. Resultados de la prueba de recobro. ....	86
Tabla 40. Resultados de la concentración plasmática de teofilina en el voluntario 1 utilizando el método bioanalítico validado. ....	86

# **INTRODUCCIÓN**

## **Introducción**

La apnea del prematuro es una patología que comúnmente mantiene a esta población en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales por períodos prolongados. Esta enfermedad tiene un índice de mortalidad del 60% y se ha reportado que en el 20% de los sobrevivientes puede haber secuelas neurológicas<sup>9</sup>.

El asma es una enfermedad que afecta a una gran cantidad de personas. La población de 0-14 años de edad es la más afectada seguida de las personas entre 15-64 años de edad<sup>1</sup>.

En el Instituto Nacional de Pediatría se desarrolló una formulación en solución oral de teofilina para el tratamiento de la apnea del prematuro y del asma alérgico en niños de 0 a 18 años de edad. Al ser una nueva forma farmacéutica, se debe conocer su farmacocinética; por esta razón se realizó un ensayo preclínico en un modelo de asma alérgico en ratones BALB/c<sup>3</sup>, con la finalidad de escalarlo a un modelo clínico. Para determinar los parámetros farmacocinéticos, se evaluaron muestras de sangre recolectadas en tarjetas Guthrie y muestras de sangre reconstituidas.

En el área farmacéutica, el desarrollo de un método analítico es necesario para poder identificar a una o más sustancias de interés mediante alguna característica del analito y compararla con un criterio de aceptación<sup>4,5</sup>. Los métodos analíticos más usados son los cromatográficos, en especial la cromatografía de líquidos, debido a que es una técnica con alta sensibilidad<sup>6</sup>.

La NOM-177-SSA1-2013 indica que la validación del método analítico es un requisito para el análisis de muestras biológicas y que deben cumplir con las características de desempeño señaladas<sup>7</sup>. El objetivo de la validación es demostrar que un procedimiento analítico cumple con los propósitos para el que fue diseñado<sup>8</sup>, de modo que los resultados obtenidos serán confiables y contemplarán cualquier desviación sobre el método.

Cabe señalar que no fue posible desarrollar ni validar el método analítico para las muestras del modelo animal, ya que las concentraciones eran muy bajas y la

extracción no era eficiente, así como la detección. Por esta razón se decidió desarrollar la metodología utilizando concentraciones terapéuticas para humanos, debido a que es el siguiente paso de evaluación para este medicamento. Además, se cambió el método de detección de UV a MS/MS, al ser este último un método más sensible y selectivo.

# **1. MARCO TEÓRICO**

## **1. Marco Teórico**

### **1.1. Apnea del prematuro**

Esta enfermedad se presenta por una inmadurez en el sistema de control respiratorio, el cual anatómicamente presenta disminución de las conexiones sinápticas, disminución de la arborización dendrítica y pobre mielinización.

Los pacientes con esta enfermedad presentan menor respuesta ventilatoria, alteración en la respuesta aferente de vías aéreas, falta de tono muscular de vía aérea superior, entre otros. Derivado de esta enfermedad pueden presentarse secuelas neurológicas en el 20% de los sobrevivientes, e incluso el paciente puede llegar a la muerte en el 60% de los casos.

De acuerdo con la Secretaría de Salud, la apnea tiene una incidencia del 25% en recién nacidos pretérmino con peso menor de 2500 gramos y entre el 84 – 100% en los que pesan menos de 1000 gramos<sup>9</sup>.

#### **1.1.1. Tratamiento y control de la apnea del prematuro**

Para controlar la apnea en el recién nacido prematuro, el tratamiento de primera elección es el farmacológico. Los fármacos que se usan son las metilxantinas, en específico, cafeína, teofilina y aminofilina, ya que estimulan el esfuerzo respiratorio<sup>9,10</sup>.

En el recién nacido prematuro estos fármacos reducen los eventos de apnea, incrementan el volumen minuto, reducen la fatiga diafragmática, disminuye la displasia broncopulmonar, etc<sup>9</sup>.

### **1.2. Asma**

Es una enfermedad respiratoria que resulta de factores ambientales y genéticos, siendo la enfermedad crónica más común en la infancia. Los estudios epidemiológicos en América Latina han revelado la prevalencia del asma con cifras de 5.7 a 16.5% en la población pediátrica<sup>1</sup>. Se caracteriza por una inflamación del músculo liso bronquial que conlleva a una disminución del flujo de aire, pudiendo

generar un broncoespasmo. Los principales síntomas son sibilancias, tos, disnea y opresión del pecho<sup>9</sup>.

### **1.2.1. Tipos de asma**

De acuerdo con los mecanismos fisiopatogénicos y las manifestaciones clínicas, el asma puede presentarse en diferentes tipos, tales como: asma alérgica, asma no alérgica, eosinofílica, neutrofílica, de inicio temprano y de inicio tardío. El asma alérgica es el tipo de asma más común presente en los infantes y en las personas mayores de 50 años. Es producida por una respuesta exacerbada del sistema inmunológico cuando el individuo entra en contacto con una gran variedad de alérgenos como los ácaros del polvo, polen, animales, entre otros. De acuerdo con la gravedad de la enfermedad se clasifica como episódica ocasional, episódica frecuente, persistente moderada y persistente grave<sup>1</sup>.

### **1.1.2. Tratamiento y control del asma**

El asma es una enfermedad que se controla de forma farmacológica y no farmacológica y depende de la gravedad con la que se presente.

El tratamiento farmacológico consta de agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de corta y larga acción para el tratamiento del asma ocasional, glucocorticoides para el asma frecuente, moderada y grave y metilxantinas para el asma grave<sup>1</sup>. Cabe mencionar que este tratamiento es general y se deben determinar las mejores terapias según la edad del paciente y la gravedad.

Los medicamentos de primera elección son los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos, tales como salbutamol y terbutalina debido a su rápida acción, tienen una cantidad muy reducida de efectos adversos, tienen la acción broncodilatadora más potente y a dosis terapéuticas carecen de efectos sobre el sistema cardiovascular. Los glucocorticoides se administran durante el ataque agudo cuando los  $\beta_2$  adrenérgicos no surten el efecto deseado<sup>1,2</sup>.

Las metilxantinas como la teofilina y la aminofilina constituyen las líneas finales del tratamiento de esta enfermedad, ya que se administran cuando las crisis severas no son controladas<sup>2</sup>. Sin embargo, debido a su estrecho margen terapéutico (10-15



$\mu\text{g/mL}$ , para el caso de teofilina), se debe vigilar cuidadosamente su administración para permanecer en la concentración efectiva<sup>10</sup>.

### 1.3. Teofilina

La 1,3-dimetilxantina, mejor conocida como teofilina, es una metilxantina estructuralmente similar a la cafeína y se encuentra en diversos productos alimenticios como el té verde y el té negro. Posee efectos diuréticos, actúa como relajante del músculo liso, produce dilatación bronquial y actúa como estimulante del sistema nervioso central<sup>11,12</sup>. Perteneció a la clase I del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (alta solubilidad y alta permeabilidad)<sup>13,15,16</sup>, pero se ha reportado también que pertenece a la clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad)<sup>17</sup>.

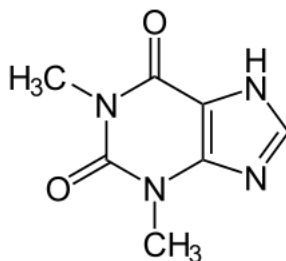


Figura 1. Estructura química de la teofilina

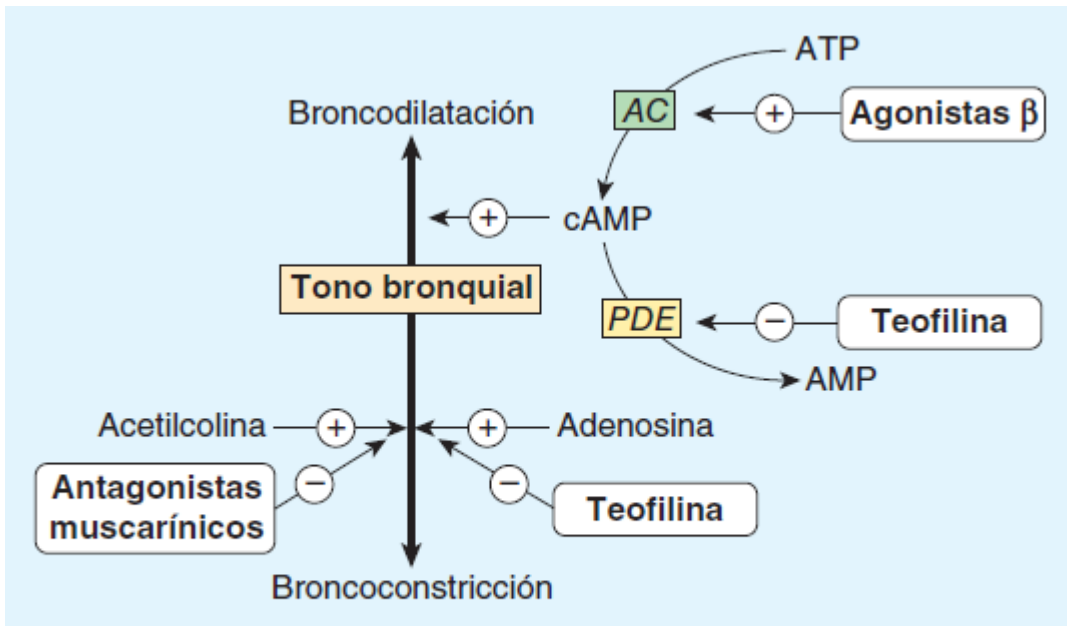
#### 1.3.1. Características fisicoquímicas

La teofilina, de fórmula empírica  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$ , es un alcaloide de masa molecular de 180.16 g/mol. De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es un fármaco ligeramente soluble en etanol y poco soluble en agua. Es soluble en cloroformo (9.1 mg/mL), soluble en  $\text{NH}_4\text{OH}$  (50 mg/mL), soluble en HCl 0.1 M y en NaOH 0.1 M. Tiene diferentes valores de logP reportados en la literatura: -0.02, -0.26, -0.77 y posee un pKa de 8.81<sup>12,14</sup>.

#### 1.3.2 Mecanismo de acción

El efecto antiasmático ocurre a través de la inhibición competitiva de las fosfodiesterasas (PDE) tipo III y IV, produciendo una disminución en las concentraciones de los segundos mensajeros AMPc (adenosín monofosfato cíclico), lo que resulta en una respuesta de broncodilatación. También actúa como antagonista sobre los receptores de adenosina A2B e impide la broncoconstricción.

Cuando hay estados inflamatorios, la teofilina activa las deacetilasas de histona para prevenir la transcripción de genes proinflamatorios<sup>11,15</sup>. Al parecer, la teofilina aumenta la fuerza de contracción de los músculos del diafragma al promover la utilización del calcio mediante canales asociados a adenosina<sup>16</sup>.



Fuente: Bertram G. Katzung, Anthony J. Trevor: *Farmacología básica y clínica*, 13e: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Figura 2. Mecanismo de acción de la teofilina.

## 1.4. Farmacocinética

Consiste en el curso temporal de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco, compuesto o nueva entidad química después de la administración en el organismo<sup>18</sup>.

### 1.4.1. Farmacocinética de la teofilina

Cabe señalar que, para la nueva formulación con teofilina en solución oral, aún no se ha determinado la farmacocinética. Sin embargo, ya se encuentra reportada esta información para las presentaciones en elixir y tabletas de liberación prolongada.

En la tabla 1 se presenta la información de tiempo máximo (t<sub>max</sub>) y concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) de la teofilina en diferentes poblaciones del mundo y con diferentes formulaciones.

<b>País</b>	<b>Población</b>	<b>Forma farmacéutica</b>	<b>t máx</b>	<b>Cmáx</b>
Irán	Voluntarios sanos	-	2.000 ± 0.707h	6.040 ± 0.509µg/mL
Uruguay	Voluntarios sanos	Elíxir 567mg/100mL	-	11.56 ± 2.01 mg/L
		Capsulas liberación prolongada 200mg		6.57 ± 1.90 mg/L 5.10 ± 1.48 mg/L
Francia	Voluntarios sanos	½ tableta de 125mg	1.6 (1.0-2.0) h	4.1 (3.0-6.7) mg/L
		1 tableta de 250mg	1.8 (1.0-3.0) h	8.0 (5.0-12.2) mg/L
		1.5 tableta de 375mg	1.6 (0.5-3.0) h	10.5 (6.7-15.0) mg/L
		2 tabletas de 500mg	2.0 (0.5-3.0) h	15.1(10.7-20.5) mg/L
China	Voluntarios sanos	Tabletas 100 mg	1.60 ± 0.22 h	1882.11 ± 154.2 mg/L
Reino Unido	Voluntarios sanos	Tabletas 125 mg	1 h	3.8 ng/mL
Estados Unidos	Voluntarios sanos	Cápsulas de 200mg	1.3 h (71%) 1.4 h (55%) 1.3 h (69%)	5.4 µg/mL (17%) 5.5 µg/mL (19%) 5.3 µg/mL (21%)
Japón	Voluntarios sanos	Liberación sostenida pediátrico 20% (1g)	3.6 ± 0.8 h 3.5 ± 0.9 h 3.64 ± 0.81 h 3.45 ± 0.93 h 7.4 ± 0.99 h 4.53 ± 1.12 h 3.90 ± 1.59 h 4.00 ± 1.03 h 4.7 ± 1.0 h 4.5 ± 1.1 h 2.86 ± 0.74 h 3.43 ± 0.34 h	3.08 ± 0.5 µg/mL 3.23 ± 0.47µg/mL 3.26 ± 0.46µg/mL 2.83 ± 0.33µg/mL 3.70 ± 0.37µg/mL 3.52 ± 0.38µg/mL 3.70 ± 0.37µg/mL 3.52 ± 0.38µg/mL 3.26 ± 0.46µg/mL 2.83 ± 0.33µg/mL 3.91 ± 0.55µg/mL 3.57 ± 0.58µg/mL
		Jarabe para reconstituir 20% pediátrico (1g)	6.16 ± 2.14 h 5.63 ± 1.67 h 6.16 ± 2.14 h 5.63 ± 1.67 h	3.34 ± 0.47µg/mL 3.32 ± 0.44µg/mL 3.34 ± 0.47µg/mL 3.32 ± 0.44µg/mL

Tabla 1. Valores de tmax y Cmax de la teofilina en diferentes formas farmacéuticas para diferentes poblaciones a nivel mundial<sup>62</sup>.

#### 1.4.1.1 Absorción

Después de una dosis oral de elíxir o tabletas de liberación inmediata, las concentraciones máximas de teofilina se alcanzan entre 1 y 2 h. La absorción ocurre de manera rápida y completa.

Para las tabletas de liberación prolongada (400 mg), el pico de concentración ocurre entre 8.1 h (ayuno) y 12.8 h (después de ingerir alimentos)<sup>16</sup>, de modo que la ingesta de alimentos genera un retraso en la absorción, aunque éste no es clínicamente significativo.

#### **1.4.1.2. Distribución**

La teofilina tiene una unión a proteínas del 40%, principalmente a albúmina. Tiene un volumen de distribución de 0.45 L/kg, con un rango de 0.3 L/kg a 0.7 L/kg. La teofilina libre se distribuye por toda el agua corporal, pero muy poco en la grasa corporal<sup>16</sup>.

#### **1.4.1.3 Metabolismo**

La teofilina sufre metabolismo hepático a través de las enzimas CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A3, ocurriendo desmetilación para dar lugar a los metabolitos 1-metilxantina y 3-metilxantina e hidroxilación a ácido 1,3-dimetilúrico<sup>11,16</sup>. Cerca del 6% de la dosis administrada sufre de N-metilación para producir cafeína, y junto con la 3-metilxantina son los únicos metabolitos con actividad farmacológica<sup>11</sup>.

#### **1.4.1.4. Eliminación**

En neonatos, la excreción de la teofilina ocurre por vía renal en un 50% en su forma inalterada, mientras que en infantes mayores de 3 meses la eliminación ocurre en un 10%<sup>11,16</sup>.

La vida media de eliminación de la teofilina varía según la edad y las enfermedades concomitantes u otros problemas de salud presentes. Para neonatos prematuros de 3 a 15 días de nacimiento tiene una media de 30 h; los neonatos prematuros de 25 a 57 días presentan una disminución a 20 h; en neonatos de término de 1 a 2 días de nacidos se tiene una media de 25.7 h, mientras que los de 3 a 30 semanas presentan una vida media de eliminación de 11 h. En niños de 1 a 4 años y de 6 a 17 años la media corresponde a 3.4 h y 3.7 h, respectivamente. Durante el curso del hipotiroidismo la vida media se encuentra en 11.6 h, mientras que en el hipertiroidismo se reduce a 4.5 h<sup>16</sup>.

## **1.5. Biodisponibilidad**

Corresponde a la cantidad de fármaco que llega en forma activa a la circulación sistémica y el tiempo que requiere para ejercer su efecto en el sitio de acción<sup>17</sup>. La biodisponibilidad depende de las características fisicoquímicas del fármaco, así como de los componentes y manufactura de la forma farmacéutica. También depende de las características propias del individuo.

## **1.6. Tipos de estudios**

### **1.6.1. Estudios preclínicos**

Son los ensayos realizados *in vitro* o en animales de laboratorio que demuestran la seguridad, eficacia y calidad de un producto farmacéutico y cuyos resultados pueden ser extrapolados a los humanos<sup>7</sup>.

### **1.6.2. Estudios clínicos**

Un estudio o ensayo clínico es una evaluación experimental de un medicamento en seres humanos para evaluar su seguridad y eficacia<sup>23</sup>.

Los estudios clínicos se dividen en cuatro fases:

- Fase I: se estudia la seguridad del fármaco, la vía de administración y dosis adecuadas. En esta fase se utilizan grupos pequeños de sujetos de investigación.
- Fase II: se evalúa la eficacia y seguridad del medicamento en un grupo de mayor número que en la fase I.
- Fase III: se confirman los beneficios terapéuticos y la seguridad del medicamento en un grupo de pacientes definido y de mayor número.
- Fase IV: una vez que el medicamento se comercializa, se mantiene bajo vigilancia y se busca más información en una población mucho más amplia.

## **1.7. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos<sup>24-27</sup>**

El análisis cuantitativo determina la concentración de un analito en específico en una matriz en donde se encuentran otros compuestos. Debido a que los fluidos biológicos contienen diversas sustancias además del analito de interés, se requiere en la mayoría de las ocasiones un método de purificación previo al análisis, como

puede ser la cromatografía de líquidos. Existe otra técnica como la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) que es apropiada cuando el analito está presente en una matriz compleja; de esta manera, los compuestos interferentes se remueven.

Los fluidos biológicos que se analizan con mayor frecuencia son sangre total, plasma, suero y orina. Sin embargo, debido a que en sangre total existe una mayor cantidad de compuestos interferentes, a diferencia de las otras matrices, se analiza en menor medida. No obstante, cuando se estudian animales pequeños o se realiza toxicología forense, el análisis de sangre total se convierte en algo imprescindible.

Existen otros fluidos biológicos menos comunes para analizar, tal y como la bilis, el sudor, la saliva, la leche materna y el fluido espinal.

- **Sangre:** es un líquido viscoso de color rojo brillante a oscuro que contiene proteínas solubilizadas, grasas y sólidos disueltos. Está compuesta de elementos formes (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) suspendidos en una matriz extracelular llamada plasma. De los fluidos biológicos mayormente utilizados es el más complejo. Representa alrededor del 8% de la masa corporal.
- **Plasma y suero:** el plasma es una solución acuosa amarillenta en donde se transportan electrolitos, nutrientes, metabolitos, proteínas, oligoelementos y más. Es el fluido más usado para la cuantificación de fármacos debido a su fácil obtención y a su estabilidad. La fase líquida de la sangre coagulada se denomina suero; este se diferencia del plasma por la ausencia de fibrinógeno y otras proteínas que se consumen durante el proceso de coagulación.
- **Orina:** es un líquido que contiene diversos productos de desecho del metabolismo, especialmente urea y otros compuestos nitrogenados (ácido úrico, hipuratos, creatina y creatinina) que son filtrados de la sangre por los riñones. El estado de la orina varía entre cada individuo y puede ser un factor determinante en la cuantificación de diferentes fármacos, principalmente su solubilidad. Para poder analizar fármacos en esta matriz debe encontrarse

por lo menos el 50% en su forma inalterada, de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013.

Existen diversos métodos de extracción y cuantificación de la teofilina reportados en la literatura y en la tabla 2 se hace mención de algunos de ellos.

<b>Autor(es)</b>	R. Nageswara et. al <sup>28</sup>	Chae, J. et. al <sup>29</sup>	Kertys, M., Urbanova, A., Mokry, J. <sup>30</sup>
<b>Matriz biológica</b>	Sangre de rata en papel y orina	Plasma de rata	Plasma de cobayo
<b>Fase móvil</b>	Acetato de amonio 20mM a pH 3.5/acetonitrilo (75:25% v/v)	Ácido acético al 0.05% en metanol/agua 90:10	Ácido fórmico al 0.1%/acetonitrilo.  La elución se realiza en gradiente de ácido fórmico.
<b>Fase estacionaria</b>	C18 250x4.6 mm	C18 50x4.60 mm	CORTECS UPLC HILIC 2.1x50 mm
<b>Detector</b>	MS/MS	MS/MS	MS/MS
<b>Método de extracción</b>	Precipitación de proteínas con metanol puro.	Precipitación de proteínas con metanol.	Precipitación de proteínas con acetonitrilo.
<b>Estándar interno</b>	Cafeína	Clorzasona	Teofilina deuterada

Tabla 2. Métodos de extracción y análisis de la teofilina reportados por diferentes autores.

## 1.8. Recolección de muestra

### 1.8.1. Tarjetas de tamizaje neonatal

También conocidas como tarjetas Guthrie, son soportes compuestos por 100% de algodón en los que se recolectan muestras sanguíneas de neonatos para ser procesadas y determinar ciertos analitos<sup>19</sup> con la finalidad de reducir el volumen de muestra requerido. La sangre recolectada se deja secar y se almacena para su posterior análisis.

### **1.8.2. Recolección en tubos**

Para la obtención y almacenamiento de muestras sanguíneas es posible utilizar jeringas o tubos de vidrio o plástico que cuentan con sistema de vacío. Dependiendo de la matriz a analizar se selecciona el tubo que mejor se adapte a las necesidades. Para la obtención de plasma se utilizan tubos con anticoagulantes como heparina sódica o de litio, EDTA, CPD (Citrato, Fosfato, Dextrosa), entre otros. Para obtener suero se pueden utilizar tubos con gel activador de coágulo que promueven la separación de la fase líquida de la sangre.

La acción de los anticoagulantes inhibe alguno de los pasos de la hemostasia, por ejemplo, la heparina se une a la antitrombina III acelerando la inhibición de la trombina y del factor Xa impide la conversión de fibrinógeno a fibrina<sup>29,30</sup>; el EDTA actúa mediante un efecto quelante sobre el  $\text{Ca}^{2+}$ , al fijarlo, impide la activación de la trombina y la conversión de fibrinógeno en fibrina. Como anticoagulante, se usan las sales de potasio del EDTA, ya que estas sales son más solubles en la sangre que las de sodio<sup>31</sup>.

### **1.9. Extracción de fármacos en matriz biológica**

Los métodos comúnmente empleados para extraer un fármaco de una matriz biológica son los siguientes: precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

#### **1.9.1. Precipitación de proteínas<sup>32,33</sup>**

Para precipitar proteínas existen diferentes principios, los cuales incluyen la disminución de la solubilidad a través de sales, solventes y cambios en el pH, así como la desnaturalización selectiva mediante modificación de la temperatura e igualmente del pH.

##### **1.9.1.1. Efecto de las sales**

La adición de sales elimina el agua de las proteínas hidratadas, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente. Se usan sales de diferente naturaleza y se prefieren aquellas que contengan cationes monovalentes y aniones polivalentes; un ejemplo de estas sales es el sulfato de amonio, el cual



posee una alta solubilidad. Se recomienda realizar el proceso de “salado” con el reactivo sólido y no líquido para evitar su dilución posterior.

#### **1.9.1.2. Efecto de los disolventes orgánicos**

Esta técnica sigue el principio de disminución de la solubilidad por efecto de la constante dieléctrica. En los solventes orgánicos como acetona y metanol, agentes precipitantes ampliamente utilizados, la constante dieléctrica es menor que la del agua, y como consecuencia, se incrementan las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y se producen agregados de las proteínas que terminan por precipitar. El uso de solventes orgánicos actúa de manera sinérgica con la precipitación por sales, de manera que se puede aumentar la eficiencia de la extracción.

Además de los disolventes mencionados, se emplean otros como acetonitrilo, ácido tricloroacético o ácido metafosfórico.

#### **1.9.1.3. Efecto del pH y la temperatura**

Las proteínas poseen una propiedad llamada anfoterismo, en la que pueden presentar cargas positivas o negativas dependiendo del valor de pH del medio. Cuando se neutraliza la carga neta de la proteína, se dice que se ha alcanzado el valor de su punto isoeléctrico (pI) y es en este valor cuando se disminuye su solubilidad. Sin embargo, esta técnica de extracción dependerá en gran medida de la estabilidad de los analitos para evitar su degradación.

El efecto de la temperatura aumenta la energía cinética de la molécula, por lo que la proteína pierde estabilidad y se desnaturaliza. Al desnaturalizarse, se exponen los enlaces hidrofóbicos que producen agregación al interactuar con el medio hidrofílico y ocurre la precipitación. De la misma manera que con el pH, se debe considerar la estabilidad de los analitos para emplear esta técnica.

#### **1.9.2. Extracción líquido-líquido<sup>34,35</sup>**

La extracción líquido-líquido es una técnica muy frecuente para aislar compuestos orgánicos de una muestra líquida. Generalmente, la matriz en donde se encuentra el compuesto es de naturaleza acuosa, por lo que los solventes utilizados suelen ser no polares. En esta técnica se adiciona un solvente inmiscible a la matriz que

contiene el analito y se mezclan vigorosamente para promover la transferencia del analito de la fase acuosa a la fase orgánica. La transferencia del analito dependerá de su solubilidad en cada fase y de su coeficiente de reparto.

Una forma de predecir la proporción de concentraciones en que se encontrará distribuido el analito es con el valor de log P, el cual se define en la siguiente ecuación:

$$\log P = \log \frac{[\text{Analito}]_{\text{fase orgánica}}}{[\text{Analito}]_{\text{fase acuosa}}^{\text{no ionizado}}}$$

En esta ecuación se observa que el analito debe encontrarse en su forma no ionizada para efectuarse el reparto, de esta manera el pH se debe ajustar a un valor tal que el analito no posea carga para que se extraiga la mayor cantidad del mismo. Si el log P es mayor que cero, significa que habrá mayor proporción de analito en la fase orgánica; contrariamente, si es menor que cero, menor cantidad del analito se transferirá en el disolvente de extracción.

### **1.9.3. Extracción en fase sólida<sup>32,36</sup>**

En años recientes se ha aumentado el uso de la extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction SPE) debido a que permiten la separación de muchas clases de compuestos con propiedades fisicoquímicas muy diferentes. En esta técnica se utiliza una resina de copolímero con propiedades de intercambio iónico y fuerzas hidrofóbicas que permiten obtener extractos muy limpios con alta eficiencia de extracción.

Las ventajas de este tipo de extracción es que consume doce veces menos tiempo y es cinco veces menos cara que la extracción líquido-líquido. Esta técnica tiene gran aplicación en el campo de la toxicología forense para el análisis de drogas de abuso en orina, en la industria alimentaria para el análisis de metales y en la biofarmacia para monitorear fármacos.

## **1.10. Cromatografía de Líquidos<sup>37-39</sup>**

Es una técnica de separación de los componentes que se encuentran en mezclas en estado líquido. La separación ocurre por el grado de afinidad de los analitos a una fase estacionaria que eluyen gracias a una fase móvil.

La cromatografía de líquidos se clasifica según las características de la fase estacionaria y las interacciones que tiene con los analitos.

### **1.10.1. Cromatografía de exclusión molecular**

Se usa principalmente para la separación de proteínas, la cual ocurre por la diferencia en el tamaño de las mismas. Las moléculas viajan a través de una matriz porosa, generalmente conformada por un gel insoluble (dextrano, agarosa o poliacrilamida), en la que se retienen por más tiempo aquellas de menor tamaño, mientras que las de mayor tamaño tendrán tiempos de retención más cortos.

### **1.10.2. Cromatografía de intercambio iónico**

La fase estacionaria posee grupos funcionales cargados positiva o negativamente, según la naturaleza del analito. La separación ocurre por fuerzas electrostáticas o iónicas en las que se retendrán con mayor fuerza aquellas moléculas que presentan una carga opuesta a la de la resina. Las resinas catiónicas, cargadas negativamente, suelen contener grupos  $\text{COO}^-$ , mientras que las resinas aniónicas suelen contener grupos  $\text{NH}^+$ .

### **1.10.3. Cromatografía de afinidad**

La fase estacionaria consta de un ligando inmovilizado a la resina. La separación en esta técnica posee una alta selectividad, ya que solamente se une el sustrato específico del ligante, mientras que los demás componentes de la muestra no presentan interacciones con la fase estacionaria.

### **1.10.4. Cromatografía de líquidos de Alta Resolución o Eficacia (HPLC)**

Es un tipo de cromatografía en columna en el que, por acción de una bomba, se hace pasar una mezcla de analitos mediante el flujo de un disolvente o mezcla de disolventes conocido como fase móvil. La mezcla de fase móvil y analitos eluyen a través de una fase estacionaria, también llamada columna cromatográfica, y estos

últimos se separan de acuerdo con las interacciones que presentan con la fase estacionaria; estas interacciones pueden ser hidrofóbicas, polares o iónicas, según la naturaleza del analito y de la columna. En la figura 2 se muestra el proceso general de separación que sufren los analitos.

A diferencia de las cromatografías de líquidos convencionales, en HPLC se puede llegar a trabajar con presiones de hasta 6000 psi y el tamaño de partícula de las columnas es menor que  $10 \mu\text{m}^5$ .

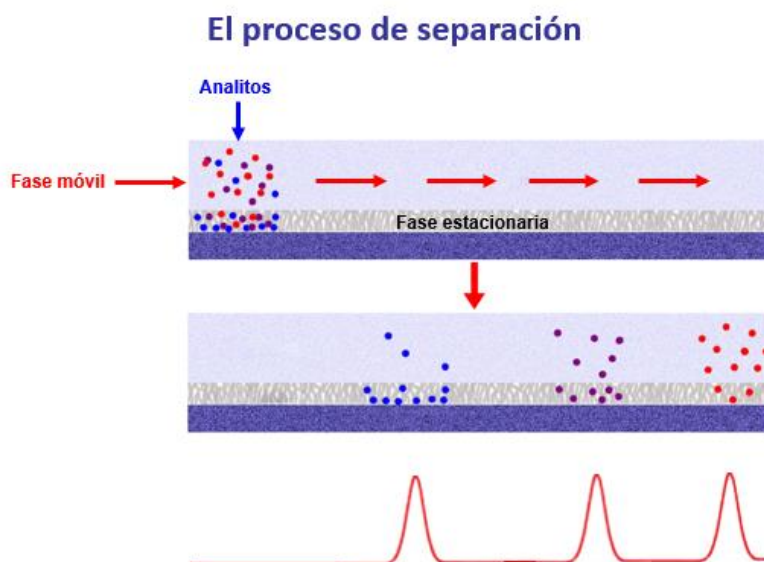


Figura 3. Proceso de separación de diferentes analitos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Imagen disponible en <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>

Una vez separados los analitos, se introducen en un sistema de detección que se selecciona en función de la naturaleza de estos. El proceso de elución de una muestra en un cromatógrafo de líquidos se resume en la figura 3.

#### 1.10.5. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC)

La técnica de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) es una técnica analítica de separación y cuantificación que se basa en la elución de una muestra mediante una fase móvil líquida sobre una fase estacionaria sólida y su posterior detección. La separación ocurre por interacciones intermoleculares que dependen de la naturaleza de los analitos, la fase móvil y la fase estacionaria.

A diferencia de la cromatografía de líquidos de alta resolución, en UPLC se trabaja con presiones por encima de 6000 psi (400 bar), lo que resulta en una separación más eficiente<sup>6</sup>. Además, las columnas para UPLC poseen un tamaño de partícula menor a 2  $\mu\text{m}$ .

Gracias a esto es posible analizar un gran número de muestras: farmacéuticas, alimenticias, forenses, matrices medioambientales, muestras químicas industriales, etc.

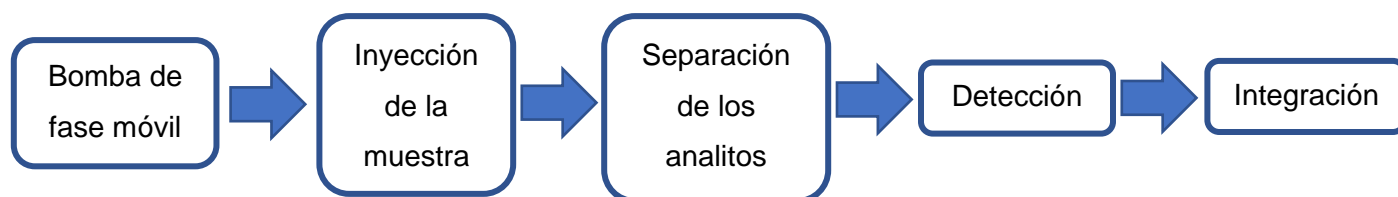


Figura 4. Esquema general del funcionamiento de un equipo de HPLC/UPLC y elución de una muestra.

#### 1.10.6. Modos de separación en cromatografía<sup>37</sup>

La cromatografía evolucionó a partir del uso de una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, dándosele el nombre de *separación por fase normal*. Sin embargo, en este modo de separación no se contemplaron aquellos analitos de naturaleza no polar y con características hidrofóbicas; por ello se realizó una variación en la que la fase estacionaria era de naturaleza no polar y la fase móvil de características polares, de ahí que se le nombrara a la separación *fase reversa*.

Actualmente, la separación por fase reversa es muy utilizada puesto que muchos de los analitos de interés son compuestos orgánicos de baja o incluso nula polaridad y de carácter hidrofóbico. En la fase reversa se utilizan fases estacionarias hidrofóbicas no polares como es el caso de la octadecilsilano (C18), aunque existen muchos otros tipos de columnas. La figura 4 representa las interacciones que ocurren con analitos de distinta polaridad durante la fase reversa.

## El proceso de separación

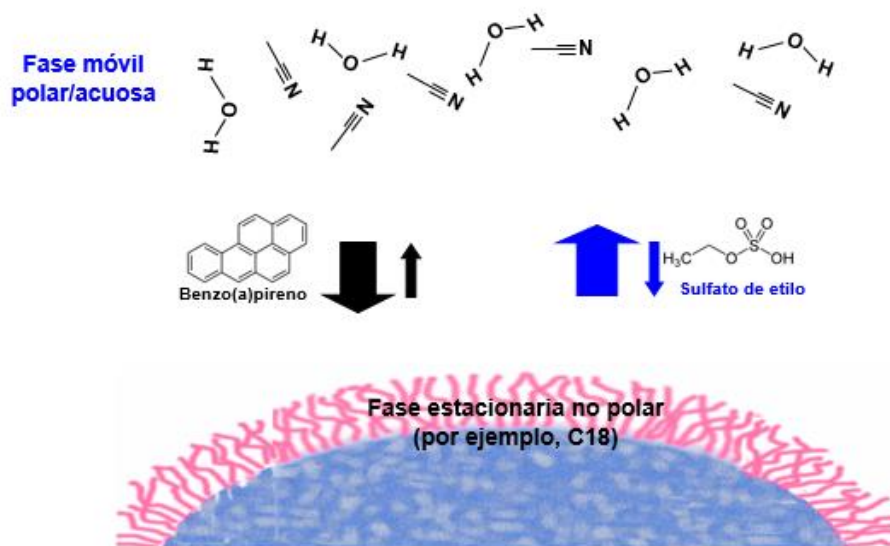


Figura 5. Separación de analitos por fase reversa. El Benzo(a)pireno, al ser un compuesto no polar, tiene mayor afinidad a la fase estacionaria de C18. El sulfato de etilo es un compuesto más afín a la fase móvil, por lo que presentará menor interacción con la fase estacionaria. Imagen disponible en: <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>

### 1.10.7. Calibración por estándares interno y externo.

Un estándar interno es una sustancia de concentración conocida y distinta del analito, pero con comportamiento similar, que se añade a una muestra problema. Este tipo de calibración es útil cuando la cantidad de muestra analizada o la respuesta del instrumento tienen variaciones que son difíciles de controlar o cuando son poco reproducibles. También son útiles cuando se pueden dar pérdidas de muestra durante la metodología analítica<sup>40</sup>.

La calibración por estándar externo se aplica en la determinación de un analito en donde los componentes de la matriz y los reactivos utilizados no generan interferencias; en otras palabras, se utiliza cuando no hay efecto de matriz. También se pueden utilizar cuando la contribución de los interferentes se mantiene constante, de tal manera que se pueda realizar la corrección del error por interferente<sup>41</sup>.

Todos los estándares de calibrado deben aproximarse tanto en la concentración del analito como en su composición para que ambos sufran el mismo proceso de análisis.

### **1.11. Tipos de detectores en cromatografía**

De acuerdo con la naturaleza del analito se debe seleccionar el método de detección que permita obtener respuestas consistentes durante el análisis y que se adapte al tipo de muestra empleada. Existen diversos sistemas de detección que se pueden acoplar a la cromatografía de líquidos, pero por el principio en el que se basan para la detección, pueden ser más selectivos y sensibles que otros ante diferentes analitos.

#### **1.11.1. Detector UV/Visible<sup>42</sup>**

Este tipo de detector utiliza luz ultravioleta y visible para analizar muestras. La luz UV es emitida por una lámpara de deuterio, mientras que la luz visible es emitida por una lámpara de tungsteno. Una vez separados los analitos en la elución, la muestra se hace pasar por un haz de luz a diferentes longitudes de onda y se mide la absorción para poder detectar a los analitos. Existen dos tipos de detectores UV/Visible que son de longitud de onda sencilla y variable: en la longitud de onda sencilla el detector mide a una sola longitud de onda; en la longitud de onda variable, la detección se realiza con diferentes longitudes de onda, por ello es un método más sensible.

Un ejemplo de analitos que se pueden analizar con este tipo de detección son aquellos que en su estructura contienen enlaces conjugados, tales como los compuestos aromáticos, que presentan la capacidad de absorber la luz UV.

#### **1.11.2. Detector de Índice de Refracción<sup>43,44</sup>**

El detector de índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés) se utiliza cuando se detectan analitos con limitada o nula absorción en UV, tales como alcoholes, azúcares, ácidos grasos, polímeros y carbohidratos. De todos los detectores usados en cromatografía de líquidos RI es de los menos sensibles, ya que los factores

ambientales como temperatura, presión y flujo afectan la detección. En la figura 5 se representa un detector de RI.

Un haz de luz de una lámpara incandescente atraviesa una máscara óptica que concentra el rayo a una región de una celda. El lente colima el haz de luz, el cual pasa a través de la muestra y una celda de referencia hacia un espejo plano. El espejo refleja el rayo de vuelta a través de las celdas de muestra y de referencia hacia un lente que concentra la luz en una fotocelda. La posición del rayo, más que su intensidad, está determinada por la desviación angular del haz de luz causada por la diferencia en el índice de refracción de las dos celdas. Conforme el rayo cambia de posición en la celda fotoeléctrica, se modifica electrónicamente la diferencia de señales para proveer una señal proporcional a la concentración del analito en la muestra.

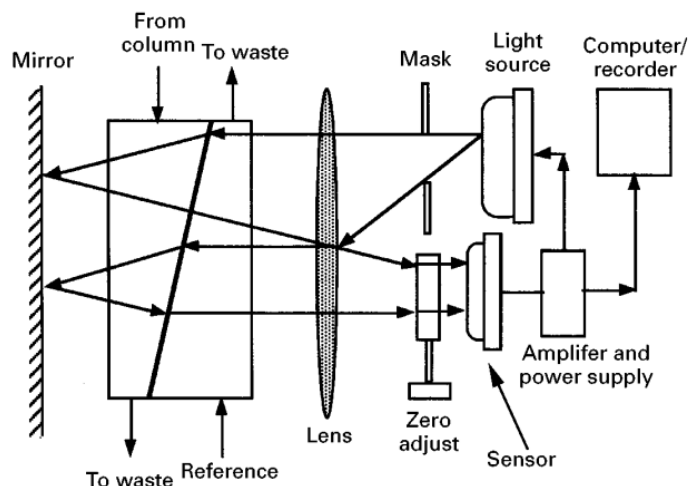


Figura 6. Esquema de funcionamiento de un detector de índice de refracción (RI)<sup>44</sup>.

### 1.11.3. Detector de fluorescencia<sup>45</sup>

También llamado detector de fotoluminiscencia, es un detector que ofrece alta sensibilidad y selectividad sobre otros métodos de detección. Es útil cuando el analito presenta poca o nula absorción en UV, además de que tiene una sensibilidad en tres órdenes de magnitud mayor que los métodos de absorción.



En la figura 6 se muestra cómo está conformado un detector de fluorescencia. Este detector posee una lámpara que puede ser de xenón, la cual emite un destello de tan solo unos microsegundos para proveer energía. Cada destello causa fluorescencia en la celda de flujo y genera un punto de información individual para el cromatograma. Una rejilla holográfica se utiliza como monocromador para dispersar la luz policromática de la lámpara de xenón. Se concentra la longitud de onda deseada para una óptima excitación. Otra rejilla es usada como monocromador de emisión que envía la luz hacia un fotomultiplicador para generar una respuesta.

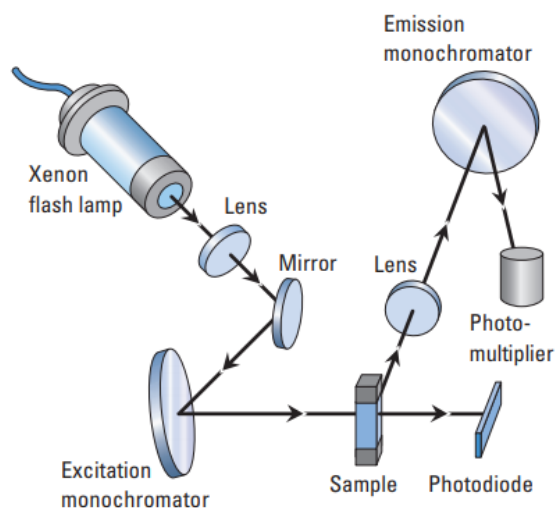


Figura 7. Diseño óptico de un detector de fluorescencia Agilent 1100.<sup>45</sup>

#### 1.11.4. Detector de arreglo de fotodiodos<sup>46</sup>

Un detector PDA (Photodiode Array) es un detector multicanal que presenta una mejora en los detectores de UV/Visible. Bajo condiciones óptimas puede detectar de manera simultánea tantas longitudes de onda como el número de diodos individuales que tenga, lo que permite disminuir o eliminar las señales que coeluyen.

Un rayo policromático se emite desde una fuente y es irradiado hacia la ranura de entrada de un policromador después de pasar a través del compartimento para la muestra. El policromador dispersa la banda estrecha del espectro sobre el arreglo

de diodos. El fotodiodo convierte la luz en señales eléctricas y las almacena temporalmente. En la figura 7 se esquematiza un detector PDA.

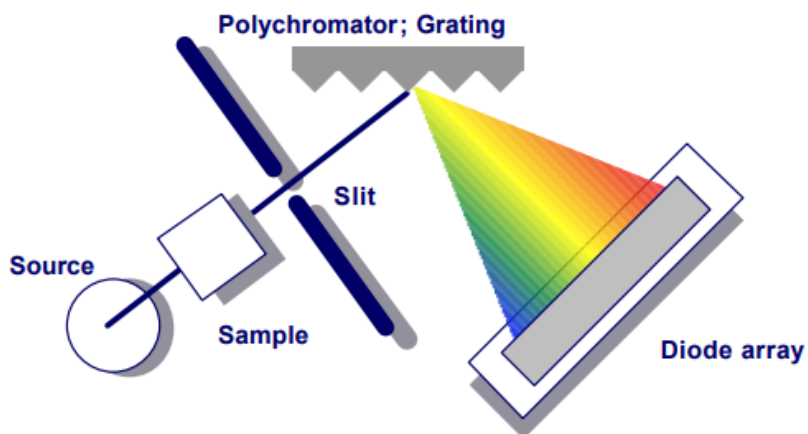


Figura 8. Representación de un detector de arreglo de fotodiodos (PDA)<sup>46</sup>.

#### 1.11.5. Detector de dispersión de luz evaporativa<sup>47</sup>

También conocido como ELSD (Evaporative Light-Scattering Detector), presenta diversas ventajas sobre UV/Visible y RI. Esta técnica posee diferentes aplicaciones como el analizar carbohidratos con límites de detección de nanogramos, separar lípidos y ácidos grasos mediante elución en gradiente y analizar polímeros con una sensibilidad igual o mejor que la que se obtiene con un detector RI. Se ha demostrado una alta sensibilidad a compuestos no volátiles al detectar impurezas en algunos aminoácidos, cosas que no se observa en UV.

La fase móvil que proviene del HPLC es rociada en forma de neblina mediante un nebulizador. La neblina se conduce a través de un tubo de empuje usando el gas nebulizador como un acarreador. Debido a la gran área superficial y la temperatura del tubo la fase móvil se evapora rápidamente dejando una nube de partículas. La nube de las partículas del soluto pasa a través de un haz de luz y se detecta la luz dispersada. La cantidad de luz que se dispersa está relacionada con la concentración de la muestra y es independiente del grupo funcional de la muestra.

En la figura 8 se muestra la configuración de un detector ELSD.

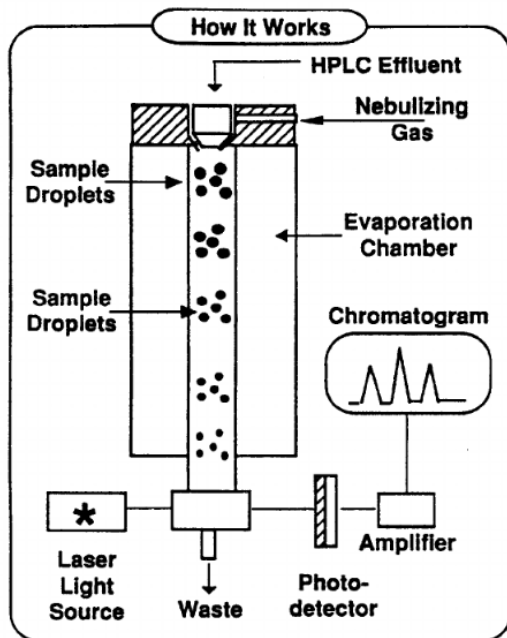


Figura 9. Conformación de un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD)<sup>47</sup>.

### 1.11.6. Espectrometría de masas (MS)

Es una técnica espectroscópica de análisis de gran importancia. Permite separar y analizar diferentes analitos de acuerdo con su masa a través de la fragmentación de los mismos. Las muestras pasan por un haz de electrones que provoca que las moléculas formen iones en estado gaseoso, ya sea con fragmentación o no<sup>23</sup>. Posteriormente, se genera un campo magnético que separa las moléculas de acuerdo con la relación específica de carga/masa ( $m/z$ ) y registra la abundancia relativa<sup>24,25</sup>.

En la figura 9 se representa el funcionamiento de un espectrómetro de masas.

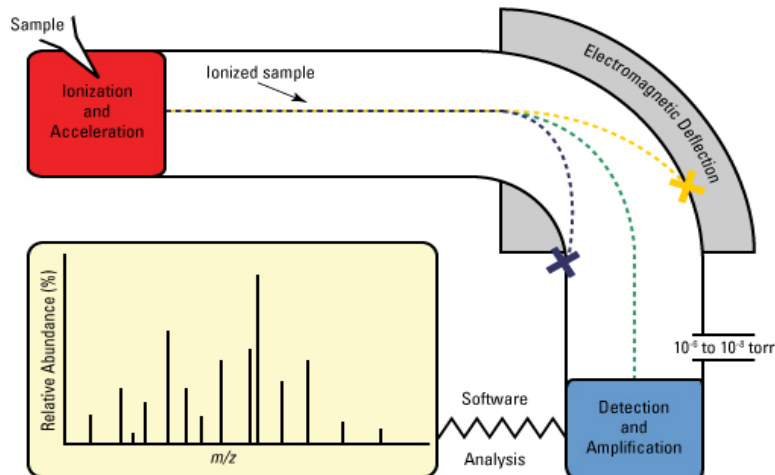


Figura 10. Representación del funcionamiento de un equipo de espectrometría de masas. Imagen disponible en <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html>

### 1.11.6.1. Tipos de ionización en espectrometría de masas<sup>32,33</sup>

Un paso crucial en el análisis de muestras por espectrometría de masas es la formación de iones en estado gaseoso. A lo largo de la historia se han desarrollado diferentes técnicas de ionización de los analitos, desde ionización por impacto electrónico (IE) y bombardeo con átomos rápidos (Fast-Atom Bombardment FAB) hasta ionización por electrospray (Electrospray Ionization ESI) y la técnica de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). La ionización por FAB fue el primer método de ionización que permitió analizar rutinariamente por espectrometría de masas a moléculas polares.

#### 1.11.6.1.1. Ionización por impacto electrónico (Electronic Impact EI)

Es un método clásico de ionización en el que el analito se ioniza por colisiones con un flujo de electrones a 70 eV. Estos electrones se generan por emisión térmica de un filamento hecho, generalmente, de tungsteno o de renio. Se aplica un potencial entre el filamento y la muestra para acelerar los electrones y promover las colisiones.

Esta técnica se utiliza por infusión directa al detector o por medio de un cromatógrafo de gases. El impacto electrónico ocasiona que el ion siempre se fragmente, es por ello que se considera una técnica de ionización fuerte o ruda.

#### **1.11.6.1.2. Ionización Química (Chemical Ionization CI)**

Se considera como un método de ionización relativamente suave. En este método se hace reaccionar el analito con iones de un reactivo gaseoso, provenientes de impacto electrónico.

La muestra se introduce por una sonda directa a una temperatura de 20 a 500 °C o por medio de un cromatógrafo de gases. Los analitos deben tener polaridad baja o media, así como estabilidad térmica. Ocurre un bajo nivel de fragmentación debido a que los iones poseen una energía interna relativamente baja.

#### **1.11.6.1.3. Ionización de Campo (Field Ionization FI)**

Es también una técnica de ionización suave y sigue los mismos principios que en EI y en CI, pero con el riesgo de descomposición térmica de la muestra.

En la FI, las moléculas son ionizadas en los bordes del campo de un ánodo emisor, el cual consiste de un alambre de tungsteno de 10 – 13  $\mu\text{m}$  de diámetro que es activado por un procedimiento especial creando miles de microagujas en su superficie. Se aplica un voltaje de 10 – 12 kV que causa polarización y, finalmente, ionización de las moléculas que están cerca de las puntas de las microagujas.

Esta técnica tiene una eficiencia de ionización muy baja, por lo que la FI produce una corriente de iones muy baja, además de producir casi nula fragmentación de los analitos.

#### **1.11.6.1.4. Desorción de Campo (Field Desorption FD)**

Este método se basa en FI, pero con la diferencia que en FD no se requiere la evaporación previa a la ionización. En la desorción de campo se producen iones de muy baja energía interna y casi nula fragmentación.

Se prefiere que la muestra sea soluble en solventes volátiles. Es posible analizar compuestos de baja o alta polaridad e inclusive mezclas de compuestos, aunque solo se pueden cuantificar compuestos puros.

#### **1.11.6.1.5. Bombardeo con Átomos Rápidos (Fast Atom Bombardment FAB)**

Esta fue una técnica muy popular en los años 80 y principios de los 90, debido a que fue la primera técnica que permitió la ionización de compuestos no volátiles.

Se bombardea la muestra al vacío con un haz de átomos, generalmente argón o xenón, acelerados a energía de kilovolt. La muestra se mezcla en una matriz, la cual puede estar compuesta por glicerol, ácido 3-nitrobenzoico o alcohol 3-nitrobencílico.

Las muestras que pueden ser analizadas por FAB deben ser altamente solubles, e incluso altamente polares, iónicas o no polares. Se puede utilizar para detección directa de iones positivos o negativos.

#### **1.11.6.1.6. Ionización por Electrospray (Electrospray Ionization ESI)**

Este método de ionización se ha vuelto el más popular, ya que es posible realizarlo a presión atmosférica. Con la técnica de ESI se pueden analizar moléculas altamente polares.

El electrospray es creado al aplicar un voltaje alto en un fluido de un líquido a presión atmosférica, que algunas veces es asistido por otro gas. En la figura 10 se observa cómo el spray generado es dirigido a una abertura en el sistema de vacío del detector, en donde las gotas son desolvatadas por una combinación de calor, vacío y aceleración dentro del gas por voltajes.

En moléculas grandes, los iones pueden contener múltiples cargas, permitiendo la detección de moléculas de gran tamaño en analizadores que poseen rangos limitados en la relación masa/carga ( $m/Z$ ). Debido a que se usa un líquido, es muy fácilmente adaptada a la cromatografía de líquidos.

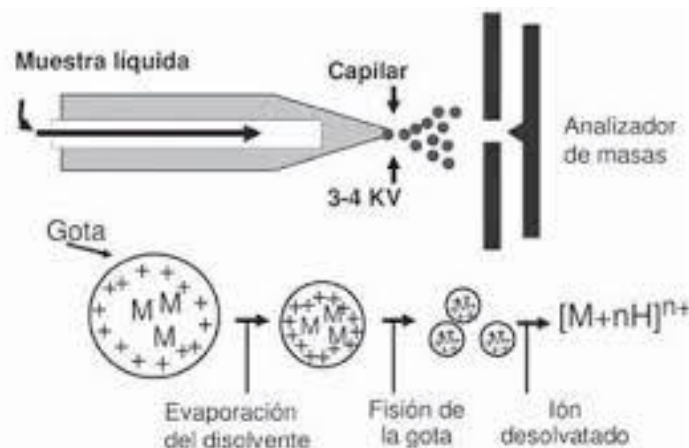


Figura 11. Proceso de ionización por ESI. Imagen disponible en: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/MALDI-ESI-TOF.pdf>

#### 1.11.6.1.7. Ionización Química a Presión Atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization APCI)

Es un método similar a ESI, pero, en lugar de aplicar un voltaje al propio spray, el voltaje se aplica a una aguja que crea una descarga en corona a presiones atmosféricas. Esta descarga crea iones, en teoría la mayoría son  $H_3O^+$  y agregados de agua. La muestra es inyectada dentro de la descarga por un aerosol creado por la combinación de un líquido fluyendo y un gas calentado que volatilizan la muestra.

Los iones son formados por la transferencia de protones del  $H_3O^+$  o de los agregados de agua. Posteriormente, la detección se lleva de la misma manera que en ESI.

#### 1.11.6.1.8. Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization MALDI)

Siendo una técnica relativamente más reciente, en MALDI los analitos son disueltos en una matriz (formada por compuestos aromáticos) que absorbe la radiación UV. Conforme los solventes se van secando, los compuestos de la matriz se cristalizan y los analitos quedan contenidos dentro de la matriz de cristales.

La muestra es bombardeada con un láser, el cual es absorbido por la matriz. La ionización ocurre por protonación en el ambiente ácido producido por los

compuestos de la matriz. En MALDI la producción de iones es discreta y son de una amplia variedad de moléculas, ya que, dependiendo de la combinación entre el analito y la matriz, predominan cierto tipo de iones en el espectro obtenido.

#### **1.11.6.2. Calibración del detector MS/MS mediante pruebas de *tuning* y *dwell time***

Para el uso de un equipo de espectrometría de masas es importante primero determinar las condiciones de detección, las cuales incluyen el voltaje del electrospray (se determina si es positivo o negativo); la energía del capilar, del cono y del extractor; la temperatura de la fuente de ionización y del gas de desolvatación. Todas estas condiciones se determinan con pruebas de calibración llamadas *tuning*, inyectando una disolución de estándar de referencia del analito y del estándar interno. Con esta prueba es posible mejorar la resolución y la intensidad del rendimiento del instrumento<sup>26</sup>.

La prueba de *dwell time* determina la duración en que cada señal del ion es recolectada. Al incrementar el tiempo del *dwell* se mejora la sensibilidad en el conteo de los iones. Sin embargo, se recolectarán menos puntos a lo largo del pico en el cromatograma<sup>27</sup>.

### **1.12. Método bioanalítico**

Es un método de análisis en el que se determina la concentración o cantidad de un fármaco y/o sus metabolitos para un estudio de farmacocinética/farmacodinamia, bioequivalencia o toxicocinética en una matriz biológica como puede ser sangre, suero, orina, etc<sup>20</sup>.

#### **1.12.1. Validación de métodos bioanalíticos**

Son los procedimientos que demuestran que un método en particular usado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica es confiable y reproducible para su uso propuesto<sup>21</sup>. El objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que es apropiado y cumple con el propósito para el que fue diseñado<sup>8</sup>.

El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos define en su guía los siguientes parámetros de validación.



#### **1.12.1.1. Adecuabilidad o desempeño del sistema**

Verificación de que el sistema opera con base en criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

#### **1.12.1.2. Especificidad**

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

#### **1.12.1.3. Exactitud**

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

#### **1.12.1.4. Límite de cuantificación**

Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

#### **1.12.1.5. Límite de detección**

Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación.

#### **1.12.1.6. Linealidad**

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

#### **1.12.1.7. Precisión**

Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto.

#### **1.12.1.8. Recobro**

Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

#### **1.12.1.9. Repetibilidad**

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

#### **1.12.1.10. Reproducibilidad**

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas.

#### **1.12.1.11. Robustez**

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

#### **1.12.1.12. Estabilidad analítica de la muestra**

Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

La estabilidad de la muestra se evalúa con diferentes pruebas como se menciona a continuación: estabilidad a corto y largo plazo, estabilidad de la muestra procesada, estabilidad en el automuestreador, estabilidad en ciclos de congelación-descongelación y estabilidad en solución.

#### **1.12.1.13. Efecto de matriz**

Esta es una prueba que se requiere cuando se utiliza espectrometría de masas. En el análisis de las muestras, es posible encontrar variaciones en la respuesta debido a los componentes de la matriz de estudio, lo que puede provocar una estimación errónea en la medición.

El efecto de matriz de un analito es el cambio en la ionización en disolvente comparado con la ionización en la matriz de estudio<sup>26</sup>, ya sea por supresión o por realce de iones<sup>27</sup>.

#### **1.12.1.14. Efecto de acarreo**

El objetivo de esta prueba es determinar que no quedan residuos de la muestra en el sistema cromatográfico, tales que puedan interferir y alterar la respuesta de las muestras siguientes.

#### **1.12.1.15. Efecto de dilución**

Esta prueba se valida con el objetivo de determinar si la dilución de una muestra, cuya concentración se encuentra por encima del límite superior de cuantificación, no tiene repercusiones en su análisis.

# OBJETIVOS

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Validar un método bioanalítico por UPLC-MS/MS para la cuantificación de teofilina en plasma humano.

### **Objetivos particulares**

- Desarrollar el método bioanalítico para la cuantificación de teofilina por la técnica de UPLC, utilizando calibración por estándar interno, con detección de UV o MS/MS.
- Evaluar la utilidad de tarjetas de tamizaje neonatal (tarjetas Guthrie) como soporte para recolección y análisis de la matriz biológica con teofilina.
- Extraer la teofilina a partir de plasma humano para comparar la eficiencia de la extracción con las tarjetas Guthrie.
- Determinar el perfil farmacocinético de una nueva formulación de teofilina en un voluntario adulto sano de un estudio piloto para conocer los parámetros de tiempo máximo ( $t_{max}$ ) y concentración máxima ( $C_{max}$ ).

# **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2. Materiales y métodos

Se utilizaron estándares de referencia de teofilina y de etofilina para la preparación de todas las disoluciones empleadas en el desarrollo y validación del método bioanalítico. También, se emplearon diferentes disolventes orgánicos y disoluciones para la extracción del fármaco de la matriz biológica y para la elución cromatográfica.

### 2.1. Materiales

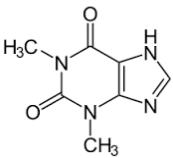
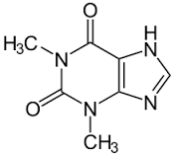
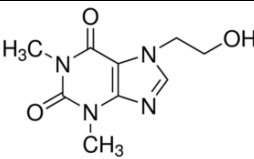
Sustancia	Estructura	Proveedor	Grado
Materia prima: Teofilina		Alpharma	Analítico
Estándar de referencia: Teofilina anhidra		MP	Analítico
Estándar interno: 7-(β-hidroxietil)- teofilina (etofilina)		Santa Cruz Biotechnology	Analítico

Tabla 3. Sustancias de referencia de teofilina y etofilina.

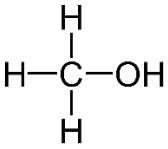
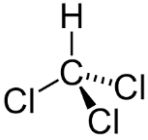
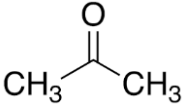
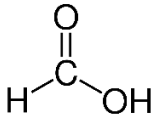
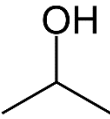
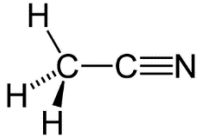
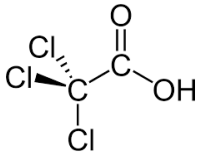
Sustancia	Estructura	Proveedor	Grado
Metanol		Merck	Cromatográfico
Cloroformo		Merck	Cromatográfico
Acetona		Sigma-Aldrich	Cromatográfico
Ácido fórmico		Merck	Analítico
2-propanol		Caledon	Cromatográfico
Acetonitrilo		Herschi Trading	Cromatográfico
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck	Analítico
Ácido tricloroacético		Merck	Analítico

Tabla 4. Reactivos utilizados para la extracción del fármaco y para la elución cromatográfica.

## 2.1.1. Mezclas cromatográficas

### 2.1.1.1. Solución Ácido fórmico 0.1% para fase móvil

Colocar en un matraz volumétrico de 200 mL, 200  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico grado HPLC y llevar al aforo con agua desionizada "Milli-Q".



#### **2.1.1.2. Solución de lavado fuerte de inyector:**

##### **acetonitrilo/isopropanol/metanol/agua (25:25:25:25% v/v)**

Medir por separado 50 mL de cada uno de los disolventes con probeta, colocar en un frasco de vidrio y agitar manualmente.

#### **2.1.1.3. Solución de lavado débil de inyector: agua/metanol (50:50% v/v)**

Medir con probeta por separado 100 mL de agua desionizada "Milli-Q" y 100 mL de metanol grado HPLC. Colocar en un frasco de vidrio y agitar manualmente.

#### **2.1.1.4. Solución de lavado de sellos:**

Medir con probeta 180 mL de agua desionizada "Milli-Q" y 20 mL de acetonitrilo. Colocar en un frasco de vidrio y agitar manualmente.

#### **2.1.1.5. Solución Blanco de disolvente (agua/metanol (50:50% v/v))**

Medir por separado y mezclar 100 mL de agua HPLC y 100 mL de metanol;

NOTA: todas las soluciones se deben filtrar con membrana Milli-Pore y desgasificar en baño ultrasónico durante 10 min a 25 °C.

### **2.1.2. Preparación de disoluciones estándar de teofilina y etofilina**

Todas las disoluciones de teofilina se prepararon 20 veces más concentradas para su posterior dilución en la matriz biológica.

#### **2.1.2.1. Solución Stock de teofilina 1 mg/mL (Solución I)**

Pesar 10 mg de teofilina en una charola de pesado y llevar al aforo a 10.0 mL con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.2. Solución de teofilina 100 µg/mL (Solución A)**

Transferir 1 000 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.3. Solución de teofilina 70 µg/mL (Solución B)**

Transferir 700 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.4. Solución de teofilina 50 µg/mL (Solución C)**

Transferir 500 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.5. Solución de teofilina 20 µg/mL (Solución D)**

Transferir 200 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.6. Solución de teofilina 10 µg/mL (Solución E)**

Transferir 100 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.7. Solución de teofilina 1 µg/mL (Solución F)**

Transferir 10 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.8. Solución de teofilina 3 µg/mL para muestra control baja (Solución MCB 20X)**

Transferir 30 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.9. Solución de teofilina 15 µg/mL para muestra control media (Solución MCM 20X)**

Transferir 150 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.10. Solución de teofilina 80 µg/mL para muestra control alta (Solución MCA 20X)**

Transferir 800 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.11. Solución de teofilina 120 µg/mL para muestra control diluida (Solución MCD 20X)**

Transferir 1 200 µL de la solución Stock de teofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.12.12. Muestra Control Diluida (MCD)**

Tomar 25 µL de la solución MCD 20X y mezclarla con 475 µL de plasma libre de analito. Posteriormente, tomar 50 µL de la mezcla y diluir con 450 µL de plasma libre de analito para llegar a un volumen de 500 µL.

#### **2.1.2.13. Solución Stock de etofilina 1 mg/mL**

Pesar 10 mg de etofilina en una charola de pesado, disolver con solución blanco y llevar al aforo a 10.0 mL con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.14. Solución de etofilina 4000 ng/mL (Solución i)**

Transferir 40 µL de la solución stock de etofilina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución blanco de disolvente.

#### **2.1.2.15. Solución Desempeño del Sistema**

En un vial para HPLC “total recovery” mezclar una alícuota de 100 µL de la solución C de teofilina (50 µg/mL) y una alícuota de 100 µL de la solución i de etofilina (4000 ng/mL).

#### **2.1.3. Preparación de disoluciones para extracción**

##### **2.1.3.1. Solución saturada de sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% m/v.**

Pesar 100 g de sulfato de amonio y llevar al aforo a 500.0 mL con agua desionizada “Milli-Q”.

##### **2.1.3.2. Solución de extracción Cloroformo/Isopropanol (95:5% v/v).**

Medir con probeta por separado 190 mL de cloroformo y 10 mL de isopropanol y agitar manualmente. Conservar a temperatura ambiente.

## 2.1.4. Condiciones instrumentales

### 2.1.4.1. Equipo para UPLC

Cromatógrafo de líquidos Acquity™ Ultra Performance LC Waters.

### 2.1.4.2. Fase estacionaria

- Columna: Acquity UPLC BEH C18.
- Dimensiones: 2.1 x 50 mm.
- Tamaño y forma de partícula: 1.7 µm y de forma esférica.
- Temperatura del horno: 35 °C.

### 2.1.4.3. Fase móvil

- Flujo de 0.1 mL/min.
- Tiempo de corrida: 3.5 min.

Vía de UPLC	Fase	Proporción
A1	Metanol (MeOH)	50%
B1	Ácido fórmico 0.1%	50%

*Tabla 5. Disolventes para la fase móvil.*

### 2.1.4.4. Automuestreador

- Opción de loop: parcial con sobrellenado de aguja.
- Volumen de inyección: 10 µL.
- Temperatura ajustada a 20 °C.
- Volumen de lavado débil: 600 µL.
- Volumen de lavado fuerte: 200 µL.

### 2.1.4.2. Detector de MS/MS

En la figura 11 se muestra un esquema del equipo Waters Quattro™ micro API Mass Spectrometer de triple cuadrupolo.

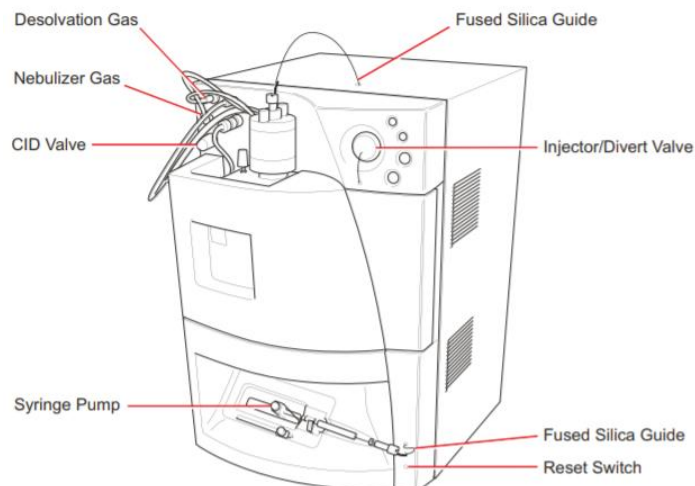


Figura 12. Esquema de espectrómetro de masas Waters Quattro Micromass

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Desarrollo del método de extracción en HPLC-UV

#### 2.2.1.1. Matriz sanguínea simulada

Para realizar las pruebas del método de extracción se simuló una matriz sanguínea a la que se le adicionaron concentraciones conocidas de un estándar de referencia de teofilina.

La matriz sanguínea se preparó al 46% de hematocrito mediante la mezcla de Concentrado Eritrocitario Pediátrico Filtrado (CEPF) y Plasma Fresco Congelado (PFC), provenientes del banco de sangre del INP, a lo que se denominó como sangre reconstituida.

La preparación de las muestras biológicas para las pruebas de extracción y para la validación se realizó mezclando 950  $\mu\text{L}$  de la sangre reconstituida y 50  $\mu\text{L}$  de disolución de teofilina 20 veces más concentrada, debido a que la NOM-177-SSA1-2013 indica que no se debe diluir la muestra en más del 5%.

### **2.2.1.2. Extracción de la teofilina**

Se realizaron dos tipos de procedimientos para la extracción y cuantificación de la teofilina: en el primero de ellos se extrajo el fármaco a partir de una tarjeta Guthrie, mientras que en el segundo la extracción se realizó a partir de muestras sanguíneas.

Se utilizó como base el método propuesto por Michael A. Peat et al.<sup>62</sup> para la extracción del fármaco. La metodología de extracción consta, de manera general, en la precipitación de las proteínas de la matriz biológica y un reparto líquido-líquido entre la matriz y un disolvente orgánico como el cloroformo.

Se realizaron diferentes modificaciones al método con el objetivo de obtener señales simétricas, disminuir al máximo las interferencias inherentes a la matriz biológica, utilizar una baja cantidad de reactivos y de muestra, así como reducir la generación de residuos.

Se estableció como criterio de aceptación la selectividad, en la que no debían encontrarse respuestas mayores que el 20% de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC). Otro criterio establecido fue la obtención de señales simétricas en los cromatogramas para la teofilina y el estándar interno de etofilina.

Las concentraciones utilizadas para probar la extracción fueron de 0.5, 1, 5, 10, 15, 25 y 30 µg/mL.

### 2.2.1.3. Procedimiento de extracción a partir de tarjetas de tamizaje neonatal

En la figura 13 se presenta la metodología seguida para la extracción de la teofilina a partir de tarjetas Guthrie.

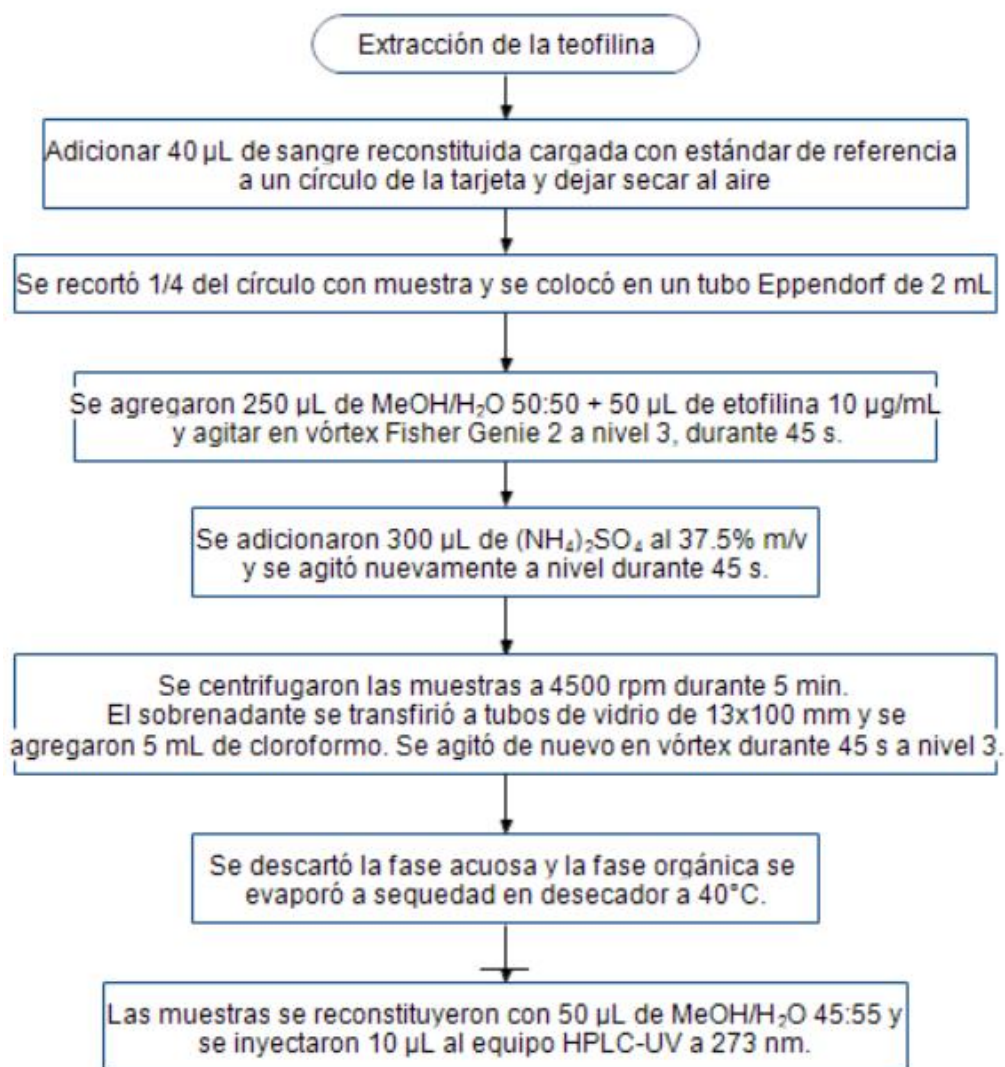


Figura 13. Metodología de extracción de la teofilina a partir de tarjetas de tamizaje neonatal.

#### 2.2.1.4. Procedimiento de extracción a partir de muestras sanguíneas

En la figura 14 se presenta la metodología con la que se extrajo la teofilina a partir de muestras de sangre total o suero.

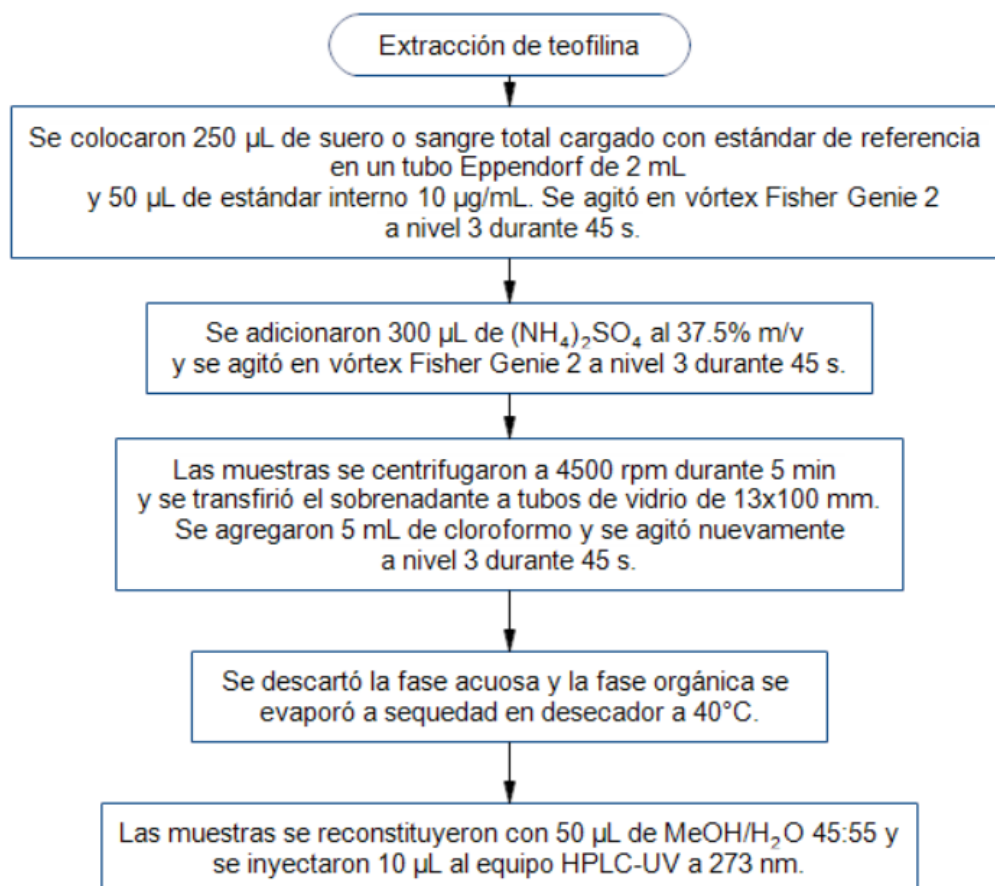


Figura 14. Metodología de extracción de la teofilina a partir de muestras sanguíneas.

#### 2.2.2. Desarrollo del método bioanalítico en UPLC-MS/MS

##### 2.2.2.1. Pruebas de *tuning* y *dwell time*

Para la prueba de *tuning*, se preparó una disolución de teofilina de 100 ng/mL, se colocó en la bomba de la jeringa (Syringe pump, véase en la figura 11) y se inyectó con un flujo de 10 µL/min. Se ajustaron los parámetros de detección hasta obtener una respuesta óptima para la teofilina. Posteriormente, se ajustaron los parámetros para el estándar interno etofilina.

Se probaron las siguientes fases móviles: MeOH/Ácido acético 0.05% 50:50; MeOH/Ácido fórmico 0.1% 50:50; MeOH/Formiato de amonio 5mM 50:50;



MeOH/Acetato de amonio 2mM 50:50). Se determinó que utilizando MeOH/Ácido fórmico 0.1% en proporción 50:50% v/v y un flujo de 0.1 mL/min la detección era la más eficiente y se obtenían respuestas de mayor magnitud.

El método de adquisición utilizado fue el de MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple), cuyas condiciones se presentan en las tablas 6 y 7.

Analito	Tiempo de retención (min)	Ion padre (Da)	Ion hijo (Da)	Dwell (s)	Cono (V)	Colisión (eV)	Delay (s)
Teofilina	1.54	181.20	124.27	0.100	35.00	18.00	0.020
Etofilina	1.55	225.22	181.35	0.100	30.00	20.00	0.100

Tabla 6. Condiciones de adquisición para el detector MS/MS por el método de MRM.

Ionización	Cappillary (kV)	Entrance	Extractor (V)	RF Lens (V)	Source Temperature (°C)	Desolvation Temperature (°C)	Cone Gas Flow (L/h)
ESI+	1.00	10	1.00	0.1	80	350	650

Tabla 7. Condiciones de la fuente de ionización del detector MS/MS.

#### 2.2.2.2. Desarrollo del método de extracción

La metodología planteada para la detección con UV se utilizó en el detector MS/MS para comparar la eficacia del método.

El desarrollo del método se probó mediante la extracción de la teofilina a partir de tarjetas de tamizaje neonatal y a partir de plasma humano.

Se estableció como criterio de aceptación el que las curvas de calibración extraídas fueran lineales, con un coeficiente de correlación mayor que 0.98.

### **2.2.2.3. Extracción a partir de tarjetas de tamizaje neonatal**

En espectrometría de masas es posible detectar concentraciones menores que en UV, por ello se probó el método de extracción utilizando muestras de concentración de 100 y 1000 ng/mL, siguiendo las técnicas propuestas por diferentes autores<sup>59,60</sup> que han demostrado la linealidad del método bioanalítico en el intervalo de concentraciones de 50 a 5000 ng/mL.

Una vez preparadas las muestras sanguíneas cargadas con la teofilina, se colocaron 40 µL de la sangre en un círculo de una tarjeta Guthrie. La extracción se realizó con la misma metodología para las tarjetas usada en UV, sólo que el volumen de reconstitución utilizado fue de 100 µL. Se inyectaron 10 µL de la muestra al equipo UPLC-MS/MS.

### **2.2.2.4. Extracción a partir de plasma humano**

Se filtró plasma proveniente del banco de sangre del INP a través de un filtro Whatman del #4. Con este plasma se prepararon, por quintuplicado, muestras adicionadas con teofilina a concentraciones de 100 y 1000 ng/mL y se utilizó la metodología de extracción utilizada para las tarjetas Guthrie.

Una vez que se observó que las señales en los cromatogramas comenzaron a ser definidas y que eran proporcionales a la concentración, se probó el método de extracción con una curva de calibración en plasma que abarcó el intervalo de 250 a 6000 ng/mL.

Al no contar con la información de farmacocinética de la teofilina en población mexicana, se tomó como referencia<sup>61</sup> la información presentada en la tabla 1, donde se presenta el valor de C<sub>max</sub> para la teofilina en diferentes poblaciones. Se observó que el valor de C<sub>max</sub> se encuentra, en su mayoría, entre 3 y 6 µg/mL. Para el desarrollo del método se utilizó el valor de 3 µg/mL como valor esperado.

### **2.2.2.5. Modificaciones al método de extracción**

Se realizaron nuevas modificaciones a la metodología para adecuarla al tipo de detección (asegurar la ionización del analito y reducir la cantidad de sales no volátiles), siguiendo algunos pasos que se determinaron en la metodología para UV.

Todas estas condiciones permitieron desarrollar un método que fuera, en principio, lineal, repetible y reproducible.

#### **2.2.2.5.1. Volumen de muestra**

Se probó la extracción variando el volumen de muestra cargada entre 20, 50, 100, 250, 500 y 1 000  $\mu\text{L}$ .

#### **2.2.2.5.2. Precipitación de proteínas**

Un paso muy importante en el método de extracción del fármaco es la precipitación de proteínas. Por ello se probaron diferentes agentes como fue  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en concentraciones de 20% m/v y 37% m/v, acetona, acetonitrilo y MeOH. Dichos agentes fueron probados solos y en combinaciones y con diferentes volúmenes.

Se probó también la extracción de la teofilina por precipitación directa con acetonitrilo y MeOH, previamente enfriados en ultracongelación durante 15 min.

#### **2.2.2.5.3. Extracción líquido-líquido**

Después de eliminar las proteínas con la precipitación, se extrae la teofilina de la fase acuosa utilizando disolventes orgánicos.

Para este fin se probaron agentes de extracción como acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, éter, cloroformo/ácido fórmico y cloroformo/isopropanol.

#### **2.2.2.5.4. Volumen de reconstitución**

Se probaron volúmenes de 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$  de disolvente de reconstitución (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50) para poder inyectar las muestras, tal que la muestra tuviera una concentración que le permitiera ser detectable y cuantificable y que el volumen fuera suficiente para el análisis.

#### **2.2.2.6. Propuesta final del método de extracción**

- 1) Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de plasma cargado con estándar de referencia en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución i (estándar interno de etofilina 4000 ng/mL). Se agitó durante 10 s en vórtex a nivel máximo.
- 2) Se agregaron 120  $\mu\text{L}$  de disolución de sulfato de amonio al 20% m/v con pipeta multidispensadora.

- 3) Se adicionaron 380  $\mu\text{L}$  de MeOH, previamente enfriado en ultracongelador durante 10-15 min, con pipeta multidispensadora y se agitó durante 45 s en vórtex a nivel máximo.
- 4) Se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de acetona con pipeta multidispensadora y se agitó durante 45 segundos en vórtex a nivel máximo.
- 5) Se centrifugó a 12 000 rpm, durante 5 min, a temperatura ambiente.
- 6) Se decantó la fase líquida a un tubo de vidrio de 13x100 mm.
- 7) Se adicionaron 1 000  $\mu\text{L}$  de cloroformo/isopropanol 95:5% v/v con pipeta multidispensadora y se agitó durante 45 segundos en vórtex a nivel máximo.
- 8) Se dejó que las fases se separaran.
- 9) Con una micropipeta se retiró la fase acuosa, cuidando que el volumen de fase restante fuera constante en todas las muestras.
- 10) Se evaporó el cloroformo en baño de agua a 40°C con corriente de aire (deseccador).
- 11) Se reconstituyeron las muestras con 200  $\mu\text{L}$  de solución Blanco de disolvente (MeOH/H<sub>2</sub>O 50:50% v/v).
- 12) Se agitó durante 30 segundos en vórtex a nivel máximo y temperatura ambiente.
- 13) Se transfirió la muestra a un vial para HPLC de 2 mL “total recovery”, asegurándose que al colocar el líquido no se formen burbujas de aire.
- 14) Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  al equipo UPLC-MS/MS.

Los resultados con esta técnica fueron lineales y reproducibles, por lo que se seleccionó esta metodología para realizar la validación.

### **2.2.3. Validación del método bioanalítico**

Los parámetros de validación que se evaluaron fueron los siguientes: desempeño del sistema, selectividad, efecto de matriz, efecto de acarreo, curva de calibración, límite inferior de cuantificación, precisión y exactitud, estabilidad y recobro.

Todos los parámetros se validaron de acuerdo con los criterios que dicta la NOM-177-SSA1-2013, con excepción de la prueba de recobro, la cual se evaluó conforme

a lo establecido en la *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*<sup>21</sup> de la FDA (Food and Drug Administration).

Gracias a un estudio piloto realizado en el que se administró la solución oral de teofilina se determinó el intervalo de la curva de calibración, el cual quedó determinado de 50 a 5 000 ng/mL. La curva de calibración utilizada para el análisis de todas las muestras se presenta en la tabla 8.

Nivel	Conc. Nominal (ng/mL)	Solución A (µL)	Solución B (µL)	Solución C (µL)	Solución D (µL)	Solución E (µL)	Solución F (µL)	MCB20X (µL)	MCM20X (µL)	MCA20X (µL)	Plasma (µL)	Volumen final (µL)
MLIC	50	-	-	-	-	-	25	-	-	-	475	500
MCB	150	-	-	-	-	-	-	25	-	-	475	500
CC2	500	-	-	-	-	25	-	-	-	-	475	500
MCM	750	-	-	-	-	-	-	-	25	-	475	500
CC3	1 000	-	-	-	25	-	-	-	-	-	475	500
CC4	2 500	-	-	25	-	-	-	-	-	-	475	500
CC5	3 500	-	25	-	-	-	-	-	-	-	475	500
MCA	4 000	-	-	-	-	-	-	-	-	25	475	500
CC6	5 000	25	-	-	-	-	-	-	-	-	475	500
MCD	6 000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	475	500

Tabla 8. Preparación de la curva de calibración y muestras control. La preparación de la MCD se realiza mezclando 25 µL de la solución MCD 20X con 475 µL de plasma libre de analito. Posteriormente, se toman 50 µL de la muestra y se diluyen con 450 µL de plasma libre de analito.

### 2.2.3.2. Desempeño del sistema

Previo al inicio de cada corrida analítica se realizó la inyección de al menos 6 réplicas de la solución de desempeño del sistema. El sistema se considera adecuado si cumple con los siguientes criterios:

Parámetro cromatográfico	Criterio de aceptación
Tiempo de retención	CV ≤ 2.0 %
Respuesta cromatográfica	CV ≤ 5.0 %

Tabla 9. Criterios de aceptación para la prueba de desempeño del sistema.

### 2.2.3.3. Selectividad

#### 2.2.3.3.1. Selectividad a compuestos endógenos

Se evaluaron 7 unidades de matriz biológica que incluyeron la matriz hemolizada. La matriz hemolizada se preparó de la siguiente manera: se reconstituyó sangre total al 43% de hematocrito, que es el que se encuentra reportado en la literatura para el humano. Para ello, se mezclaron 2 150  $\mu\text{L}$  de paquete eritrocitario con 2 850  $\mu\text{L}$  de plasma filtrado en un tubo falcon de 15 mL. Posteriormente, se agitó en vórtex a máximo nivel durante 30 s para favorecer la hemólisis.

Se prepararon por duplicado las siguientes soluciones: Blanco de reactivos, muestra blanco de cada unidad a evaluar y Muestra Límite de Cuantificación (MLIC) de cada unidad de plasma a evaluar.

Las muestras deben cumplir con los criterios de la tabla 10.

Criterio de aceptación	
% interferencia en etofilina (estándar interno)	Unidades con respuesta menor o igual al 5%.
% interferencia en teofilina (analito)	Unidades con respuesta menor o igual al 20% de MLIC.

*Tabla 10. Criterios de aceptación para la prueba de selectividad a compuestos endógenos. Nota: debido a la dieta normocalórica y baja en lípidos durante el estudio, no se obtendrán muestras con lipemia, por lo que este tipo de matriz fue descartado. En caso de encontrarse, se realizarán los controles de cambio necesarios para el análisis de estas muestras.*

#### 2.2.3.3.2. Selectividad a compuestos concomitantes y anticoagulantes

Se evaluó la selectividad del método bioanalítico contra posibles interferencias en el tiempo de retención del analito por la administración de compuestos concomitantes y el uso de anticoagulantes durante la toma de muestra.

Se extrajo por triplicado muestra blanco adicionada con 50  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de compuestos concomitantes y anticoagulantes de manera independiente y por triplicado MLIC. Las concentraciones y preparación de dichas sustancias se encuentran en la tabla 12.

Las muestras deben cumplir con los criterios de aceptación presentados en la tabla 11.

Criterio de aceptación	
% interferencia en etofilina	Unidades con respuesta menor o igual al 5%.
% interferencia en teofilina	Unidades con respuesta menor o igual al 20% de MLIC.

Tabla 11. Criterios de aceptación para la prueba de selectividad a compuestos concomitantes y anticoagulantes.

Compuesto	Conc. final en plasma	Conc. Stock	Alícuota del stock	Volumen de disolución blanco ( $\mu\text{L}$ )	Transición (m/z)
Heparina	10 UI/mL	100 UI/mL	1 mL	9 mL*	**
EDTA	(1)				**
Propionato de Fluticasona	0.1 ng/mL	2 ng/mL	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	501.3 > 293.2
Furoato de Mometasona	60 pg/mL	1200 pg/mL	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	521.16 > 355.05
Cafeína	8 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	195.18 > 138.27
Acetaminofén	30 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	358 > 121
Levocetirizina	270 ng/mL	5400 ng/mL	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	389 > 201
Prednisona	13.6 ng/mL	272 ng/mL	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	359.2 > 313.2

Tabla 12. Fármacos utilizados para la prueba de selectividad a compuestos concomitantes. (1) La muestra se recolectó en un tubo Vacutainer de tapa morada que contiene EDTA K2. \*Se realizó una dilución 1:10 para la heparina. \*\*No se cuenta con la información de las transiciones para los anticoagulantes.

#### 2.2.3.4. Efecto de matriz

Se procesaron 6 unidades de matriz biológica que incluyeron a la matriz hemolizada. Luego se extrajo por duplicado cada muestra blanco y, al finalizar la extracción, se reconstituyó una serie de muestras con 200  $\mu\text{L}$  de la solución MCB<sub>FMN</sub>; se reconstituyó la otra serie de muestras con 200  $\mu\text{L}$  de la solución MCA<sub>FMN</sub>.

Posteriormente, se colocaron 200 µL de solución MCB<sub>FMN</sub> y 200 µL de solución MCA<sub>FMN</sub> en viales para UPLC y se analizaron. La preparación de las soluciones para la reconstitución se muestra en la tabla 14.

Se calculó el FMN para cada unidad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$FMN = \frac{[Respuesta\ del\ analito\ en\ la\ matriz / Respuesta\ del\ EI\ en\ la\ matriz]}{[Respuesta\ del\ analito\ en\ solución / Respuesta\ el\ estándar\ interno\ en\ solución]}$$

Donde:

- FMN = Factor de Matriz Normalizado
- EI = Estándar interno

Las muestras deben cumplir con el criterio de aceptación de la tabla 13.

Criterio de aceptación	
FMN	EI CV% del FMN calculado de las unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15%

Tabla 13. Criterio de aceptación para la prueba de efecto de matriz.

Concentración (ng/mL)	Alícuota (µL)	Alícuota etofilina (µL)	Volumen final (mL)
150 (MCB <sub>FMN</sub> )	100 de solución MCM 20X	40 de solución i	10
4000 (MCA <sub>FMN</sub> )	40 de solución I		

Tabla 14. Preparación de las disoluciones de reconstitución para efecto de matriz.

### 2.2.3.5. Efecto de acarreo

Se realizaron tres inyecciones de la misma muestra blanco y una inyección de la muestra Límite Superior de Cuantificación (teofilina 5 000 ng/mL) con el siguiente orden:

- i. Muestra blanco
- ii. Muestra de Límite Superior de Cuantificación (LSC)
- iii. Muestra blanco
- iv. Muestra blanco



Se compararon los resultados de LSC con la respuesta de LIC.

Las muestras deben cumplir con los criterios de la tabla 15.

<b>Criterio de aceptación</b>	
% interferencia en etofilina	Unidades con respuesta menor o igual al 5%.
% interferencia en teofilina	Unidades con respuesta menor o igual al 20% de MLIC.

Tabla 15. Criterios de aceptación para la prueba de efecto de acarreo.

### 2.2.3.6. Curva de calibración

Se prepararon 3 curvas de calibración en plasma humano en el intervalo de concentración nominal que va de 50 a 5 000 ng/mL, según se indica en la tabla 7. Se incluyó en el análisis de cada curva una muestra de blanco de matriz (sin analito ni EI) y una muestra cero (adicionada con EI). Después, se obtuvieron los resultados de concentración recuperada y porcentaje de desviación.

Las curvas de calibración deben cumplir con los criterios de la tabla 16.

<b>Criterio de aceptación</b>	
CC1 (MLIC)	% desviación dentro del $\pm 20\%$ respecto de la concentración nominal
CC2-CC8	% desviación dentro del $\pm 15\%$ respecto de la concentración nominal
Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.99$
1. Al menos 5 de los 6 estándares de la curva de calibración deben cumplir estos criterios.	
2. Al menos el 50 % de cada estándar de la curva debe cumplir estos criterios.	
3. Rechazar un estándar de la curva cuando no cumpla con el % de desviación y recalcular la curva de calibración.	

Tabla 16. Criterios de aceptación para la prueba de curva de calibración.

### 2.2.3.7. Límite inferior de cuantificación

Se prepararon de manera independiente a la curva de calibración 5 réplicas de la muestra Límite Inferior de Cuantificación (LIC), según se indica en la tabla 8. Se procesaron de acuerdo con la metodología de extracción y se obtuvieron la

concentración recuperada y porcentaje de desviación. Las muestras se analizaron junto con las muestras de precisión y exactitud.

Las muestras deben cumplir con los criterios de la tabla 17.

<b>Criterio de aceptación</b>		
<b>Nivel</b>	<b>Precisión</b>	<b>Exactitud</b>
LIC	$\%CV \leq 20\%$	% desviación dentro del $\pm 20\%$ con respecto de la concentración nominal
Al menos 4 de las 5 réplicas de cada nivel de concentración deben cumplir con el criterio de exactitud.		

Tabla 17. Criterios de aceptación para la prueba de límite inferior de cuantificación.

### 2.2.3.8. Precisión y exactitud

Se prepararon por quintuplicado las siguientes muestras control: MCB (150 ng/mL), MCM (750 ng/mL), MCA (4 000 ng/mL) y MCD (6 000 ng/mL). Luego se procesaron de acuerdo con la metodología de extracción y se obtuvo la concentración recuperada y el % de desviación. Los resultados de la precisión intradía (repetibilidad) y de la precisión interdía (reproducibilidad) se utilizaron para la determinación de la exactitud.

<b>Criterio de aceptación</b>		
<b>Nivel</b>	<b>Precisión</b>	<b>Exactitud</b>
MCB MCM MCA MCD	$CV \leq 15\%$	% desviación dentro del $\pm 15\%$ respecto de la concentración nominal
Al menos 4 de las 5 réplicas de cada nivel de concentración deben cumplir con el criterio de exactitud.		

Tabla 18. Criterios de aceptación para las pruebas de precisión y exactitud.

#### 2.2.3.8.1. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un mismo investigador en la misma corrida analítica.

### 2.2.3.8.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad fue evaluada con el mismo analista, en tres corridas analíticas que se realizaron una en cada día.

### 2.2.3.9. Estabilidad

Se preparó por triplicado un volumen de 1 mL de muestras control en plasma a las concentraciones MCB y MCA, según se indica en la tabla 3. Las muestras control preparadas fueron expuestas a las condiciones de almacenamiento descritas en la tabla 19.

Estabilidad	# Réplicas (MCB y MCA)	Matriz	Contenedor	Almacenamiento	Tiempo aprox.
Corto plazo	3	Plasma humano	Polipropileno	Refrigeración (4°C)	12 horas
Muestra procesada	3	Solución de reconstitución	Polipropileno	Refrigeración (4°C)	24 horas
Muestra procesada sin reconstituir	3	Extracto seco	Polipropileno	Refrigeración (4°C)	24 horas
Largo plazo	3	Plasma humano	Polipropileno	Ultracongelación (-80°C)	7 días
Ciclos congelación - descongelación	3	Plasma humano	Polipropileno	Ultracongelación (-80°C) – temperatura ambiente	3 ciclos de 24 horas cada uno
Muestra en automuestreador	3	Solución de reconstitución	Borosilicato	Automuestreador a 20 °C	6 horas
Soluciones estándar de teofilina	3	Solución MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 %v/v	Polipropileno	Refrigeración (4°C) y protegida de la luz	30 días, 3 inyecciones de cada una
Estándar interno en solución	3 de la concentración de trabajo	Solución MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 %v/v	Polipropileno	Refrigeración (4°C) y protegida de la luz	15 días, 3 inyecciones de cada una

Tabla 19. Condiciones de almacenamiento de muestras para las pruebas de estabilidad.

La integridad del analito a las condiciones expuestas debe cumplir con los criterios de precisión y exactitud.

<b>Criterio de aceptación</b>		
<b>Nivel</b>	<b>Precisión</b>	<b>Exactitud</b>
MCB MCA	CV ≤ 15 %	% desviación dentro del ± 15 % respecto de la concentración nominal
1. Todas las respuestas analíticas obtenidas deben ser incluidas en el cálculo del valor promedio y sólo se pueden eliminar aquellas que presentaron problemas por alguna causa asignable, exclusivamente al sistema analítico. 2. Las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que 10%.		

Tabla 20. Criterios de aceptación para las pruebas de estabilidad.

#### **2.2.3.10. Recobro**

Se extrajeron y analizaron por triplicado las siguientes muestras control en plasma: MCB (150 ng/mL), MCM (750 ng/mL) y MCA (5 000 ng/mL), así como las concentraciones equivalentes en solución. Posteriormente, se compararon las respuestas de las muestras extraídas con las muestras en solución para determinar el porcentaje de recobro o recuperación.

Las muestras deben cumplir con los criterios de la tabla 21.

<b>Criterio de aceptación</b>
1. La respuesta de los estándares en solución representa el 100% de recobro. 2. Las muestras deben cumplir con los criterios de exactitud y precisión.

Tabla 21. Criterio de aceptación para la prueba de recobro.

#### **2.2.4. Cuantificación de teofilina en plasma de un voluntario adulto sano en un estudio piloto de farmacocinética**

Se retó el método bioanalítico con muestras de plasma provenientes de un voluntario para conocer el perfil farmacocinético de la nueva formulación en solución oral. La cuantificación se realizó con el método validado.

# **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Desarrollo del método de extracción en HPLC-UV

##### 3.1.1. Extracción de la teofilina a partir de tarjetas Guthrie

En la figura 15 se aprecia que la extracción del analito a partir de muestras recolectadas en tarjetas de tamizaje neonatal dio como resultado cromatogramas con una gran cantidad de interferencias, además de que la señal correspondiente a la teofilina (3.4 min) no se resolvió bien de las señales adyacentes.

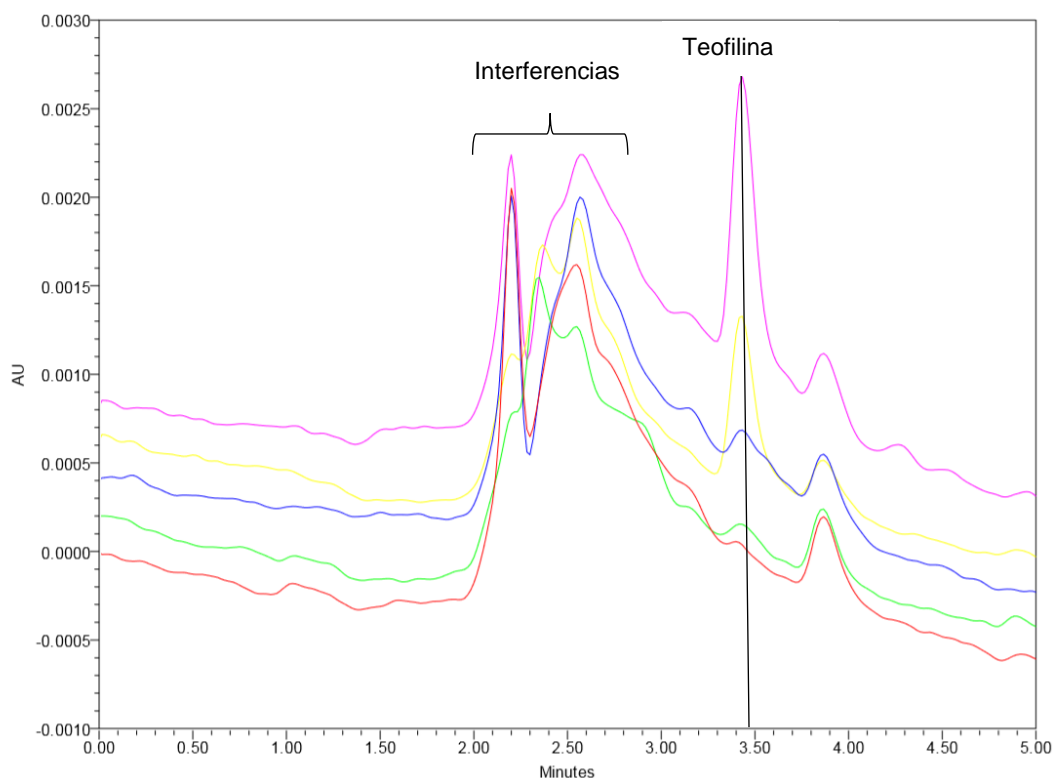


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a cinco extracciones de una concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  de teofilina, a partir de las tarjetas Guthrie, utilizando la metodología original. Se aprecia que la respuesta correspondiente a la teofilina posee baja magnitud, alta variación y no se resuelve adecuadamente de las señales adyacentes.

Durante el desarrollo del método se probaron diferentes condiciones que permitieran mejorar los resultados obtenidos, es decir, que éstos fueran, en principio, lineales, reproducibles y repetibles.

Se sustituyó al  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por ácido tricloroacético al 10% para evitar el uso de sales que pudieran saturar la columna, además de que con el sulfato de amonio el

precipitado era casi nulo. Con el ácido tricloroacético se observó un incremento ligero en el precipitado, pero el tiempo de retención del analito sufría variaciones y las señales tenían un coleo elevado.

Se añadieron pasos como la sonicación en un baño de agua variando la temperatura a 25 y 30 °C para promover la liberación del analito de la tarjeta de tamizaje y la desnaturalización de las proteínas; también se utilizó agitación a diferentes niveles durante 45 segundos. Sin embargo, a pesar de estas modificaciones no se apreciaba un aumento proporcional de la respuesta con respecto de la concentración, además de que los cromatogramas seguían presentando coleo e interferentes de mayor magnitud que la respuesta del analito.

Otra modificación que se probó fue el volumen de disolvente de reconstitución con el fin de concentrar la muestra. Se probaron volúmenes de 50, 100, 150 y 200 µL, pero en ninguno de los casos se obtuvieron mejores resultados.

Se probó la alcalinización del medio con NH<sub>4</sub>OH a pH 10 para que la teofilina se encontrara en su estado no ionizado y se favoreciera el desplazamiento a la fase orgánica. Sin embargo, se observó que hubo degradación del analito a este valor de pH al obtenerse señales con gran coleo. De esta manera, la metodología con alcalinización, cuyos resultados se presentan en la figura 16, fue descartada por no presentar los resultados esperados.

Una de las razones por las que la extracción de la teofilina no se pudo haber logrado es que la tarjeta de tamizaje ejerza una fuerte retención del analito. Otra razón puede ser que, al no obtenerse una precipitación de proteínas suficiente y a la baja cantidad de analito adsorbido en la tarjeta, sólo una pequeña parte de la teofilina se liberó y que la concentración se encuentre por debajo de límite inferior de cuantificación, sumado a la ineficiencia de la extracción.

Por estos motivos se decidió probar la extracción a partir de muestras sanguíneas simuladas.

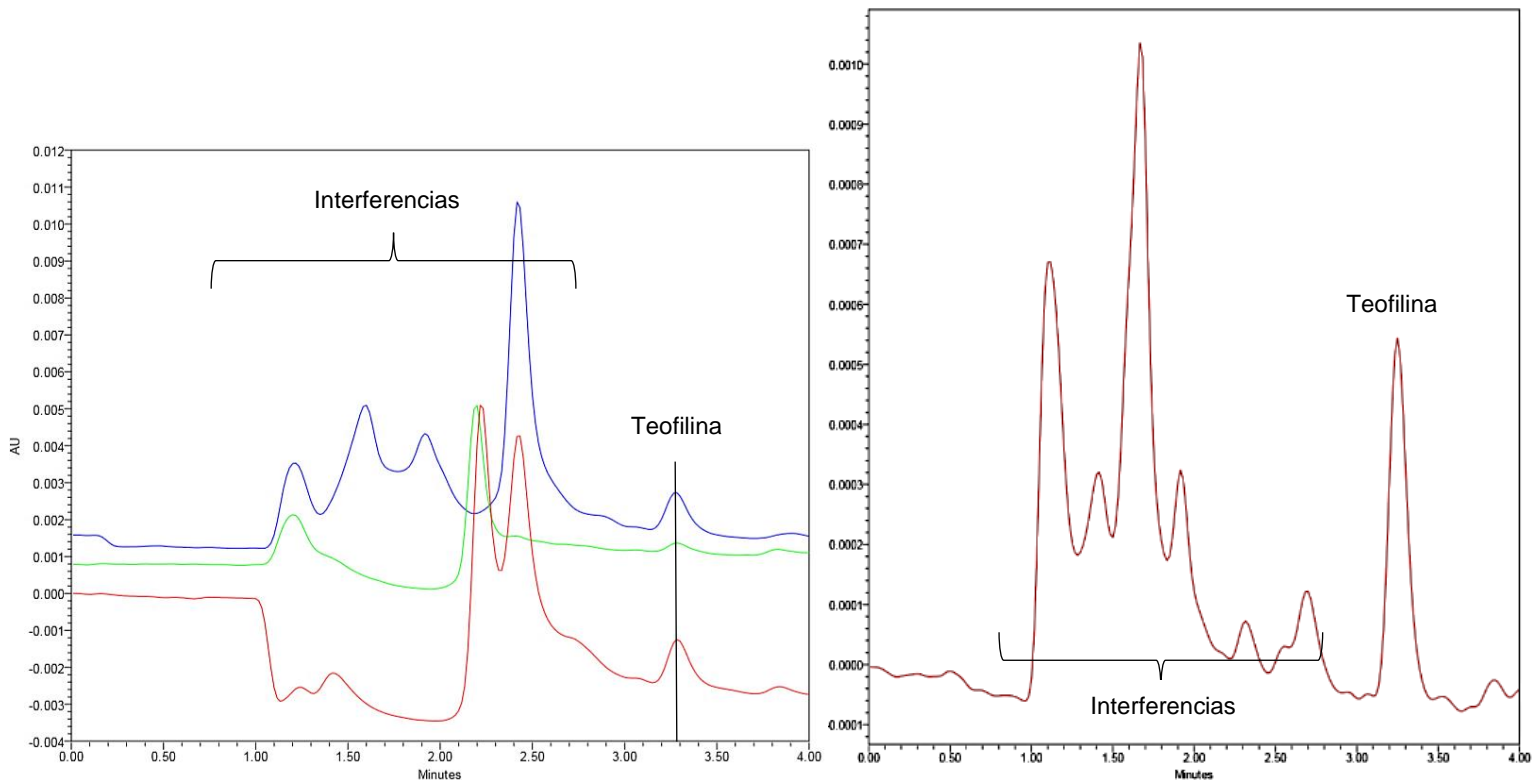


Figura 16. Izquierda: extracción por triplicado de un estándar de 20 µg/mL modificando el pH a 10. No hay reproducibilidad de la respuesta y las interferencias cercanas al tiempo de retención son de mayor magnitud. Derecha: extracción de un estándar de 100 µg/mL sin modificar el pH. La señal se resuelve de las demás, pero posee una magnitud menor que en la figura 15.

### 3.1.2. Extracción de la teofilina a partir de muestras sanguíneas

Al observarse que la extracción a partir de las tarjetas Guthrie no proporcionó los resultados deseados, principalmente en términos de interferencias en los cromatogramas y respuestas de baja magnitud, se optó por extraer el analito a partir de muestras sanguíneas, ya fuese de sangre total o de plasma.

Se realizó la extracción de una curva de calibración en plasma de concentraciones desde 0.5 hasta 30 µg/mL, pero no se obtuvo respuesta para la teofilina ni la etofilina en ninguno de los niveles de concentración, además de que en los niveles más altos de concentración se presentaba acarreo al obtenerse respuestas cada vez de mayor magnitud en el frente de elución, tal y como se observa en la figura 17.



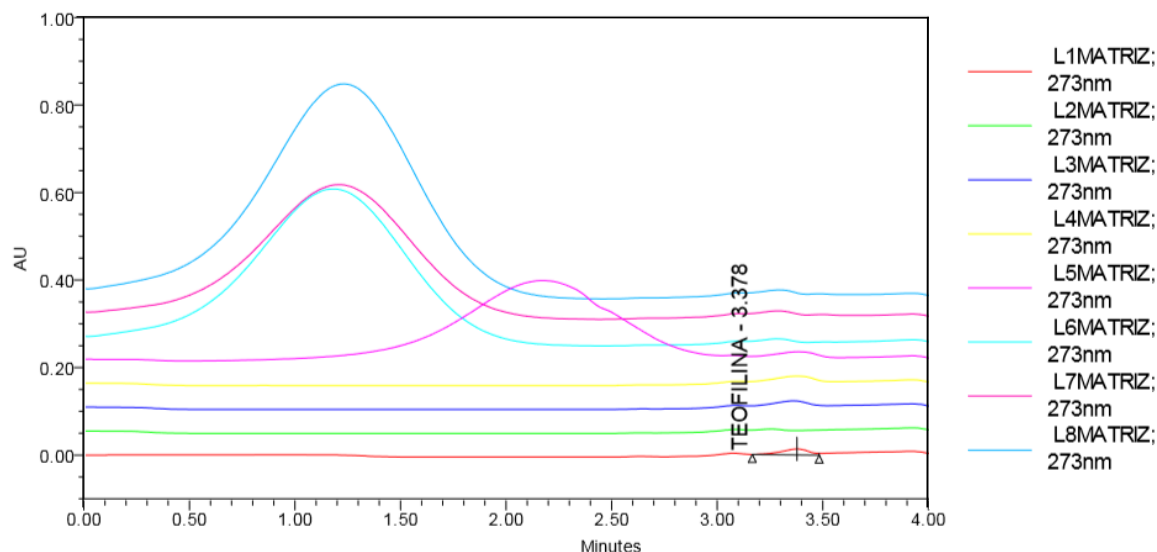


Figura 17. Extracción de curva de calibración en plasma, empleando el intervalo de concentraciones de 0.5 a 30  $\mu\text{g/mL}$ . No se obtuvieron respuestas para los analitos y se observa acarreo a partir del nivel 5 (L5) de concentración.

Al obtener estos resultados, se probó la metodología de extracción con concentraciones más elevadas de teofilina en plasma como 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ , considerando las mismas modificaciones realizadas, pero se obtuvieron resultados similares a la curva con concentraciones menores.

Se pretendió realizar una comparación del método de extracción a partir de plasma y sangre total para determinar si el fármaco pudiera llegar a unirse a los eritrocitos y así mejorar la eficiencia de la extracción, utilizando las concentraciones elevadas (100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, en la figura 15 se aprecia que no se pudo generar dicha comparación, ya que la extracción en ninguna de las dos matrices fue consistente ni eficiente y los resultados no fueron los esperados.

Para ambas matrices se realizaron las mismas modificaciones que para las tarjetas de tamizaje. En este caso los cromatogramas dejaron de presentar interferencias antes del tiempo de retención del analito (3.4 min), pero la respuesta de la teofilina tenía una alta variación en la magnitud y tiempo de retención. También se observó que no había detección del estándar interno.

Todos estos resultados fueron indicativos de que la metodología de extracción no era la adecuada como para extraer una cantidad considerable de analito de cualquiera de las matrices utilizadas, tal que fuera detectable o cuantificable. Otro hallazgo con estos resultados fue que la detección de los analitos tampoco estaba siendo eficiente, ya que la detección por UV no es un método con una alta selectividad, debido a que pueden existir otros componentes en la matriz biológica que presenten absorción en la misma longitud de onda y tiempos de retención muy similares que se superpongan a los analitos.

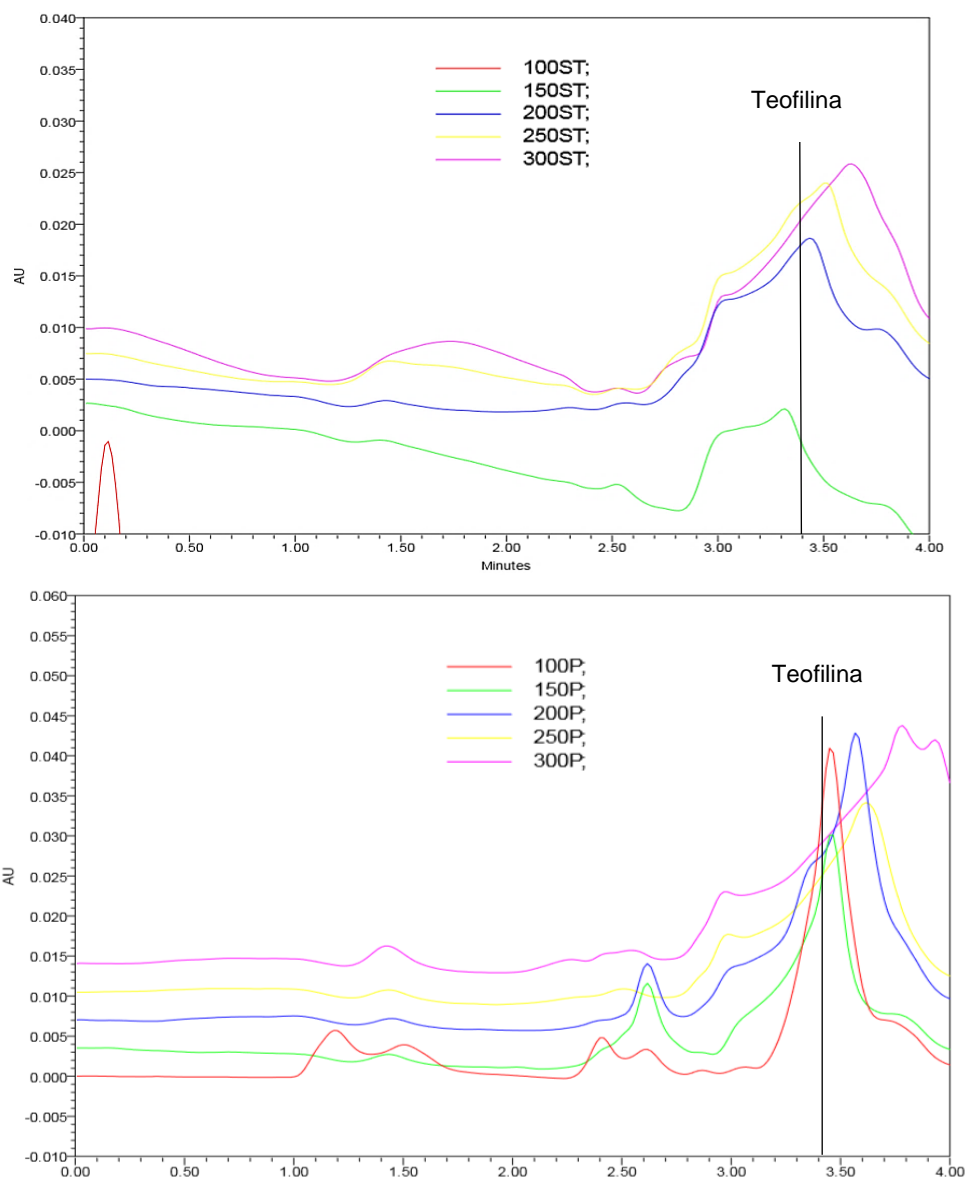


Figura 18. Extracción de estándares de teofilina de concentración de 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Arriba: extracción a partir de sangre total; abajo: extracción a partir de plasma. En ambos cromatogramas se observan respuestas asimétricas y de baja magnitud y resolución.

### 3.2. Desarrollo del método de extracción en UPLC-MS/MS

Una vez determinadas las condiciones de adquisición del método mediante las pruebas de *tuning* y *dwell time*, se procedió al desarrollo del método de extracción. La metodología de extracción empleada en HPLC-UV sirvió como una base para el desarrollo del método analítico en el detector MS/MS. Sin embargo, se adecuó a las características del detector y se intentó optimizar.

En las figuras 19 y 20 se observan los espectros de masas obtenidos para el ion padre y el ion hijo de la teofilina. De esta forma se determinó que la transición del analito era 181.21 >124.27.

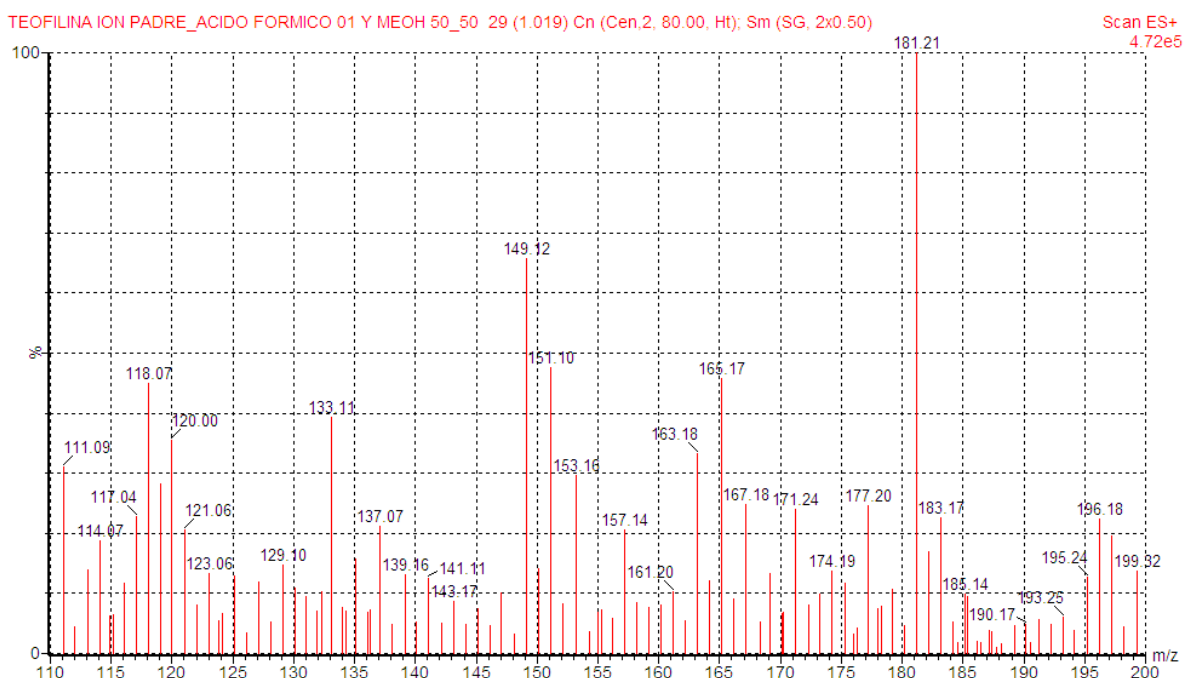


Figura 19. Espectro de masas del ion padre para la teofilina con ácido fórmico 0.1%/MeOH 50:50. ESI+.

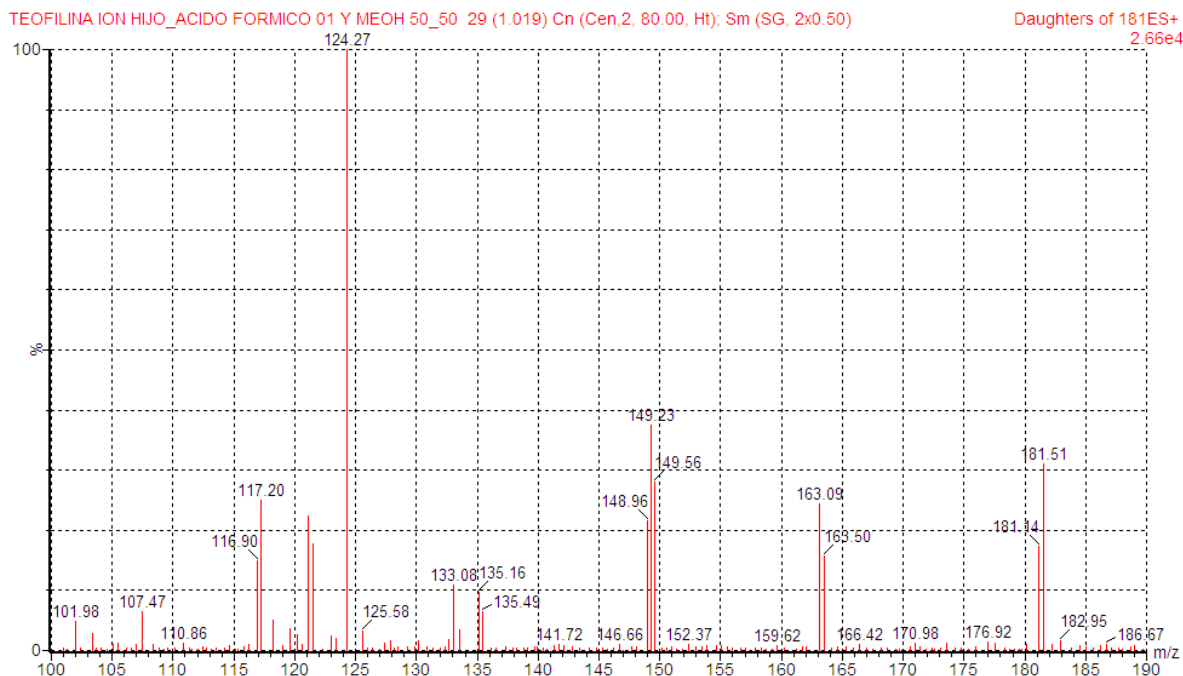


Figura 20. Espectro de masas del ion hijo para la teofilina con ácido fórmico 0.1%/MeOH 50:50. ESI+.

### 3.2.1 Extracción a partir de tarjetas de tamizaje neonatal

Se evaluó de nuevo la factibilidad de la recolección de las muestras en las tarjetas Guthrie y si el tipo de detector ayudaba en la detección y cuantificación del analito. Sin embargo, esto tampoco se pudo lograr debido a que se observaron cromatogramas en los que no se detectaba el analito, y en los que sí se logró la detección, las señales de la teofilina y del estándar interno presentaban coleo y baja magnitud.

Se intentó mejorar la extracción mediante el cambio a pH 4 con ácido fórmico al 1% y a pH 8 con NH<sub>4</sub>OH al 1%. También se probó una metodología en la que se empleó una solución de tripsina en EDTA e incubación a 37°C durante 1 h para favorecer la eliminación de las proteínas.

Estas metodologías no mejoraron la extracción, ya que las respuestas del analito eran de magnitud muy cercanas al compararse con las respuestas de una muestra de blanco de extracción, además de que las curvas de calibración no presentaban una proporcionalidad.

De esta forma se determinó que las tarjetas de tamizaje neonatal (Guthrie) no son un buen soporte para la recolección de las muestras que contengan teofilina. Es muy probable que el analito se quede retenido en la tarjeta aún después de someterse a todo el proceso de extracción.

### **3.2.2. Extracción a partir de plasma humano**

Se decidió probar la metodología de extracción únicamente en plasma humano para obtener la menor cantidad de interferentes y contaminantes posibles que pudieran saturar el detector MS/MS.

Al probar la metodología de extracción utilizada en las otras matrices y detectores, se observaron señales correspondientes al analito y al EI, aunque las áreas de las respuestas no correspondieran con su concentración. Fue por esto que se siguieron realizando modificaciones al método para obtener señales simétricas y de mayor magnitud que las obtenidas anteriormente.

#### **3.2.2.1. Volumen de muestra**

Se observó que al reconstituir las muestras de 500 y 1 000  $\mu\text{L}$  de plasma quedaban muchos residuos suspendidos provenientes de la matriz biológica, que podrían ensuciar el equipo al saturar la columna o el cono del detector MS/MS. Las muestras con 20  $\mu\text{L}$ , a pesar de contener la menor cantidad de residuos al reconstituir, no presentaron resultados lineales.

Con los volúmenes de muestra de 50, 100 y 250  $\mu\text{L}$  se obtenían respuestas consistentes y sin coleos, además de que la cantidad de residuos durante la extracción era prácticamente nula. No obstante, se prefirió utilizar el volumen de 50  $\mu\text{L}$  con la finalidad de disminuir el gasto de los reactivos para la extracción y generar menos residuos.

#### **3.2.2.2. Precipitación de proteínas**

La precipitación directa de la muestra utilizando acetonitrilo o MeOH fríos no arrojó buenos resultados, ya que hubo casos en los que ni siquiera hubo detección de la teofilina ni la etofilina, independientemente de la concentración. En los casos en que

sí se detectaron, las señales tenían un ruido elevado y la magnitud de las respuestas no era útil para el método. Por esta razón, se descartó esta metodología.

La precipitación con sales y con disolventes dio mejores resultados, pero debido a que la cantidad de sulfato de amonio y su concentración eran elevadas, quedaban residuos en el cono del detector después de cada corrida, lo que podía afectar al equipo. Por ello se decidió disminuir el volumen y la concentración de la sal.

Se probó la precipitación de proteínas utilizando 500  $\mu\text{L}$  de sulfato de amonio al 20% en combinación de 600  $\mu\text{L}$  de acetona. Con esta combinación se obtuvo una mayor cantidad de precipitado a diferencia de las otras metodologías, pero las curvas de calibración evaluadas no siempre eran lineales. Esta metodología se comparó con los resultados de la extracción en la que se emplearon 500  $\mu\text{L}$  de sulfato de amonio al 20% m/v, 500  $\mu\text{L}$  de MeOH frío y 600  $\mu\text{L}$  de acetona; se observó que con esta última metodología se obtenían mejores resultados, puesto que las respuestas presentaban una mejor linealidad y eran repetibles y reproducibles. Sin embargo, aún quedaba gran cantidad de residuos de la sal en el equipo, por lo que se disminuyó el volumen adicionado.

Finalmente, se observó que la mejor combinación de agentes precipitantes fue utilizando 120  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 380  $\mu\text{L}$  de MeOH, previamente enfriado en ultracongelación durante 15 min y 600  $\mu\text{L}$  de acetona. Con esta combinación el precipitado de proteínas era compacto, sencillo de separar por decantación y se observaron mejores respuestas cromatográficas.

### **3.2.2.3. Extracción líquido-líquido**

Los disolventes se seleccionaron de acuerdo con la solubilidad del analito, además se probó el método de extracción con menores volúmenes para disminuir la cantidad de residuos generados. Después de probar los disolventes orgánicos y sus combinaciones y diferentes volúmenes se determinó que utilizando 1 mL de cloroformo/isopropanol en proporción 95:5% v/v los resultados eran lineales comparado con los demás disolventes de extracción y las respuestas eran repetibles, reproducibles y de mayor magnitud a comparación de las demás.

De acuerdo con las características fisicoquímicas de la teofilina, es más soluble en cloroformo que en los demás disolventes orgánicos, por esta razón se extrajo mayor cantidad de teofilina. La combinación con isopropanol aumenta la polaridad de la mezcla de extracción, lo que facilita el reparto de la teofilina a la fase orgánica al ser un compuesto de mediana polaridad.

#### **3.2.2.4. Volumen de reconstitución**

Se realizó la comparación de las respuestas obtenidas con los diferentes volúmenes probados. Se determinó que con 200  $\mu\text{L}$  las respuestas eran consistentes, simétricas y poseían la mayor magnitud en comparación con los demás volúmenes, Además, este volumen permite la reinyección de una muestra si fuera necesario.

#### **3.2.2.5. Desarrollo final del método de extracción**

Una vez determinadas las mejores condiciones para el método de extracción, se repitió el análisis de curvas de calibración y, como se muestra en la figura 21, se observaron respuestas con tendencia de aumento proporcional a la concentración, independientemente de los parámetros que se requieren en las pruebas de validación.

En un principio, la curva de calibración planteada cubría el intervalo de concentraciones de 250 a 6000 ng/mL, pero de acuerdo con los resultados de la figura 21, se observó que se necesitaba distribuir los puntos de la curva, además de que se probó disminuir el límite inferior de cuantificación. También se vio que la respuesta del estándar interno tenía que aumentarse, por lo que se cambió la concentración de 1000 ng/mL a 4000 ng/mL para que se equiparara con el punto medio de la curva.

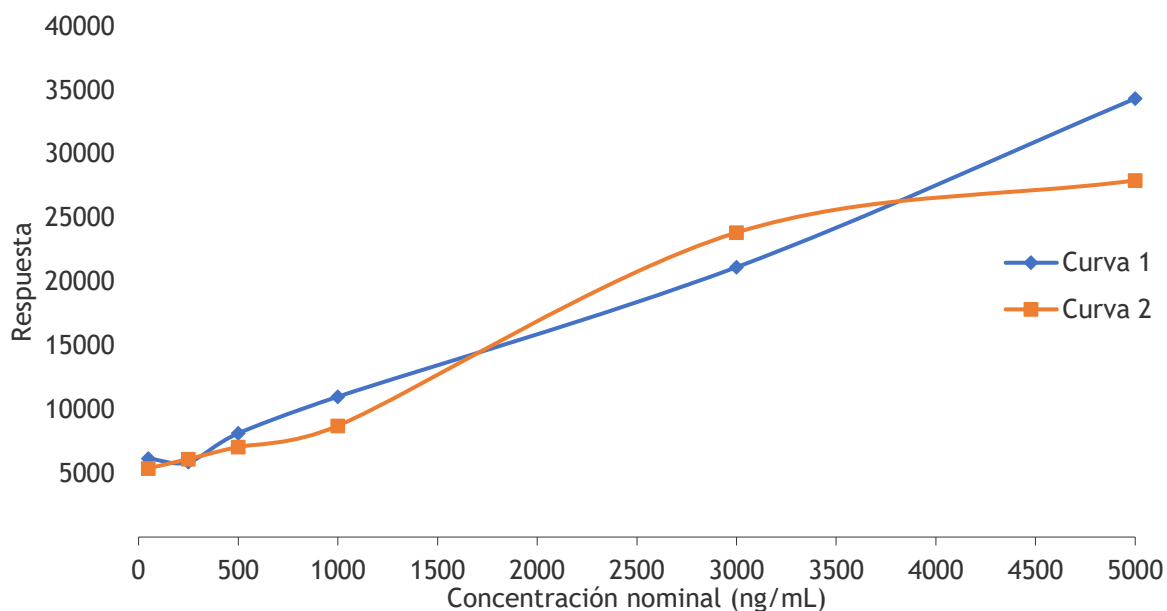


Figura 21. Prueba de curva de calibración para la evaluación del desarrollo del método. Las curvas presentan tendencia creciente a pesar no ser lineales. En estas curvas la concentración de EI usada fue de 1000 ng/mL.

Una vez estandarizada la metodología, y que las curvas de calibración proporcionaron resultados lineales y reproducibles, se pudo realizar la validación del método analítico de acuerdo con el protocolo previamente generado.

### 3.3. Validación del método bioanalítico

#### 3.3.1. Desempeño del sistema

Para cada corrida analítica se evaluó el desempeño del sistema. Como se observa en la tabla 22, el tiempo de retención no sufrió variación alguna, mientras que la respuesta analítica tuvo una variación menor al 5%.



Inyección	Tiempo de retención	Área
1	1.59	385317.219
2	1.59	392003.219
3	1.59	393151.313
4	1.59	386548.063
5	1.59	389265.344
6	1.59	384965.469
Promedio	1.59	388541.771
D.E.	0	3189.315
C.V.%	0	0.820

Tabla 22. Resultados del desempeño del sistema. El tiempo de retención no tuvo variaciones, mientras que la variación de la respuesta fue menor que 5%.

### 3.3.2. Selectividad

#### 3.3.2.1. Selectividad a compuestos endógenos

Todas las fuentes analizadas presentaron una interferencia en el analito mayor al 20% del LIC se presentan en la tabla 23. Debido a la dieta de la población mexicana, y que no es una condición para la donación de sangre el no consumir xantinas, se consideró a la teofilina como una entidad endógena y por esta razón se seleccionaron las fuentes que tuvieran el menor porcentaje de interferencia, tales como los plasmas 2, 5, 6 y hemolizado. Sin embargo, el método es capaz de diferenciar la cuantificación al verse aumentada la respuesta con la adición de una concentración conocida de la teofilina.

Uno de los criterios de inclusión para el estudio en voluntarios sanos será el no consumo de fuentes de xantinas (café, chocolate, té negro, etc.) por lo menos tres días antes de la toma de muestra, por lo que se podrá disminuir o incluso evitar esta interferencia en las muestras de los voluntarios.

Plasma	% Interferencia en teofilina	% Interferencia en EI
1	134.67	0.359
2	65.141	-
3	163.348	-
4	77.07	-
5	48.919	-
6	40.846	-
HEM	27.061	-

Tabla 23. Resultados de selectividad a compuestos endógenos utilizando siete fuentes en total para la evaluación. HEM = matriz hemolisada. Las fuentes de plasma seleccionadas para la validación se resaltan con color azul.

### 3.3.2.2. Selectividad a compuestos concomitantes y anticoagulantes

Se determinó la no interferencia de fármacos que se emplean simultáneamente a la administración de teofilina, tales como acetaminofén, levocetirizina, propionato de fluticasona, furoato de mometasona, cafeína y prednisona. No se obtuvo respuesta por parte de los compuestos concomitantes en el tiempo de retención del analito ni del EI, con excepción de la cafeína. Al ser metilxantinas, y estructuralmente muy similares, la teofilina y la cafeína se detectan en tiempos de retención muy cercanos. No obstante, debido al método de adquisición del detector MS/MS, es posible diferenciar ambos compuestos.

También, se demostró que el uso de anticoagulantes como la heparina o el EDTA no afecta el tiempo de retención del analito, pero estos resultados indicaron un aumento de la respuesta del 55% para la heparina y del 58% para el EDTA, con respecto del límite inferior de cuantificación. Los resultados de estas pruebas se observan en las figuras 19, 20 y 21.

Cabe destacar que el plasma utilizado ya contiene un anticoagulante (CPD) desde que se procesan las muestras de donación en el banco de sangre, por lo que no se sabe si el aumento en estas respuestas se deba a los propios anticoagulantes evaluados o a alguna interacción entre estos durante la prueba.

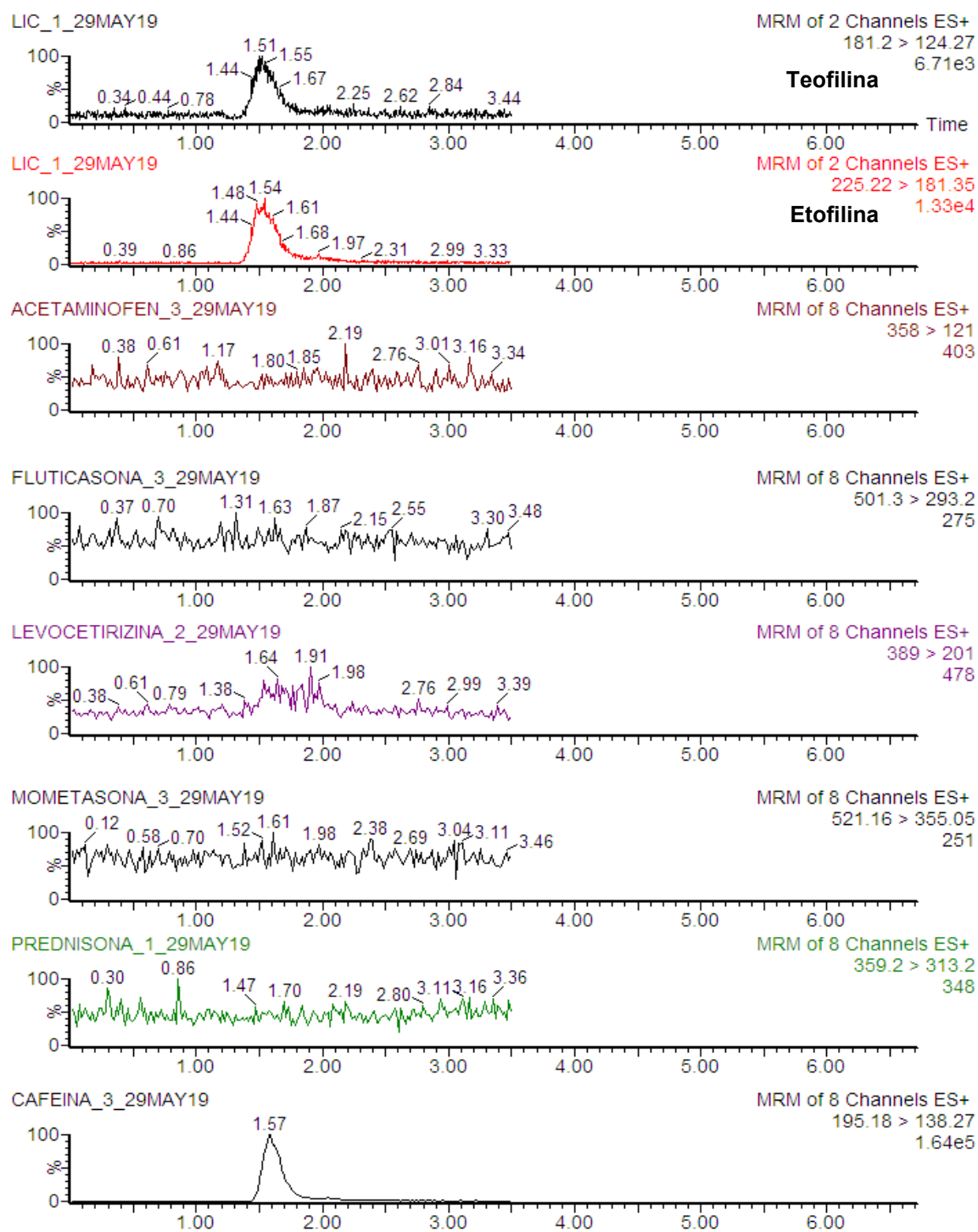


Figura 22. Cromatogramas de selectividad a compuestos concomitantes. No se observan interferencias en el tiempo de retención de teofilina y etofilina, con excepción de la cafeína. La transición de 225.22 > 181.35 corresponde al EI, mientras que la de 181.2 > 124 corresponde a la teofilina.

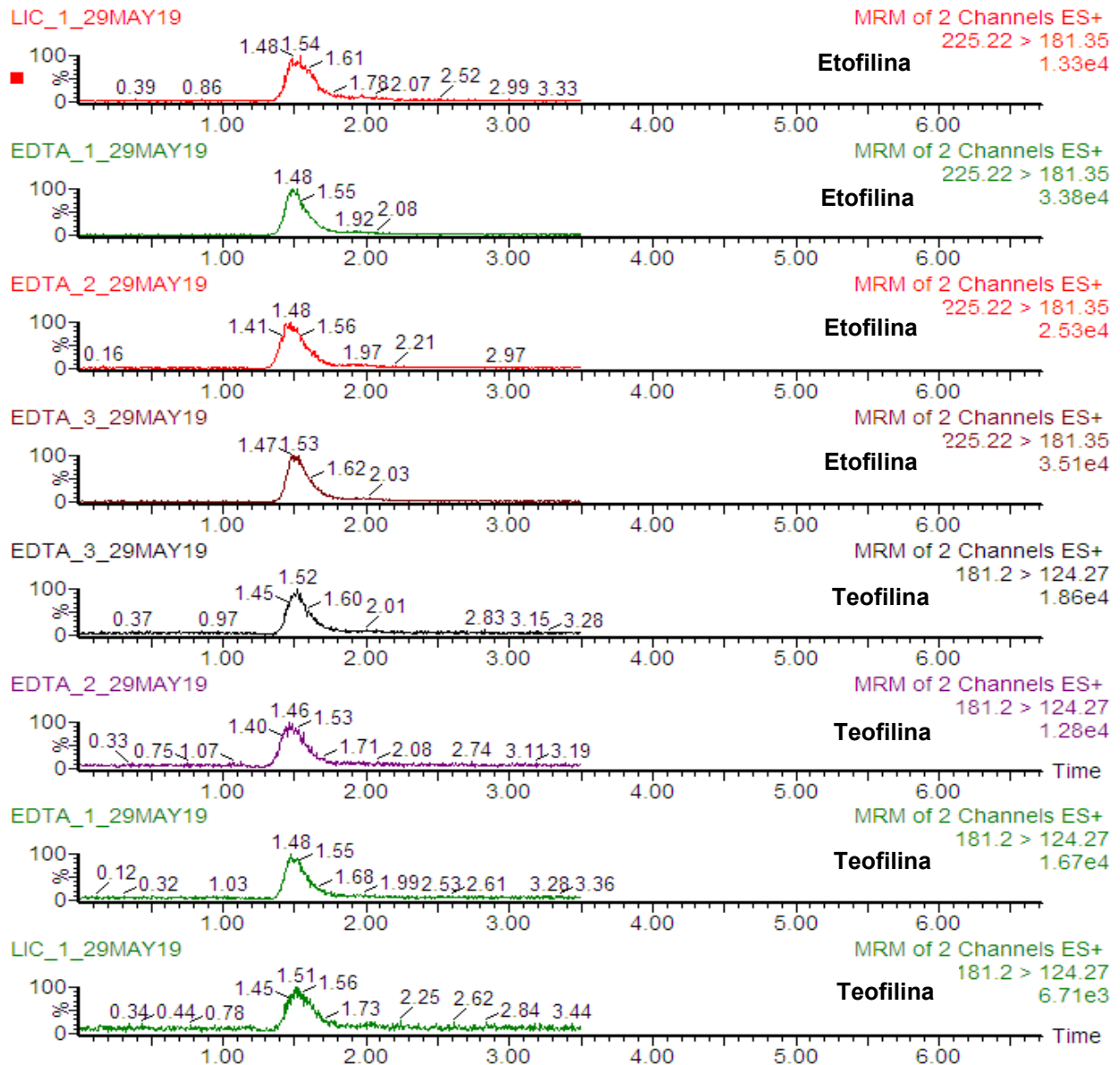


Figura 23. Cromatogramas para la extracción de LIC utilizando EDTA como anticoagulante. La señal no se ve modificada por el tipo de anticoagulante para la teofilina ni para el EI. La transición de 225.22 > 181.35 corresponde al EI, mientras que la de 181.2 > 124 corresponde a la teofilina.

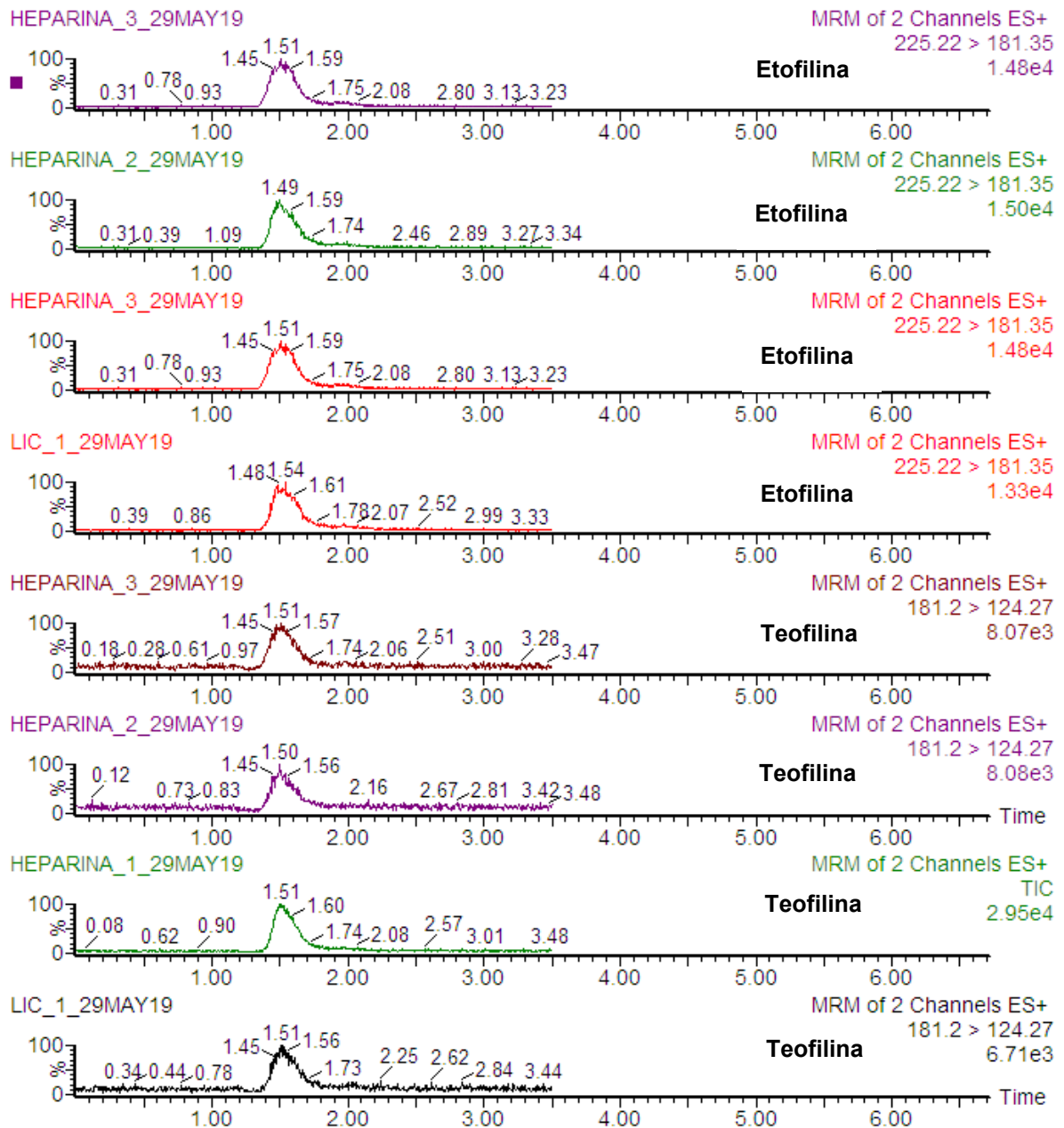


Figura 24. Cromatogramas de la extracción de LIC utilizando Heparina 10 UI/mL como anticoagulante. Se observa que la respuesta no se ve modificada para el analito ni para el EI. La transición de 225.22 > 181.35 corresponde al EI, mientras que la de 181.2 > 124.27 corresponde a la teofilina.

### 3.3.3. Efecto de matriz

De las siete fuentes de matriz analizadas (6 normales y una hemolizada), aquellas en las que se obtuvo un coeficiente de variación menor al 15% se presentan en la tabla 24. El plasma hemolizado presentó efecto de matriz en ambos niveles de concentración, por lo que no se podrá analizar una muestra que se encuentre con esta condición.

Es posible que el grado de hemólisis sea un factor condicionante para este tipo de matriz, ya que el plasma se preparó de manera que estuviera completamente hemolizado.

Muestra	FMN en nivel bajo (150 ng/mL)	FMN en nivel alto (4000 ng/mL)
2	1.390	1.265
5	1.204	1.121
6	1.402	1.121
Promedio	1.332	1.169
D.E.	0.111	0.141
C.V. (%)	8.344	12.031
Criterio de aceptación	C.V. % ≤ 15%	

Tabla 24. Resultados para la prueba de efecto de matriz. Las fuentes 2, 5 y 6 cumplieron con el criterio de aceptación, mientras que con las demás la variación era elevada.

### 3.3.4. Efecto de acarreo

El acarreo puede ser generado por residuos de muestra que queden en alguna parte del equipo, como puede ser la aguja para la inyección, el loop, la columna o el detector. Esto puede ocasionar que las respuestas se superpongan, dando un resultado erróneo en la cuantificación. En la tabla 25 se observa que las respuestas correspondientes al analito o estándar interno no interfieren con inyecciones subsecuentes dentro de la corrida analítica.

Muestra	Área teofilina	Área EI
Blanco	-	-
LSC (5000 ng/mL)	5706.212	3077.852
Blanco	-	7.956
Blanco	-	-
LIC (50 ng/mL)	1234.621	2958.803
% Interferencia con respecto de LIC	-	0.27
Criterio de aceptación	Respuesta $\leq$ 20%	Respuesta $\leq$ 5%

Tabla 25. Resultados del efecto de acarreo. No se presentaron interferencias significativas para el analito y el estándar interno.

### 3.3.5. Curva de calibración

Se determinó que el método es lineal en el intervalo de concentración nominal que va de 50 a 5 000 ng/mL, al obtenerse un coeficiente de correlación (r) mayor que 0.99 en las tres curvas evaluadas. La desviación de la concentración recuperada con respecto de la concentración nominal no rebasó el  $\pm 20\%$  para el LIC ni el  $\pm 15\%$  para el resto de los puntos, tal y como se muestra en las tablas 26 y 27. Estos resultados indican que el intervalo propuesto se puede utilizar para cuantificar una muestra problema, siempre considerando los demás parámetros del método.

Estándar	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6
Concentración nominal (ng/mL)	50	500	1000	2500	3500	5000
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	49.863	519.879	1017.357	2386.716	3504.965	5060.472
% Desviación respecto de conc. nominal	-0.274	3.976	1.736	-4.531	0.142	1.209
C.V. %	12.359	14.833	0.239	4.489	2.584	1.923
Criterio de aceptación	% Desviación de $\pm 20\%$ para LIC y $\pm 15\%$ para CC2 a CC6					

Tabla 26. Resultados de la evaluación de curva de calibración. Las tres curvas evaluadas cumplen con los criterios de la validación.

	Pendiente	Ordenada al origen	r
Promedio	1.019	1864.872	0.9992
Desv. Est.	0.049		
C.V. %	4.84		

Tabla 27. Parámetros de linealidad y del modelo matemático que describen a la curva de calibración.

En la figura 25 se observan las tres curvas de calibración evaluadas y se muestra la ecuación de la línea recta que representa al promedio de las tres.

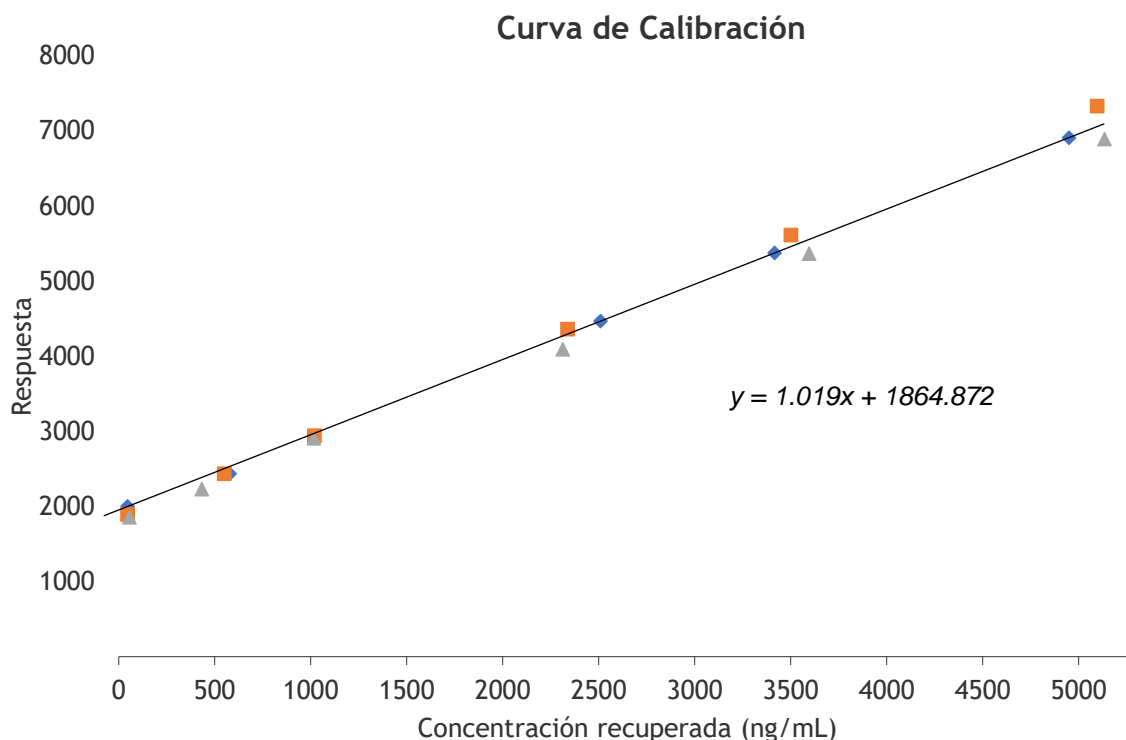


Figura 25. Comparación de las tres curvas de calibración evaluadas para la prueba de la validación. Las tres presentan proporcionalidad y linealidad. Se presenta la ecuación de la línea recta que representa a las tres curvas.

### 3.3.6. Precisión y exactitud

#### 3.3.6.1. Repetibilidad

En la tabla 28 se observa que el método analítico fue repetible en el mismo día, ya que se obtuvo que la variación para el límite inferior de cuantificación y las muestras control baja, media y diluida fue menor al 6%; para la muestra control alta se obtuvo una variación menor al 13%.

La NOM-177-SSA1-2013 indica que el C.V.% debe ser menor del 15% para las muestras control y menor del 20% para el límite inferior de cuantificación. Con estos resultados se determinó que el método cumple con la precisión intradía.



Muestra	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (750 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)	MCD (6000 ng/mL)
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	50.322	147.929	726.432	3633.610	5923.746
D.E.	2.533	4.943	40.477	440.006	105.502
C.V. %	5.033	3.341	5.572	12.109	1.781
Criterio de aceptación	C.V. % ≤ 20%	C.V. % ≤ 15%			

Tabla 28. Resultados de precisión intradía. El coeficiente de variación de las muestras control y del límite inferior de cuantificación cumplen con el criterio de aceptación, demostrando que el método es repetible. D.E. = desviación estándar. C.V.% = coeficiente de variación.

### 3.3.6.2. Reproducibilidad

En la tabla 29 se observa que el método fue reproducible al realizarse en diferentes días. La variación obtenida para el LIC y las muestras controles baja y media fue menor al 8% y para la muestra control alta fue menor al 12%.

De esta manera, el método cumplió con la precisión interdía al obtenerse un C.V.% menor al 15% para las muestras control y menor al 20% para el límite inferior de cuantificación.

	Muestra	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (750 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
Día 1	1	52.91	155.128	825.642	3610.348
	2	46.152	155.982	746.926	4119.946
	3	52.323	144.448	790.63	4432.346
	4	42.794	150.181	717.288	3842.786
	5	52.178	132.112	741.213	4043.809
Día 2	6	48.74	138.474	671.444	3495.572
	7	54.041	149.395	701.261	2793.525
	8	48.447	149.537	765.22	3841.904
	9	48.492	146.958	701.524	3851.705
	10	51.891	151.422	749.249	3915.437
Día 3	11	50.49	162.914	722.866	4258.672
	12	46.881	138.277	689.741	4419.675
	13	45.174	162.07	846.711	4452.204
	14	44.616	153.954	775.342	4541.82
	15	47.071	155.182	830.19	4414.486
Promedio		48.813	149.736	751.683	4002.282
D.E.		3.394	8.656	53.724	467.268
C.V. %		6.952	5.781	7.147	11.675
Criterio de aceptación		C.V. % ≤ 20%	C.V. % ≤ 15%		

Tabla 29. Resultados de la precisión interdía. El coeficiente de variación para las muestras control y el límite inferior de cuantificación cumplen con el criterio de aceptación, por lo que se concluyó que el método es reproducible. D.E. = desviación estándar. C.V.% = coeficiente de variación.

### 3.3.6.3. Exactitud

Para determinar la exactitud del método analítico se tiene que calcular el error relativo o porcentaje de desviación, el cual se refiere al grado de concordancia entre la concentración nominal y la concentración obtenida.

En la tabla 30 se observa que el porcentaje de desviación obtenido para las muestras control y el límite inferior de cuantificación (LIC) se encuentra dentro del criterio de aceptación. La concentración recuperada debe encontrarse dentro del  $\pm 20\%$  para el límite inferior de cuantificación y del  $\pm 15\%$  para las muestras control.

Estos resultados indican que la cuantificación de una muestra con el método analítico estará muy cerca del valor real.

Muestra	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (750 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)	MCD (6000 ng/mL)
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	48.813	149.736	751.683	4002.283	5923.746
D.E.	3.163	8.575	50.644	438.657	105.502
C.V. (%)	6.426	5.727	6.737	10.960	1.781
% Desv.	-1.568	-0.176	0.224	0.057	-1.271
Criterio de aceptación	% Desv. dentro del $\pm 20\%$	% Desv. dentro del $\pm 15\%$			

Tabla 30. Resultados de la evaluación de la exactitud del método. La desviación de la concentración obtenida de las muestras control y del límite inferior de cuantificación, con respecto de la concentración nominal, cumplió con el criterio de aceptación. D.E. = desviación estándar. C.V.% = coeficiente de variación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

La ecuación con la que se calculó el porcentaje de desviación se presenta a continuación:

$$\% \text{ Desv.} = \frac{\text{Concentración recuperada} - \text{Concentración nominal}}{\text{Concentración nominal}} \times 100\%$$

### 3.3.7. Estabilidad

#### 3.3.7.1. Corto plazo

En la tabla 31 se muestran los resultados de la estabilidad de la muestra después de 12 h de su preparación y almacenamiento a 4°C. Estos resultados indican que el analito se mantiene estable bajo estas condiciones al obtenerse una desviación absoluta de la concentración menor al 15% establecida por la NOM-177-SSA1-

2013. Sin embargo, se aconseja que las muestras se guarden en congelación o ultracongelación para asegurar su integridad.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
<b>Concentración recuperada promedio (ng/mL)</b>	153.426	4038.283
<b>% Desv.</b>	2.28	0.96
<b>Criterio de aceptación</b>	% Desv. dentro del $\pm 15\%$	

Tabla 31. Resultados de estabilidad de la muestra después de 12 h de su preparación y almacenamiento a 4°C. La integridad del analito se conservó al obtenerse un porcentaje de desviación dentro del criterio de aceptación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

### 3.3.7.2. Largo plazo

El objetivo de evaluar la estabilidad a largo plazo es asegurarse que las muestras se conservarán íntegras por un período similar o mayor al que durará el muestreo.

En la tabla 32 se presentan los resultados de la estabilidad de las muestras control baja y alta después de 8 días de su preparación y almacenadas a -80°C. Se observa que la desviación de la concentración recuperada se encuentra dentro del  $\pm 15\%$  permitido por la normatividad mexicana.

Es así que se determinó que la integridad de las muestras se conserva bajo las condiciones de almacenamiento propuestas a largo plazo.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
<b>Concentración recuperada promedio (ng/mL)</b>	151.005	3978.002
<b>% Desv.</b>	0.67	-0.32
<b>Criterio de aceptación</b>	% Desv. dentro del $\pm 15\%$	

Tabla 32. Resultados de estabilidad a los 8 días de preparación de las muestras y almacenamiento en ultracongelación a -80°C. El analito se mantiene estable bajo estas condiciones de almacenamiento. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

### 3.3.7.3. Muestra procesada sin reconstituir

En la tabla 33 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad de muestras procesadas hasta el extracto seco y que se almacenaron durante 24 h en refrigeración a 4°C.

El porcentaje de desviación para ambos niveles de concentración se encontró dentro del  $\pm 15\%$  que la norma permite. Con esta prueba se determinó que las muestras procesadas que no sean reconstituidas son estables bajo las condiciones de almacenamiento propuestas y no sufrirán una variación significativa.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	149.051	4067.718
% Desv.	-0.63	1.69
Criterio de aceptación	% Desv. dentro del $\pm 15\%$	

Tabla 33. Resultados de estabilidad de muestra procesada sin reconstituir. Las muestras en extracto seco se almacenaron en refrigeración durante 24 h. El porcentaje de desviación para ambos niveles de concentración se encontró dentro del criterio de aceptación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

#### 3.3.7.4. Muestra procesada reconstituida

La estabilidad de una muestra procesada y reconstituida da la certeza que, en caso de procesar completamente la muestra y no inyectarla en el mismo día, producirá los mismos resultados que si se analizara el mismo día de su extracción.

En la tabla 34 se observa que la desviación de la concentración para las muestras control baja y alta se encuentran dentro del  $\pm 15\%$  permitido, por lo que es indistinto si el análisis se efectúa en el mismo día o, por máximo, al día siguiente del procesamiento bajo las condiciones de almacenamiento propuestas.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	150.344	3978.002
% Desv.	0.23	-0.55
Criterio de aceptación	% Desv. dentro del $\pm 15\%$	

Tabla 34. Resultados para la muestra procesada reconstituida. Las muestras reconstituidas y almacenadas en refrigeración durante 24 h, en los viales para la inyección, presentaron un porcentaje de desviación dentro del criterio de aceptación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

#### 3.3.7.5. Ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 35 se presentan los resultados para la estabilidad en ciclos de congelación-descongelación con una duración cada uno de 24 h. Se observa que la

concentración recuperada tiene un porcentaje de desviación dentro del  $\pm 15\%$ , con respecto de la concentración nominal, y un coeficiente de variación menor al 15%.

Con esta prueba se obtuvo que, en caso de que se requiera un reanálisis de alguna de las muestras, la congelación y descongelación consecutivas no tendrá repercusión sobre la cuantificación del analito.

Muestra		MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
Concentración recuperada promedio (ng/mL)	Ciclo 1	146.462	3865.276
	Ciclo 2	145.385	3820.065
	Ciclo 3	150.698	3883.358
Concentración recuperada promedio 3 ciclos (ng/mL)		147.515	3856.233
D.E.		6.482	100.519
C.V. (%)		4.394	2.607
% Desv.		-1.657	-3.59
Criterio de aceptación		<ul style="list-style-type: none"> <li>• % Desv. dentro del <math>\pm 15\%</math></li> <li>• C.V. % <math>\leq 15\%</math></li> </ul>	

Tabla 35. Resultados de la estabilidad en ciclos de congelación-descongelación. El coeficiente de variación y el porcentaje de desviación para ambos niveles de concentración cumplen con los criterios de aceptación. D.E. = desviación estándar. C.V.% = coeficiente de variación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

### 3.3.7.6. Estabilidad en automuestreador

Esta prueba indica si el analito se mantiene estable bajo las condiciones del automuestreador durante el tiempo de duración de la corrida analítica.

En la tabla 36 se presentan los resultados después de someter las muestras a estas condiciones durante 6 h, donde se observa que la concentración recuperada para ambas muestras control se encuentra dentro del criterio de aceptación propuesto por la NOM-177-SSA1-2013, la cual indica que debe encontrarse dentro del  $\pm 15\%$  para que se considere un resultado satisfactorio.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
<b>Concentración recuperada promedio (ng/mL)</b>	150.194	4004.323
<b>% Desv.</b>	0.129	0.108
<b>Criterio de aceptación</b>	% Desv. dentro del $\pm 15\%$	

Tabla 36. Resultados de la estabilidad en automuestreador. Las muestras se mantuvieron estables a temperatura de 20°C durante 6 h, al obtenerse un porcentaje de desviación dentro del establecido por el criterio de aceptación. %Desv. = desviación con respecto de la concentración nominal.

### 3.3.7.7. Estabilidad en solución

Esta prueba se realiza para demostrar que el analito no sufre degradación al cabo de cierto tiempo de estar en solución. En las tablas 37 y 38 se presentan los resultados para la estabilidad de las soluciones MCB, MCA a los 30 días, y para el estándar interno a los 15 días. Todas las soluciones se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Se encontró que las soluciones de teofilina no son estables al cabo de 30 días, ya que se obtuvo una desviación de la respuesta mayor al 10% que se indica en la NOM-177-SSA1-2013. Para el caso del estándar interno, se obtuvo que la desviación absoluta de la respuesta no fue mayor del 10%. Es así que se determinó que todas las diluciones deben prepararse nuevamente después de 15 días.

Muestra	MCB (150 ng/mL)	MCA (4000 ng/mL)
<b>Área promedio</b>		
<b>Recién preparada</b>	41157.724	86181.003
<b>Almacenada por 30 días</b>	6008.725	111729.503
<b>% Desv.</b>	85.401	29.645
<b>Criterio de aceptación</b>	% Desv. dentro del $\pm 10\%$	

Tabla 37. Resultados de estabilidad en solución para muestras control alta y baja. Después de 30 días las soluciones dejan de ser estables.

El aumento de la respuesta en la solución MCA almacenada por 30 días puede deberse a la degradación del analito por evaporación del disolvente.

Debido a que la concentración del estándar interno que se usó durante el desarrollo del método se modificó gracias a la prueba de curva de calibración, el tiempo de almacenamiento de esta solución para esta prueba se redujo. Inicialmente, se tenía

pensado en analizar el estándar interno en el mismo lapso que la teofilina. Sin embargo, esto sirvió como indicativo de que la concentración se modificó antes del tiempo que se había planeado.

<b>Muestra</b>	<b>EI (4000 ng/mL)</b>
	<b>Área promedio</b>
<b>Recién preparada</b>	126561.190
<b>Almacenada por 15 días</b>	114502.229
<b>% Desv.</b>	-9.528
<b>Criterio de aceptación</b>	% Desv. dentro del $\pm 10\%$

Tabla 38. Estabilidad en solución para el estándar interno (etofilina) a la concentración de trabajo (4000 ng/mL). Después de 15 días, el porcentaje de desviación se encuentra en el límite permitido.

### 3.3.8. Recobro

La prueba de recobro o recuperación no se encuentra señalada en la normatividad mexicana, sin embargo, es una buena medida de la eficiencia de un método analítico. La prueba se realizó de acuerdo con la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA, donde se indica que el recobro no tiene que ser el 100%, pero las muestras deben cumplir con los criterios de precisión y reproducibilidad.

En la tabla 39 se presentan los resultados de la prueba, en la que las muestras cumplieron con los criterios antes señalados al tener un C.V.% menor al 15%. El recobro para los tres niveles de concentración fue de aproximadamente el 6%, lo que indica que gran parte del analito queda sin extraerse de la matriz biológica. Estos resultados dan pauta a una optimización del método para mejorar el recobro, a pesar de que las demás pruebas de validación presentaron resultados satisfactorios.

	MCB (150 ng/mL)		MCM (750 ng/mL)		MCA (4000 ng/mL)	
	Área en método	Área en sistema	Área en método	Área en sistema	Área en método	Área en sistema
	3066.136	66359.141	3874.229	93105.336	8344.43	134168.391
	3498.027	66440.297	3891.695	94389.461	10097.482	134616.766
	3487.545	67131.063	3991.415	94664.539	8130.989	133692.406
<b>Promedio área</b>	3350.569	66643.500	3919.113	94053.112	8857.634	134159.188
<b>% Recobro</b>	5.028		4.167		6.602	

Tabla 39. Resultados de la prueba de recobro. Las muestras cumplieron con la exactitud y precisión para el análisis. Los resultados indicaron que la eficiencia en la extracción es baja.

### 3.3.9. Cuantificación de teofilina en plasma de un voluntario sano

En la tabla 40 se presentan los resultados de la cuantificación del analito a partir de muestras sanguíneas obtenidas de un voluntario sano en un estudio piloto de farmacocinética, a quien se le administró la nueva formulación, con el objetivo de retar el método validado.

Muestra	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)
1	0	0
2	0.5	3826.74
3	0.75	2989.289
4	1	3223.274
5	1.5	2879.594
6	2	2512.38
7	3	2051.401
8	4	1844.88
9	6	1689.732
10	10	1214.283
11	24	NC*

Tabla 40. Resultados de la concentración plasmática de teofilina en el voluntario 1 utilizando el método bioanalítico validado. \*NC = no cuantificado. La muestra 11 tuvo respuesta por debajo del límite inferior de cuantificación.

Como se puede ver en la figura 26, se pudo construir el perfil farmacocinético de la nueva formulación de teofilina con el método validado. Se observa que esta alcanza la C<sub>max</sub> al tiempo de 0.5 h y que la concentración disminuye conforme pasa el tiempo. También se observa que al tiempo de 1 h la concentración vuelve a



aumentar por una probable recirculación enterohepática. La respuesta de la muestra de las 24 h se encontró por debajo del límite inferior de cuantificación, por lo que no se pudo interpolar un valor para la cuantificación.

De acuerdo con estos resultados, los tiempos de muestreo para el estudio clínico se modificarán con el objetivo de perfilar mejor la farmacocinética de la nueva formulación, especialmente para la parte de la concentración máxima.

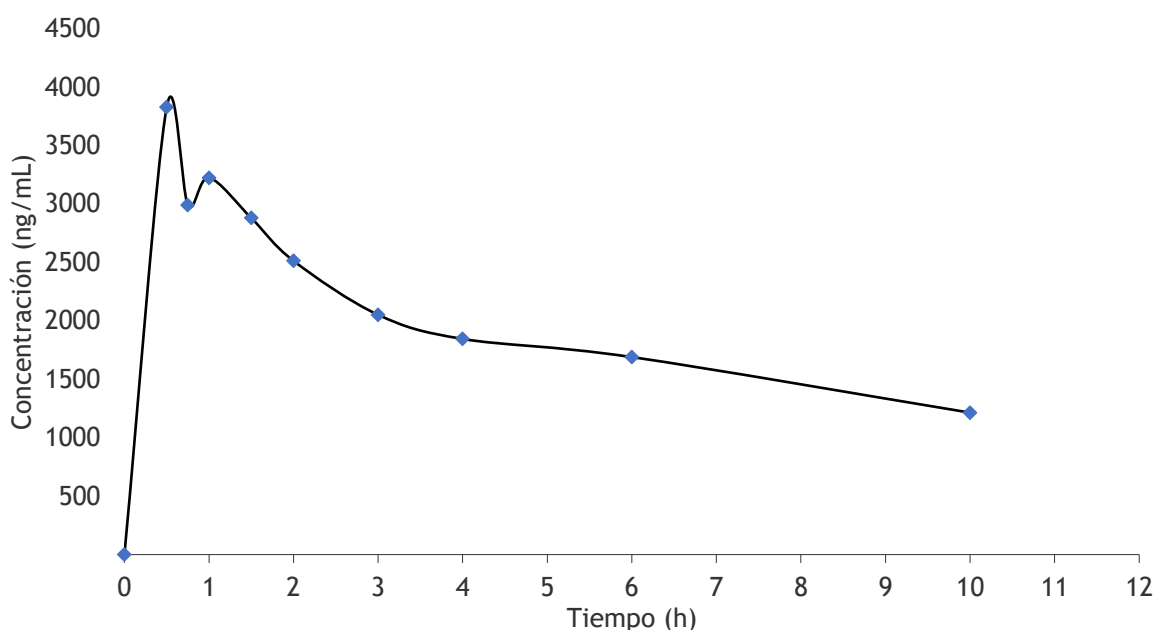


Figura 26. Perfil farmacocinético del voluntario 1. La  $C_{max}$  obtenida fue de aproximadamente 4000 ng/mL y se alcanzó al tiempo de 0.5 h. Se observó un aumento de la concentración después de 1 h de la administración del medicamento.

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

No se logró desarrollar ni validar el método bioanalítico mediante detección con UV, debido a una elevada cantidad de interferentes en los cromatogramas que impedían el correcto análisis de las respuestas. De esta manera se cambió la detección por espectrometría de masas/masas.

Se desarrolló y validó un método bioanalítico por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un detector de masas/masas (UPLC-MS/MS) para la cuantificación de teofilina a partir de plasma humano de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013 y la *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation* de la FDA.

El método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 50 a 5000 ng/mL.

Se determinó que la matriz hemolizada no será sujeta a análisis al encontrarse que esta presenta efecto de matriz.

Se evaluó la estabilidad de la teofilina en plasma bajo condiciones de almacenamiento, proceso y análisis. También, se evaluó la estabilidad de soluciones del analito y del estándar interno y se determinó que la preparación de las diluciones debe realizarse en un máximo de 15 días, almacenándose en refrigeración a 4 °C.

Se determinó que las tarjetas de tamizaje neonatal (tarjetas Guthrie) no son un buen soporte para la recolección de muestras que contengan teofilina, debido a que se demostró, tanto en UV como en MS/MS, que la respuesta analítica no variaba en función de la concentración y que se presentaba una gran cantidad de interferentes que impedía la integración de las señales.

Se demostró que el plasma es la mejor matriz para la extracción de la teofilina, pero la metodología requiere una optimización dado que los resultados del recobro son bajos. Una vez optimizada, podría probarse nuevamente en tarjetas de tamizaje y en muestra provenientes de ratón.

Se utilizó el método bioanalítico para perfilar la farmacocinética de una nueva formulación en solución oral de teofilina en un voluntario sano de un estudio piloto, retando la cuantificación con esta metodología ya validada.

Este método bioanalítico se puede emplear para cuantificar teofilina en el estudio de evaluación de perfil farmacocinético en voluntarios sanos.

## Referencias

1. Larenas LD. Guía Mexicana del Asma. 2017;Supl 11:11–128. Disponible en: <http://revistaalergia.mx>
2. Carbajal A. Ratones y ratas de laboratorio. Mater Methods es [Internet]. el 31 de agosto de 2018; Disponible en: <file:///method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
3. Reglamento Técnico Centroamericano. Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos. 2006.
4. Services USD of H and H, Administration F and D, Research C for DE and, Research C for BE and. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs an Biologics [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
5. HPLC - High Performance Liquid Chromatography Explained: Waters [Internet]. 2018. Disponible en: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en\\_US](http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US)
6. COFEPRIS. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. 2013 [citado el 12 de octubre de 2018]. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013)
7. Use IC on H of TR for R of P for H. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005.
8. De G, Rápida R. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA GPC Diagnóstico y Tratamiento de APNEA DEL PREMATURO [Internet]. [citado el 10 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-724-14-Apneadelprematuro/724GRR.pdf>
9. Journey JD, Bentley TP. Theophylline Toxicity [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019 [citado el 12 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422557>
10. Hernández E, Calderón D, Valenzuela A, Ortiz M, Osnaya N, Cervantes MJ.

Evaluación de una formulación en solución oral de teofilina para enfermedades respiratorias en el área pediátrica. Ciudad de México: Instituto Nacional de Pediatría; 2017.

11. Valverde Molina E. Farmacia pediátrica hospitalaria [Internet]. Madrid: Elsevier Doyma; 2011. Disponible en: [http://files/49/LIBRO\\_FARMACIA.pdf](http://files/49/LIBRO_FARMACIA.pdf)
12. DrugBank. Theophylline [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00277>
13. Sigma-Aldrich. Theophylline T1633 [Internet]. Sigma-Aldrich. 2018. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1633>
14. Chavda H, Patel C, Anand I. Biopharmaceutics classification system. Syst Rev Pharm [Internet]. el 25 de diciembre de 2010;1(1):62. Disponible en: <http://www.sysrevpharm.org/text.asp?2010/1/1/62/59514>
15. Papich MG, Martinez MN. Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) Criteria to Predict Oral Absorption of Drugs in Dogs: Challenges and Pitfalls. AAPS J [Internet]. julio de 2015 [citado el 10 de junio de 2019];17(4):948–64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916691>
16. Siya M, Sinai Kunde D, Bhilegaonkar S, Godbole AM, Pankaj Gajre M. Biopharmaceutical Classification System: A Brief Account [Internet]. Vol. 1. 2015 [citado el 10 de junio de 2019]. Disponible en: [www.ijrm.humanjournals.com](http://www.ijrm.humanjournals.com)
17. Bhakay A, Rahman M, Dave RN, Bilgili E. Bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs via nanocomposites: Formulation–Processing aspects and challenges. Pharmaceutics. 2018;10(3).
18. Theophylline [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00277>
19. Theophylline - FDA prescribing information, side effects and uses [Internet]. Drugs.com. 2018. Disponible en: <https://www.drugs.com/pro/theophylline.html>
20. Corporation IBM. Theophylline Oral [Internet]. IBM Micromedex. 2018. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo\\_gbc.php?bib\\_vv=3](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=3)

21. Hinderliter P, Saghir SA. Pharmacokinetics. *Encycl Toxicol Third Ed.* 2014;87:849–55.
22. REY ME. Bioequivalencia, biodisponibilidad y EFG. Algunas consideraciones. *Farm Prof [Internet]*. 2001;15(10):88–93. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-bioequivalencia-biodisponibilidad-efg-algunas-consideraciones-13021207>
23. Sociedad Española de Oncología Médica, Sociedad Española de Enfermería Oncológica, NOVARTIS. ¿Qué es un ensayo clínico? [Internet]. 2018 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Ensayos\\_Clinicos\\_JUL18.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Ensayos_Clinicos_JUL18.pdf)
24. Hotha KK. QUANTIFICATION OF DRUGS IN BIOLOGICAL MATRICES BY MASS SPECTROMETRY AND THEIR APPLICATIONS TO PHARMACOKINETIC STUDIES in FACULTY OF CHEMISTRY By HOTHAKISHORE KUMAR. JAWAHARLAL NEHRU TECHNOLOGICAL UNIVERSITY ANANTAPUR; 2012.
25. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina. REPASO TEÓRICO BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA MÉDICA 2ª UNIDAD TEMÁTICA [Internet]. 2012 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/REPASO\\_TEORICO\\_BLOQUE\\_2\\_2012.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/REPASO_TEORICO_BLOQUE_2_2012.pdf)
26. Chamberlain J. The analysis of drugs in biological fluids. CRC Press; 1995. 36–39 p.
27. Amin Baig A, Sultan U, Abidin Z. Biochemical composition of Biochemical composition of normal urine normal urine. *Nat Preced [Internet]*. 2011 [citado el 12 de junio de 2019]; Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/290457.pdf>
28. Rao RN, Prasad KG, Naidu CG, Saida S, Agwane SB. Development of a validated LC-MS/MS method for determination of doxofylline on rat dried blood spots and urine: Application to pharmacokinetics. *J Pharm Biomed Anal [Internet]*. 2013;78–79:211–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.017>
29. Chae J, Kim D, Lee B, Kim E jung, Kwon K. Development and validation of a sensitive LC–MS/MS method for the simultaneous quantitation of theophylline and its

- metabolites in rat plasma. *J Chromatogr B* [Internet]. el 15 de marzo de 2012 [citado el 15 de junio de 2019];889–890:44–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023212000608?via%3Dihub>
30. Kertys M, Urbanova A, Mokry J. Quantification of Theophylline in Guinea Pig Plasma by LC-MS/MS Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phase: Method Development, Validation, and Application in Study. *Acta Medica Martiniana*. 2018;17(3):5–15.
  31. Lineamiento Técnico Tamiz Neonatal Detección y tratamiento oportuno e integral del hipotiroidismo congénito [Internet]. [citado el 14 de marzo de 2019]. Disponible en: [http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/Tamiz\\_Neonatal\\_lin\\_2007.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/Tamiz_Neonatal_lin_2007.pdf)
  32. Vidal Vademecum España. Heparina [Internet]. 2010 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-heparina-c05ba03>
  33. Cir C, Trejo C, Resumen I. ARTÍCULO DE ACTUALIZACIÓN Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos [Internet]. Vol. 18. 2004 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v18n1/art14.pdf>
  34. Martí Pérez S, Bosch A. CRITERIOS DE TRABAJO SEGÚN LA MUESTRA Y EL ESTUDIO DESTINADO [Internet]. [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: [https://www.biobancovasco.org/upload/LIBRO\\_DERIVADOS\\_HEMATICOS\\_CAP3.pdf](https://www.biobancovasco.org/upload/LIBRO_DERIVADOS_HEMATICOS_CAP3.pdf)
  35. Pomilio AB, Vitale AA. Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos. *Acta bioquímica clínica Latinoam* [Internet]. 2006;40(3):347–82. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572006000300010](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572006000300010)
  36. Ochoa SH. Precipitación de proteínas [Internet]. CDMX; 2010 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>
  37. Angurell I, Casamitjana N, Caubet Á, Dinarés I, Llor N, Muñoz D, et al. Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química [Internet]. [citado el 12 de junio de 2019].



Disponible en: [http://www.ub.edu/oblq/oblq\\_castellano/index1.html](http://www.ub.edu/oblq/oblq_castellano/index1.html)

38. Franco AG, Yepes PNM. Experimentos de Química Orgánica [Internet]. Ediciones Elizcom, editor. Quindío; 2009 [citado el 12 de junio de 2019]. 75–80 p. Disponible en:  
<https://books.google.com.mx/books?id=Otm5wsEeKYEC&pg=PA75&dq=extraccion+liquido+liquido&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi27r2euuXiAhVJX60KHdZBBOUQ6AEITTAG#v=onepage&q=extraccion+liquido+liquido&f=false>
39. SCP Science. Extracción en fase sólida [Internet]. 2017 [citado el 12 de junio de 2019]. Disponible en: [www.scpscience.com](http://www.scpscience.com)
40. Alejandro Hernández Loyola Q. Métodos cromatográficos [Internet]. 2019 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en:  
[https://bioquimicaexperimental.files.wordpress.com/2017/01/mc3a9todos-cromatogrc3a1ficos\\_ahl.pdf](https://bioquimicaexperimental.files.wordpress.com/2017/01/mc3a9todos-cromatogrc3a1ficos_ahl.pdf)
41. Dhandapani R, Phenomenex. ¿Qué es la HPLC y Cómo Funciona? [Internet]. 2017 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en:  
<https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>
42. Analitek. Cromatografía de Líquidos [Internet]. 2016 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en: <http://analitek.com/cromatografia-de-liquidos-2/>
43. Harris DC, Berenguer Navarro V. Análisis químico cuantitativo. Reverté; 2007.
44. Sánchez MA. Métodos de Calibrado [Internet]. 2013 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en:  
[http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio\\_vr1.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio_vr1.pdf)
45. Biocompare. HPLC UV Detector (UV/Visible HPLC Detectors) [Internet]. 2019 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/>
46. Biocompare. HPLC Refractive Index Detector (HPLC RI Detector) | Biocompare.com [Internet]. 2019 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en:  
<https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13033-HPLC-Refractive-Index->

Detector-HPLC-RI-Detector/

47. Scott RPW. Detectors: Refractive Index Detectors [Internet]. Avon; 2000 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en: <http://index-of.co.uk/Tutorials-2/Detectors-Refractive Index Detectors.pdf>
48. Schuster R, Schulenberg-Schell Helmut. Fluorescence detection in liquid chromatography [Internet]. 2000 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en: [http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/fluorescence\\_primer.pdf](http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/fluorescence_primer.pdf)
49. Choi H. Advantages of Photodiode Array [Internet]. Seoul; 2004 [citado el 13 de junio de 2019]. Disponible en: [http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper\\_choi.pdf](http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf)
50. Letter W. Advanced Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) For A Variety of HPLC Applications. 1990.
51. Bretón A, De Regil C, Rubén H. SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS [Internet]. [citado el 10 de marzo de 2019]. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion\\_proteinas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf)
52. PREMIER Biosoft. Mass Spectrometry :: Introduction, Principle of Mass Spectrometry, Components of Mass Spectrometer, Applications [Internet]. [citado el 10 de marzo de 2019]. Disponible en: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html)
53. ThermoFisher Scientific. Overview of Mass Spectrometry - MX [Internet]. [citado el 10 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html>
54. Plascencia Villa G. Espectrometría De Masas Presenta: Germán Plascencia Villa Junio De 2003 Cuernavaca, Morelos. 2003 [citado el 10 de junio de 2019];1–40. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec\\_Masas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf)
55. Emory University. Mass Spectrometry Ionization Methods [Internet]. 2017 [citado el 10 de junio de 2019]. Disponible en: <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>

56. Sciex a B. Manual Tuning Tutorial. Anal. 2012;(March):1–14.
57. AB Sciex. What is dwell time? [Internet]. 2019. Disponible en: <https://sciex.com/community/support-community/faqs-and-discussions/analyst/general-analyst-questions/what-is-the-dwell-time>
58. Begum SS, Sushmaa BS, Vijayaraja S. Bioanalytical Techniques – An Overview. PharmaTutor [Internet]. el 17 de septiembre de 2015;3(9):14–24. Disponible en: <http://www.pharmatutor.org/magazines/articles/september-2015/bioanalytical-techniques-an-overview>
59. Services USD of H and H, Administration F and D, Research C for DE and, Medicine C for V. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry [Internet]. 2001. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>
60. Kowalski J, Lupo S, Cochran J. Mitigar el «efecto matriz»: Estrategias de dilución, QuEChERS y calibración para el análisis LC-MS/MS de residuos de plaguicidas en distintos alimentos – guíalab [Internet]. 2018 [citado el 10 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/sistemas-de-reactores-berghof/>
61. Kuster L. Superar los efectos matriz en LC-MS/MS para lograr la máxima confiabilidad [Internet]. 2017 [citado el 10 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.romerlabs.com/es/centro-de-conocimiento/biblioteca-del-conocimiento/articulos/news/superar-los-efectos-matriz-en-lc-msms-para-lograr-la-maxima-confiabilidad/>
62. Peat MA, Jennison TA, Chinn DM. Analysis of Theophylline in Serum and Whole Blood Samples by High-Pressure Liquid Chromatography. J Anal Toxicol. 1977;1.
63. Babu ARS, Thippeswamy B, Vinod AB, Ramakishore EG, Anand S, Senthil D. Determination of theophylline in rabbit plasma by triple quadrupole LC/MS. Pharm Methods [Internet]. 2011 [citado el 15 de junio de 2019];2(4):211. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658072/>
64. Cervantes MJ. Evaluación de una formulación en solución oral de teofilina para enfermedades respiratorias en el área pediátrica. UNAM; 2019.

