



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO PARA
CUANTIFICAR DEXTROPROPOXIFENO EN PLASMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CARLOS ALBERTO TRUJILLO GOMEZ



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

0349664



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).

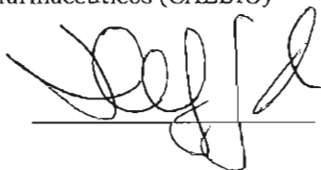
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente: HELGI HELEN JUNG COOK
Vocal: SOFIA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO
Secretario: LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ
1er sup. LIZ JANNET MEDINA REYES
2do sup. LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE

Realizada en el Centro Analítico para Estudios Biofarmacéuticos (CAEBIO)

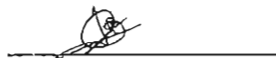
Asesor del tema: Helgi Helen Jung Cook

Handwritten signature of Helgi Helen Jung Cook, written in black ink over a horizontal line.

Supervisor Técnico: Maria Elena Girard Cuesy

Handwritten signature of Maria Elena Girard Cuesy, written in black ink over a horizontal line.

Sustentante: Carlos Alberto Trujillo Gómez

Handwritten signature of Carlos Alberto Trujillo Gómez, written in black ink over a horizontal line.

En primer lugar quiero dedicar esta Tesis a mis padres por su constante e incondicional apoyo durante toda mi vida.

MADRE: Quiero agradecerte todo lo que me has enseñado. Son muchas las cosas que he aprendido de ti, sin embargo quisiera remarcar el impulso que me has dado enseñándome que siempre se debe ver hacia delante, que uno llega hasta donde quiere si no se pone límites así mismo. Me siento muy orgullosos de ser tu colega

PADRE: Dos cosas que me has enseñado y que siempre me servirán son; que las cosas buenas de la vida se consiguen con esfuerzo y no de un día si no de todos los días de la vida. El segundo punto y que no va desligado del primero, es que no nada mas hay que trabajar duro, sino que jamás de debe olvidar uno de su honestidad para consigo mismo y para con los demás. Tal vez no cambiemos al mundo pero la tranquilidad que se tiene de hacer las cosas bien y honestamente es la mejor recompensa.

TOÑO: Gracias por tu nobleza y humor, me sirvió mucho el que estuvieras conmigo las tardes en que llegaba y prendía la computadora para trabajar en la Tesis

Abuelito Hector: También a ti te quiero dedicar esta Tesis. Tu siempre animándome y aconsejándome ser un hombre de provecho, gracias

Abuelita Lola: Se el gusto que te da ver el esfuerzo que he puesto para lograr una meta importante en mi vida, con mucho cariño te dedico esta tesis

Abuelito Pancho: Como me hubiera gustado verte en mi examen profesional, tal vez recordando el día en que se recibió tu hija menor (Mi mamá) de la misma carrera y que no podías contener las lágrimas de la alegría, como sea se que estás con nosotros y te quiero dedicar mi Tesis.

Abuelita Lupita: Sé del gusto que te puede dar un logro como estos de tu nieto. Me encanta tu manera de ver siempre hacia delante y jamás achicarse ante nada para crecer.

Difícilmente podré nombrar a toda mi familia, sin embargo quiero decirles que han sido parte importante en esta Tesis, ya sea con consejos o simplemente con alegrarme algún momento y animarme. Gracias a todos

También quisiera agradecer a todos esos amigos que estuvieron conmigo durante la carrera, la verdad es que hemos pasado momentos increíbles que jamás olvidaré, a todas estas personas, gracias, Gracias a: Ricardo Sánchez, Carla Gonzalez, Gamaliel Hernández, Erika Uribe, Sergio Calderón, Zoraima Martinez, Susana Aquiahuatl, Karla Juárez, Adriana Alcalá. Y por supuesto, no puedo dejar de mencionar a una persona muy importante, gracias por tu enorme grano de arena, gracias: ILLANA JACQUELINE VENEGAS SERVIN

Dedico esta Tesis también a mis amigos que han estado conmigo durante casi toda mi vida, se que esta amistad durará por siempre, gracias a:

Santiago Ortiz, Antonio, Daniel y Paul Bello (y a toda su familia), Carlos Pomier y Jose Manuel Prado.

De manera muy especial quiero dedicar esta Tesis a dos personas muy especiales e importantes en mi vida, gracias a: LORENA GARCIA MEDINA y MARLEN HERRERA VILLELA

Y por supuesto no puedo dejar de mencionar a una persona que tal vez no tenga mucho tiempo de conocerla, sin embargo a sido parte importantísima en este logro, ha sido inspiración en mi vida para buscar siempre ser una mejor persona, gracias:

YAZMÍN MONTSERRAT RAMOS VAZQUEZ

Gracias por tu paciencia. De verdad has sido parte importantísima en este logro

De igual manera quisiera agradecer a mis sinodales por la disponibilidad que han tenido conmigo, pero quisiera agradecerle especialmente a la Doctora Helgi Jung. Doctora de verdad es una persona a quien yo admiro, es un ejemplo a seguir. Se de muchos de sus logros que ha tenido a lo largo de su vida, sin embargo tal vez lo que mas admiro de usted es el hecho de que a pesar de todos esos logros posee una humildad envidiable, de verdad es usted una increíble persona.

Por último quiero expresar el orgullo que siento de haber cursado mis estudios en la UNAM, la mejor universidad del País le pese a quien le pese. Todos los momentos que viví durante mi carrera son inolvidables:

“GOYA, GOYA, CACHÚN CACHÚN, RA RA

CACHÚN CACHÚN, RA RA, GOYA, UNIVERSIDAD”

INDICE

CAPITULO 1.....	1 – 2
Introducción y Objetivos	
▪ Introducción.....	1 – 2
▪ Objetivo.....	2
CAPITULO 2.....	3 – 14
GENERALIDADES	
▪ 2.1 Biofarmacia.....	3 – 6
▪ 2.1.1 Aspectos generales de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.....	6 - 9
▪ 2.1.2 Relación entre concentraciones sanguíneas de fármaco y la respuesta farmacológica.....	9
▪ 2.1.3 Niveles plasmáticos del fármaco, biodisponibilidad.....	9 - 10
▪ 2.1.4 Aspectos generales de los estudios de biodisponibilidad.....	10 - 11
▪ 2.1.5 Determinación de biodisponibilidad para nuevos fármacos.....	11 - 12
▪ 2.1.6 Determinación de biodisponibilidad comparativa entre medicamentos genéricos (Bioequivalencia).....	12
• 2.1.7 Aprobación de genéricos	12 – 13
• 2.2 Validación	13
• 2.3 Principios y establecimientos de validación de métodos analíticos	14

CAPITULO 3..... 15 - 21

Monografía del dextropropoxifeno

- Absorción, biotransformación y excreción..... 16 – 17
- Toxicidad..... 17
- Tolerancia y dependencia..... 17
- Uso 17 – 18
- Contraindicaciones 18
- Reacciones adversas 19
- Advertencias para el paciente 19
- Dosis 19
- Medicamentos con Dextropropoxifeno (t)..... 20
- Métodos para cuantificar Dextropropoxifeno 21

CAPITULO 4..... 22 - 32

Parte experimental

- Desarrollo del método analítico 22 - 23
- Materiales, reactivos y equipos..... 23 - 25
- Preparación de soluciones reactivo..... 26 - 27
- Preparación de soluciones, curva patrón y puntos control..... 27 – 30
- Método analítico para la cuantificación del Dextropropoxifeno 30 – 32
- Método de extracción 30 - 31
- Condiciones cromatográficas..... 31 – 32

CAPÍTULO 5	33 - 37
Validación del método analítico	
CAPÍTULO 6.....	38 - 53
Resultados	
CAPÍTULO 7.....	54 - 60
Análisis de resultados	
CAPÍTULO 8.....	61
Conclusiones	
BIBLIOGRAFÍA	62 - 64

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La salud es una de las prioridades que tenemos como seres vivos. Es por ello que, desde tiempos ancestrales el hombre ha hecho lo posible por encontrar las maneras de mantenerse sano. Según los conocimientos, las necesidades y las posibilidades, cada cultura ha desarrollado diferentes modos de extender su expectativa de vida. Para la mayoría de la población mexicana que habita las zonas urbanas, se ha adoptado la medicina a base de fármacos o alopática, que, a diferencia de otras corrientes de la medicina actúa sobre un órgano o célula específica. El largo y costoso proceso de investigación, por el que pasa una nueva molécula con cierta actividad biológica para poder ser registrada como medicamento y poder comercializarlo como producto innovador, redundando en el costo del mismo, el cual es alto e inaccesible para una gran parte de la población. Es por ello que surge en el mundo, el concepto de los medicamentos genéricos intercambiables que, en términos generales son medicamentos conteniendo el mismo principio activo que el innovador pero que al no pasar por el largo proceso de investigación, hace que el costo sea más accesible para el público.

Considerando que existen diferencias entre fabricantes en el proceso de fabricación así como en las materias primas utilizadas, ello puede dar lugar a que aun cuando contengan mismo principio activo, puedan existir diferencias en la absorción del fármaco en el organismo, es por eso que, en el año de 1998 se publica en México la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998¹, que establece las

pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, además de los requisitos a que deben estar sujetos los terceros que realicen estas pruebas.

El Dextropropoxifeno es un fármaco analgésico y antipirético, que se encuentra en el cuadro básico de medicamentos del Sector Salud así como en el Catálogo de medicamentos genéricos intercambiables ². A pesar de que en países desarrollados (como Estados Unidos y la mayor parte de los países de Europa) el empleo del Dextropropoxifeno es muy bajo, debido a los efectos secundarios que presenta, particularmente en el uso crónico del mismo, en México se sigue empleando ampliamente debido a su eficacia como analgésico

Considerando el interés de llevar a cabo un estudio de bioequivalencia de productos conteniendo este fármaco, se llevó a cabo el siguiente trabajo, cuyo objetivo fue el siguiente

OBJETIVO

Desarrollar y validar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar Dextropropoxifeno en plasma para su aplicación en estudios de bioequivalencia de acuerdo a la NOM-177-SSA-1998 ¹

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES

2.1 BIOFARMACIA

La biofarmacia es el estudio de la relación entre las propiedades físicas y químicas de un principio activo, de las de su forma de dosificación y de la respuesta biológica observada después de su administración al ser humano o a animales. La meta de los estudios biofarmacéuticos es utilizar esta información para optimizar la respuesta biológica a los medicamentos.

Este concepto implica que los estudios biofarmacéuticos pueden aplicarse en dos aspectos generales: A Diseño de fármacos y B Diseño de medicamentos .

A Diseño de fármacos.

- Para determinar la eficiencia de absorción o fracción biodisponible, por distintas vías de administración
- Para establecer cuál es la mejor vía de administración
- Para determinar la influencia de la formulación y el proceso de fabricación ³
- Para completar los estudios de moléculas con potencial farmacológico, en aspectos tales como la evaluación de su absorción intrínseca, su biotransformación, su solubilidad , la posible vía o vías de administración, etcétera ⁴.

B Diseño de medicamentos

- a) Interacción fármaco – excipientes. Para estudiar “Las acciones mutuas entre

la formulación (tipo y cantidad de excipientes) y la tecnología de fabricación, que determinan las características de un medicamento terminado”. Es decir, la influencia de la formulación y el proceso de fabricación del medicamento , sobre el proceso de liberación – disolución – absorción del principio activo que contiene. Dentro del área de la biofarmacia, uno de los tópicos importantes es la Disolución, los estudios de disolución permiten evaluar la liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica

- 1) Disolución in vitro. Los estudios de disolución in vitro, son importantes ya que permiten establecer el perfil de disolución del fármaco puro (disolución intrínseca), así como del fármaco ya integrado a la forma farmacéutica. El perfil de disolución es la cuantificación del fármaco disuelto en función del tiempo. Cuando la solubilidad de un principio activo en agua es baja (menos de 5 mg/mL), la adecuada formulación o elección de excipientes, puede favorecer la humectación y disolución del principio activo. De este modo se puede minimizar el hecho de que la disolución del fármaco sea el paso limitante del proceso cinético liberación – disolución – absorción. Desde un punto de vista mas práctico, las farmacopeas establecen como requerimiento de calidad (físicoquímico), la llamada prueba de disolución para formas farmacéuticas sólidas como comprimidos, grageas, cápsulas; incluyendo preparaciones de liberación controlada. Los objetivos básicos de las pruebas de disolución farmacopéicas son:

- I) Comprobar que el principio activo se libere y disuelva a partir de las formas farmacéuticas sólidas, ya que estas por si mismas, son las que presentan las mayores dificultades de humectación y disolución de su principio activo.
 - II) Establecer la repetibilidad de las especificaciones de disolución, para cada lote de producción. A nivel de investigación, no solo las formas farmacéuticas sólidas pueden someterse a esta prueba.
 - III) En ciertos casos, los estudios de perfil de disolución de fármacos se emplean para la búsqueda de correlación entre los parámetros de disolución in vitro con parámetros in vivo, lo cual ayudaría a pronosticar cómo los cambios de formulación o de proceso de fabricación del medicamento, pudieran afectar la biodisponibilidad del principio activo
- b) Medicamento y medio biológico. “Las acciones entre el medicamento y el medio biológico del lugar de administración, que determinan los cambios del principio activo”. Por ejemplo, la relación entre la vía de administración y la biotransformación del principio activo, antes de que este llegue a la circulación general, es decir, el efecto del principio activo ya comentado en el inciso de la fase biofarmacéutica y efecto terapéutico.
- c) Interacción fármaco – organismo. “Las acciones entre el principio activo y el organismo, que determinan la biodisponibilidad”. Este factor puede considerarse como la suma de los dos anteriores.

Se debe puntualizar que “la investigación biofarmacéutica no estudia a priori, las propiedades farmacológicas intrínsecas del principio activo ni los aspectos clínicos de la terapéutica medicamentosa”

Por último, se puede decir que el objetivo final de la elaboración de un medicamento, es que cumpla con la Calidad Biofarmacéutica, es decir, que sea un producto seguro, eficaz y que presente la biodisponibilidad adecuada para lograr un óptimo efecto terapéutico, bajo algunas circunstancias dadas.

2.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA

En el siglo VI a.C., Theophrastus observó que la calidad de las sustancias de origen vegetal, empleadas con fines medicinales estaba relacionada con el origen geográfico, variedad, edad y parte de la planta utilizada como remedio. No obstante, a principios del siglo XIX, el concepto de calidad de un medicamento se limitaba a la identificación fisicoquímica de algunas sustancias. En 1938, a raíz de la muerte de varias personas debido al empleo de dietilenglicol como disolvente para un elixir de sulfanilamida, se generó en EUA la primera legislación específica sobre seguridad de medicamentos. Años después, otro grave problema, derivado del uso de la talidomida, obligó a la revisión y establecimiento de una nueva legislación respecto a la seguridad y eficacia de los medicamentos .

En 1950, Sokolow y Edgar escribían: “En años recientes se ha insistido en la conveniencia de realizar estudios cuantitativos de la concentración hemática en relación con la dosis y con el efecto terapéutico de un medicamento. Ensayos realizados con penicilina, sulfonamidas y salicilatos, han demostrado que mediante

estos estudios se llega a una terapéutica mas racional". Así, la efectividad de la farmacoterapia, está en función de diversos factores, entre los que destacan:

- A. La relación entre datos cuantitativos de concentración o de cantidad de fármaco en el organismo (y/o sus metabolitos activos), y la intensidad y duración del efecto o respuesta farmacológica
- B. La cantidad de fármaco en sangre está regida en gran parte, por el régimen de dosificación aplicado; es decir, la magnitud de la dosis, número de ellas y los intervalos para su administración, cuando el fármaco se administra por vía intravascular
- C. La fracción biodisponible, si el fármaco está contenido en un medicamento cuya vía de administración es extravascular, es decir, que requiere un proceso de absorción del principio activo hacia el sistema circulatorio

Actualmente, se han establecido cuatro criterios de calidad que debe cumplir todo medicamento: identificación del principio activo, cuantificación del mismo, pureza de los componentes, seguridad y eficacia del medicamento; todo lo anterior garantizado durante el periodo útil o fecha de caducidad de los mismos. Debido a esto y al gran avance en las disciplinas farmacéuticas aplicadas para el óptimo cuidado de la salud, el objetivo es que todo medicamento, durante su periodo útil, conserve su calidad biofarmacéutica, es decir, que sea un medicamento seguro, eficaz y con biodisponibilidad adecuada u óptima, de acuerdo con su actividad farmacológica. La biodisponibilidad se define como la velocidad y la cantidad con la que el fármaco llega a la circulación y queda a disposición de su sitio de acción, a

partir del medicamento en que fue administrado, para aquellos medicamentos que no pretenden ingresar a circulación, la biodisponibilidad se puede entender como la cantidad y velocidad con la que un fármaco se es liberado del medicamento y queda a disposición de sus sitio de acción ¹².

Cuando este concepto se aplica a la concepción y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos, permite una rigurosa selección de la forma farmacéutica y vía de administración, para resolver del mejor modo los problemas terapéuticos, es decir optimizar la farmacoterapia ⁴.

En general se acepta que “la respuesta de los pacientes a un medicamento puede ser variable. Esta variabilidad depende de factores tales como la gravedad de la enfermedad y de la rapidez con que se metaboliza y excreta el medicamento, así como de otros factores farmacocinéticos. Sin embargo, una fuente importante y a menudo inadvertida de variación es la biodisponibilidad del fármaco en la forma medicamentosa usada, es decir, la rapidez y la magnitud de su absorción”

“Toda variabilidad inadvertida de la absorción del medicamento (fármaco), puede tener graves consecuencias clínicas. Las diferencias de absorción de los ingredientes medicinales de los productos farmacéuticos procedentes de fuentes o lotes de producción diferentes o preparados en distintas formas medicamentosas también pueden dar lugar a que el paciente reciba una medicación excesiva o insuficiente. Existen también factores de formulación que afectan la biodisponibilidad de un medicamento y es esto el campo de estudio de la *Bioequivalencia* ⁴. El término *Bioequivalente* puede ser aplicado a aquellos equivalentes químicos o farmacéuticos (medicamentos genéricos), en los cuales no

se observa diferencia significativa en la velocidad y cantidad absorbida del fármaco, cuando son administrados ya sea en dosis única o dosis múltiple bajo condiciones similares 3.

2.1.2 RELACION ENTRE CONCENTRACIONES SANGUINEAS DE FÁRMACO Y LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA

Se ha demostrado con estudios in vitro, en animales y en humanos tanto sanos como enfermos, que existe una relación evidente aunque compleja, entre la cantidad de fármaco en el organismo y la respuesta farmacológica obtenida. En general, la mayor correlación respecto a una respuesta terapéutica o tóxica en una población de pacientes, es la observada entre estos efectos y la concentración plasmática del fármaco libre, ya que solo esta fracción es susceptible de ser transportada a otros tejidos, entre ellos el sitio de acción o biofase. Este tipo de correlación elimina la variación entre los datos debida a las diferencias interindividuales de los procesos de absorción y eliminación del fármaco 4.

2.1.3 NIVELES PLASMÁTICOS DEL FÁRMACO, BIODISPONIBILIDAD

En general, se acepta que existe una relación entre los niveles plasmáticos de fármaco y la intensidad y duración de la respuesta farmacológica observada como resultado de su administración a un organismo. Una relación directa de lo anterior, se basa en dos supuestos o principios, los cuales en conjunto dan validez a los estudios de biodisponibilidad que se ajustan a una farmacocinética lineal:

- A. La concentración plasmática del fármaco esta directamente relacionada con la concentración en cualquier parte del organismo. Esto se logra a través de

un equilibrio dinámico reversible, por medio de un proceso de difusión del fármaco, entre sangre y tejidos.

- B. La intensidad de la acción farmacológica está relacionada directamente a la concentración del fármaco en la biofase.

En condiciones fisiológicas normales, el primer supuesto se cumple a través del equilibrio dinámico establecido por la difusión reversible del fármaco entre sangre y tejidos, aún para principios activos que se fijan ampliamente a tejidos y poco a proteínas plasmáticas. El segundo supuesto es cierto solo para los fármacos que actúan reversiblemente, es decir, para aquellos cuya acción dura mientras prevalece su presencia en el punto receptor, que es el caso de la gran mayoría de los principios activos ⁴.

2.1.4 ASPECTOS GENERALES DE LOS ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

El objetivo de los estudios biofarmacéuticos es optimizar la farmacoterapia, a modo de proporcionar el máximo beneficio y los menores efectos adversos. De lo anterior, se derivan los conceptos de biodisponibilidad y de bioequivalencia de los medicamentos. La actividad terapéutica observada en un organismo después de administrar un medicamento, es el resultado de una serie de etapas consecutivas, las cuales están en función de las propiedades tanto del fármaco como de las del medicamento y también de las características fisiopatológicas del organismo que las recibe

Estas etapas son:

- Biofarmacéutica

- Farmacocinética
- Farmacodinámica

Las fases farmacodinámica y farmacocinética están en función básicamente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del estado fisiopatológico del organismo; el único factor externo que incide en estas etapas, es el régimen de dosificación. La etapa farmacocinética se caracteriza por los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción del fármaco.

La liberación, absorción y llegada del fármaco a la circulación sistémica a partir del medicamento en que fue administrado, es de suma importancia ya que en general, el inicio, intensidad y duración del efecto terapéutico, está en función de la concentración plasmática del fármaco activo ⁴ .

2.1.5 DETERMINACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD DE FÁRMACOS NUEVOS

Los estudios de biodisponibilidad de fármacos nuevos tienen como objetivos generales:

- Para el fármaco puro, determinar cuál es la mejor vía de administración, es decir, aquella que permita obtener una adecuada biodisponibilidad. Un fármaco que administrado por vía oral está sujeto a un alto efecto del primer paso, o presenta inestabilidad fisicoquímica por pH o por biotransformación en el medio intestinal antes de alcanzar la circulación sistémica, no deberá ser formulado como un medicamento para administración oral.

- Para determinar la influencia de diversas formulaciones y procesos de fabricación del medicamento, sobre la biodisponibilidad del principio activo que contienen. Desde luego, los estudios de biodisponibilidad en los casos de entidades químicas nuevas, son totalmente independientes y no deben sustituir a los estudios clínicos sobre seguridad y eficacia del producto 4.

2.1.6 DETERMINACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD COMPARATIVA ENTRE MEDICAMENTOS GENÉRICOS (BIOEQUIVALENCIA)

Cuando se realizan estudios comparativos de biodisponibilidad entre productos genéricos, se trata de determinar que dos o más formulaciones son similares, es decir, se comportan como bioequivalentes y por tanto se asume que dichos productos pueden ser intercambiados durante el tratamiento fármaco terapéutico en un paciente, con una razonable seguridad de que los medicamentos por si mismos, no serán una fuente externa adicional de variabilidad en los resultados de la farmacoterapia 4.

2.1.7 APROBACION DE GENÉRICOS

Como se mencionó en la introducción, a diferencia de los estudios necesarios para introducir un nuevo fármaco al mercado, los medicamentos genéricos no requieren realizar estudios preclínicos y clínicos (Fase I y II) que establezcan su eficacia y seguridad, ya que estas han sido previamente establecidas y documentadas durante el proceso de aprobación del medicamento innovador. Debido a que los productos genéricos deben ser farmacéuticamente equivalentes y bioequivalentes al producto innovador, se

espera que ambos productos sean también terapéuticamente equivalentes. En otras palabras, se asume que si un fármaco ha demostrado ser eficaz y seguro después de su ingreso a la circulación, cualquier producto que alcance las mismas concentraciones del principio activo en el mismo tiempo que el fármaco en comparación, producirá el mismo efecto. Es por eso que los estudios preclínicos y clínicos (Fase I y II) no son necesarios. La FDA menciona que son productos terapéuticamente equivalentes si:

- Muestran ser seguros y efectivos
- Son bioequivalentes y no existe algún problema conocido o algún problema potencialmente en la bioequivalencia.
- Tienen un potencial similar de seguridad y eficacia
- Son apropiadamente etiquetados
- Son fabricados siguiendo los lineamientos de BPM's.

El término "terapéuticamente equivalente" se refiere solo a medicamentos farmacéuticamente equivalentes, no a diferentes agentes terapéuticos usados para tratar una misma condición ".

2.2 VALIDACION

El término validación se define como la evidencia documentada de que un método sirve para lo que este fue diseñado. En el caso de esta Tesis, la validación se refiere a la evidencia documentada de que el método propuesto sirve para cuantificar Dextropropoxifeno en plasma.

2.3 PRINCIPIOS Y ESTABLECIMIENTOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

- Los parámetros fundamentales para asegurar el desempeño de un método analítico son: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad
- Se deben documentar de manera específica y detallada los resultados de la validación a modo de protocolo, plan de estudio, reporte y / o PNO
- En medida de lo posible, la matriz biológica que se utilice en la validación debe ser la misma que aquella en la que se vaya a cuantificar el analito estudiado
- La estabilidad del analito en la matriz biológica desde su obtención hasta el tiempo de resguardo debe ser establecida preferentemente antes de realizar el estudio.
- La exactitud, precisión, reproducibilidad, respuesta y selectividad del método, deben ser realizados con el analito en la matriz biológica en que se vaya a hacer el estudio. Se debe tener evidencia de que la respuesta corresponde al analito estudiado
- Para definir la relación respuesta – concentración se debe tener un número suficiente de puntos. La relación respuesta – concentración debe demostrar ser continua y reproducible en el rango elegido. En el caso de una relación no lineal el número de puntos debe ser mayor
- Se debe validar con los parámetros de precisión y exactitud la dilución de un valor de concentración por encima del rango de trabajo ⁵

CAPITULO 3

MONOGRAFÍA DEL DEXTROPROPOXIFENO

DEXTROPROPOXIFENO

Estructura molecular del Propoxifeno

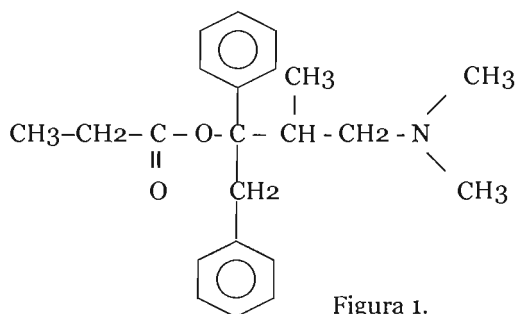


Figura 1.

Formula molecular: C₂₂H₂₉NO₂

Masa molecular: 339.5 g/mol

Solubilidad: Soluble en agua, alcohol, cloroformo.

Durante este estudio se trabajó con clorhidrato de Dextropropoxifeno:

Fórmula molecular: C₂₂H₂₉NO₂ · HCl

Masa molecular: 375.9 g/mol

Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo

Solubilidad: Muy soluble en agua y cloroformo; fácilmente soluble en alcohol.

Durante el proceso de síntesis se obtienen cuatro estereoisómeros, de los cuales solo la mezcla α-racémico tiene una actividad terapéutica: el Dextropropoxifeno

tiene actividad analgésica, mientras que la forma levógira presenta actividad antitusiva.

Frecuentemente se encuentra asociado a los analgésicos antipiréticos y otros anti-inflamatorios como el ácido acetil salicílico o el paracetamol, con los cuales presenta sinergia, pero el interés de estas asociaciones es controversial ⁶.

En Francia, la posología usual del clorhidrato de dextropropoxifeno es de 74 a 325 mg/día, en 3 a 4 administraciones según la intensidad del dolor ⁷.

El isómero D del propoxifeno ha demostrado tener una actividad analgésica. Para lograr ejercer esta acción farmacológica, el dextropropoxifeno se une a los receptores μ de los opioides produciendo analgesia en el SNC. Este fármaco es un excelente analgésico. La administración de entre 90 a 120 mg de propoxifeno iguala los efectos analgésicos de alrededor de 600 mg de ácido acetil salicílico ⁸.

Absorción, biotransformación y excreción

Después de una administración oral, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en un periodo de 1 a 2 horas. La concentración máxima reportada se encuentra alrededor de los 250 ng/mL. El fármaco se distribuye rápidamente, alcanzando concentraciones altas en hígado, pulmón y cerebro. El fármaco se une en un 80% a proteínas plasmáticas. Existe una gran variabilidad interindividual en la depuración y por ende en las concentraciones plasmáticas. La vida media promedio del Propoxifeno en el plasma después de una sola dosis varía entre 6 y 12 horas. La principal vía metabólica es la N-desmetilación, lo cual da

lugar al norpropoxifeno. La vida media del norpropoxifeno es de cerca de 30 horas y su acumulación con dosis repetidas resulta tóxico en el ser humano ⁸.

Toxicidad

Por vía oral, el propoxifeno tiene una potencia aproximada de alrededor del 33% respecto a la codeína para deprimir la respiración. Las dosis moderadamente tóxicas suelen causar depresiones del SNC y respiratorio, pero con dosis aún mayores se pueden presentar convulsiones. Se han observado también delirios, alucinaciones, confusión y edema pulmonar. Los efectos que deprimen la respiración se intensifican en grado importante cuando se ingiere de manera concurrente etanol o sedantes hipnóticos. La naloxona antagoniza los efectos convulsivos y depresivos de la respiración por el propoxifeno ⁸.

Tolerancia y dependencia

La interrupción repentina del clorhidrato de propoxifeno administrado de manera crónica (hasta 800 mg/día durante casi dos meses) da por resultado síntomas leves de supresión, y las dosis orales altas (300 a 600 mg) producen efectos subjetivos que resultan placenteros para quienes fueron adictos. El fármaco es bastante irritante en administración intravenosa o subcutánea, de modo que el abuso por estas vías produce lesión grave de venas y tejidos blandos ⁸.

Uso

El Dextropropoxifeno se recomienda para tratar el dolor moderado. Se sugiere la administración del Dextropropoxifeno en dosis de 65 mg como

clorhidrato o 100 mg como napsilato. De manera más común, el Dextropropoxifeno es dado en combinación con aspirina o acetaminofen. El gran éxito del Dextropropoxifeno se ha dado debido a su eficacia para administrarse una vez que previamente se ha administrado codeína ⁸.

Contraindicaciones

Contraindicado en pacientes con antecedentes de adicción, tendencias suicidas, ingestión reciente de inhibidores de la MAO, en quienes estén tomando otros depresores del SNC y en situaciones que cursan con aumento de la presión intracraneal. También esta contraindicado en pacientes con antecedentes de cuadros convulsivos y durante el embarazo. La ingestión de dosis altas de Dextropropoxifeno, en combinación con otros depresores, incluido el alcohol, es una de las causas de muerte más frecuente por intoxicación medicamentosa. No se recomienda su empleo en niños. Interactúa con otros depresores del SNC aumentando sus efectos (alcohol, benzodiazepinas, neurolépticos, antihistamínicos, otros opioides agonistas). Aumenta el efecto hipotensor de los antihipertensivos. El Dextropropoxifeno aumenta el efecto de los anticoagulantes orales y sus efectos depresores sobre el centro respiratorio se ven incrementados por los bloqueadores neuromusculares. Por el riesgo de dependencia, no se recomienda su uso por más de seis semanas, los antagonistas de los opioides, como naloxona, revierten sus efectos y producen un síndrome de abstinencia en pacientes que ingieren repetidamente Dextropropoxifeno ⁹.

Reacciones Adversas

Frecuentes: Náusea, vómito, somnolencia y vértigo

Poco frecuentes: Intranquilidad, euforia, pesadillas, debilidad, cefaléa, visión borrosa o doble, estreñimiento, disminución de la cantidad de orina o dificultad para la micción, aumento de la sudoración, boca seca, manifestaciones de depresión respiratoria, convulsiones, reacciones alérgicas ⁹.

Advertencias para el paciente

No ingerir alcohol durante el tratamiento con Dextropropoxifeno, ya que su administración simultánea produce depresión profunda del SNC y riesgo de paro respiratorio. Tampoco deben ingerirse otros depresores del SNC. Produce tolerancia y dependencia ⁹.

Dosis

Dosis oral de 65 mg cada 4 a 6 horas. La dosis máxima en 24 horas debe ser inferior a 390 mg ⁹.

Han sido documentados muchos casos que muestran al Dextropropoxifeno como un medicamento peligroso. La eficacia de este medicamento es grande, sin embargo uno de sus mayores peligros consiste en el síndrome de abstinencia que este produce al grado de llevar a la muerte. En caso de ser necesario ingerir este fármaco, se recomienda disminuir lentamente la ingesta diaria ¹⁸.

En la actualidad en se encuentran en diferentes medicamentos, como se ejemplifica en la siguiente tabla:

Tabla 1. Medicamentos conteniendo Dextropropoxifeno ¹⁰

Nombre Comercial	Laboratorio	Fármaco (s)	Dosis
Darvon Simple	ELI LILLY Y CIA DE MEXICO	Napsilato de Dextropropoxifeno	65 mg
Darvon Compuesto	ELI LILLY Y CIA DE MEXICO	Clorhidrato de Dextropropoxifeno Ácido acetil salicílico Cafeína	33 mg 389 mg 32.4 mg
Neopercodan	RHÔNE - POULENC RORER	Clorhidrato de Dextropropoxifeno Paracetamol	65 mg 500 mg
Pryndal C	PROD. FARM. COLLINS	Dextropropoxifeno	65 mg
Qual	LAB. SILANES	Clorhidrato de Dextropropoxifeno Diazepam Paracetamol	50 mg 2 mg 200 mg

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DEXTROPROXIFENO EN PLASMA.

A la fecha existe poca información en la literatura acerca de métodos para la cuantificación de este fármaco en fluidos biológicos.

Kunka, R. Yong, Ch. Ladik, c. and Bates, t. ¹³ desarrollaron un método que utiliza 1 mL de plasma, una extracción en cloroformo, detección a 205 nm y una columna

μ Bondpak C₁₈ en fase reversa. El método fue lineal y preciso en el rango de 40 a 480 ng / mL, con un coeficiente de variación de no mayor que 8.9 %.

Rop, P. Grimaldi, F. Bresson, M. Fornaris, M and Viala, A. ¹⁴ utilizaron 2 ml de sangre total, extracción en una mezcla de dietil-eter : clorometano (70 : 30, v/v), detección a 215 nm y una columna μ Bondpak C₁₈ fase reversa. Este método fue lineal y preciso en el rango de 50 a 1000 ng / mL, con un coeficiente de variación menor que 10.5 %.

Verebely, K. Inturrisi and Ch E. ¹⁵ Presentan un método desarrollado para cromatografía de gases-líquidos utilizando 4 ml de plasma, llevando a cabo una doble extracción, la primera con cloro butano y la segunda con cloroformo, previa alcalinización con hidróxido de sodio. Se utilizó una columna de 6 ft de espiral de vidrio. Este método fue lineal y preciso en el rango de .2 a 2 μ g / mL.

Margot, P. Crouch, D. Finkle, B. Johnson, J. and Deyman, M. ¹⁶ presentan una metodología utilizando 1 mL de plasma, una extracción con cloro butano previa alcalinización. Este método fue lineal y preciso en el rango de 10 a 25 ng / mL con un coeficiente de variación de 9 %.

La mayoría de los métodos documentados mencionan una cuantificación a partir de plasma (como para casi todos los fármacos), sin embargo es posible cuantificar el Dextropropoxifeno también en orina y hasta en el cabello ¹⁷.

CAPITULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para seleccionar la metodología que permitiera cuantificar el Dextropropoxifeno en plasma, se consultaron los artículos antes mencionados. Los artículos proporcionaron información que sirvió en un principio como base, sin embargo, al encontrar algunos resultados insatisfactorios se fueron proponiendo ideas de modo que se desarrolló un método diferente a los reportados en los artículos.

Se estableció una velocidad de flujo de 1 mL/min., leyendo a una longitud de onda de 198 nm. Se encontró una señal bien definida sin embargo muy pequeña. Revisando artículos de determinación Dextropropoxifeno se encontró que el material que usaban era silanizado. Se propuso que la señal estaba saliendo baja debido a que el fármaco se estaba quedando adherido a las paredes de los tubos. Al no contar con material silanizado, se optó por hacer un lavado especial en el material de trabajo. Se colocaron los tubos, pipetas Pasteur y todo aquel material que estaría en contacto con nuestro fármaco en una bandeja con solución de ácido nítrico al 10% con el fin de limpiar de residuos o cualquier tipo de contaminante presente en el material. Se propuso que el fármaco estaba quedándose adherido a las paredes del tubo debido a grupos fosfato como resultados del lavado cotidiano del material o a algún otro tipo de contaminación presente en las paredes del tubo sobre todo del tipo inorgánico.

Después de lavar con ácido nítrico los tubos se enjuagaban con abundante agua corriente y después con agua destilada.

Con el fin de eliminar residuos grasos, contaminación de tipo orgánico y al mismo tiempo secar bien el material previamente lavado con ácido nítrico, estos fueron enjuagados con etanol al 96%.

4.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

4.2.1 Materiales:

- Tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 X 100 mm
- Pipetas Pasteur
- Bulbos para pipetas Pasteur
- Micro pipetas marca Brand
- Repipeteador marca Brand
- Vasos de precipitados de 100 y 250 mL marca Kimax
- Matraces volumétricos de 10, 100 y 1000 mL marca Kimax
- Probetas de 50 y 100 mL marca Kimax
- Tubos de ensayo de 13 X 100
- Microviales de 200 μ L Waters
- Viales de 1 mL para equipo Waters
- Tapones de plástico para viales de 1 mL Waters
- Sistema de filtración millipore

- Membranas para filtración Millipore de 0.45 μm tipo HA y diámetro de 45 mm.
- Columna X-Terra MS C18 de 5 μm . 4.6 X 150 mm, número de parte: 186000490.
- Precolumna Phenomenex
- Cartucho para precolumna Phenomenex C18 de 4 x 3.

4.2.2 Equipos e instrumentos

- Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix III M37615
- Micropipetas Brand Transferpette var (0.5-10 μL , 5-50 μL , 10-100 μL , 25-250 μL , 100-1000 μL)
- Balanza analítica: Explorer E12140, E - 12140
- Baño de ultrasonido Fisher Scientific F530, FS30
- Centrífuga Refrigerada Hettich 22k, MIKRO 22R
- Sistema de filtración Millipore 0.45 μm
- Repipeteador Brand, Handy Step
- Bomba de vacío SIEMENS
- Placa de calentamiento – agitación corning PC-351
- Potenciómetro SCHOTT, CG 841

4.2.3 Cromatógrafo de líquidos Waters Breeze

- Detector UV-V 310 No. de serie F02487293M

- Bomba binaria 1525 No. de serie K0225P600M
- Automuestreador 717P No. de serie H0271P438M
- Detector Fluorescencia 2475 No. de serie A034755185M

4.2.4 Reactivos

- Acetonitrilo HPLC marca Tecsiquim
- Agua HPLC marca Tecsiquim
- Agua destilada
- Etanol al 96% RA marca Tecsiquim
- Fosfato de potasio monobásico RA. marca Tecsiquim
- Hidróxido de sodio RA marca Tecsiquim
- Éter etílico anhidro RA marca Tecsiquim
- Ácido fosfórico RA marca Tecsiquim
- Metanol HPLC marca marca Tecsiquim
- Ácido nítrico RA marca Tecsiquim
- Matriz biológica (plasma humano)

4.1.5 Sustancia de referencia

- Clorhidrato de Dextropropoxifeno
 - Pureza: 100.01% BS
 - Lote: 1R00034
 - Procedencia: Laboratorios Diba

4.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES REACTIVO

- Solución reconstituyente ACN: H₂O (30:70 v/v)

Medir con una probeta graduada de 100 mL, 70 mL de agua grado HPLC y vaciar el contenido en un frasco de 100 mL. Con la misma probeta de 100 mL medir 30 mL de ACN grado HPLC previamente filtrado y agregarlo al mismo frasco donde se colocó el agua. Agitar

- Solución de Hidróxido de Sodio 1 N

Pesar 4 g de NaOH y disolver en un volumen no mayor a 50 mL de agua HPLC. En un matraz aforado de 100 mL, colocar aproximadamente 30 ml de agua HPLC, posteriormente añadir la solución de hidróxido de sodio. Enfriar el matraz en baño de agua fría y llevar a volumen con agua HPLC.

- Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) al 0.5% y pH=3

Pesar 5.0 g de KH₂PO₄ R.A. y transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL. Agregar aproximadamente 450 mL de agua HPLC y agitar hasta disolver la sal. Llevar el matraz al aforo con agua HPLC. Ajustar pH a 3 con H₂SO₄ concentrado.

- FASE MOVIL

La fase móvil consistió en una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos 0.5% pH=3 : ACN (62 : 38 v/v)

- Solución de ácido nítrico al 10%

Depositar en un recipiente de plástico alrededor de 400 mL de agua destilada, adicionar 250 mL de ácido nítrico, adicionar 350 mL de agua destilada y mezclar.

4.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, CURVAS PATRON Y PUNTOS CONTROL

Preparación de solución patrón de dextropropoxifeno 50 µg/mL:

- Pesar con exactitud 0.0111 g del patrón de referencia (Clorhidrato de Dextropropoxifeno), equivalentes a 0.0100 g de Dextropropoxifeno.
- Transferir a un matraz volumétrico de 10 mL
- Disolver y llevar al aforo con metanol. Agitar
Esta solución contiene 1000 µg/mL.
- Transferir 500 µL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL.
- Llevar al aforo con solución reconstituyente y agitar.

Solución de Adecuabilidad

Transferir una alícuota de 200 µL de la solución patrón de Dextropropoxifeno de 50 µg/mL a un matraz de 10 mL y llevar al aforo con solución reconstituyente. Esta solución contiene 1000 ng/mL de Dextropropoxifeno

Solución Reconstituyente

Medir con una probeta graduada de 100 mL, 70 mL de agua grado HPLC y vaciar el contenido en un frasco con rosca de 100 mL. Con la misma probeta de 100 mL medir 30 mL de ACN grado HPLC previamente filtrado y agregarlo al mismo frasco donde se colocó el agua. Agitar

Preparación de la curva de calibración en solución

A partir de la solución de adecuabilidad preparar los puntos de la curva de calibración como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. CURVA DE CALIBRACIÓN EN SOLUCION

Alícuota (μL) de solución de adecuabilidad (1000 ng/mL) de Dextropropoxifeno	Alícuota (μL) de solución reconstituyente	Concentración de Dextropropoxifeno (ng/mL)
50	950	50
125	875	125
250	750	250
375	625	375
500	500	500
1000	0	1000

Preparación de la curva de calibración en plasma

Transferir una alícuota de 100 μL de la solución patrón de Dextropropoxifeno de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con plasma. Esta solución tiene una concentración de 500 ng/mL de Dextropropoxifeno. A partir de esta solución se preparan los puntos de la curva como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN DE DEXTROPROPOXIFENO EN PLASMA

Alícuota (μL) de solución patrón (500 ng/mL) de Dextropropoxifeno	Alícuota de plasma (μL)	Concentración de Dextropropoxifeno (ng/mL)
50	950	25
125	875	62.5
250	750	125
375	625	187.5
500	500	250
1000	0	500

Preparación de los puntos control en plasma

A partir de la solución patrón de 500 ng / mL, se preparan los puntos de control como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4. PUNTOS CONTROL DE DEXTROPROPOXIFENO EN PLASMA

Alicuota de solución de patrón de Dextropropoxifeno (μL)	Alicuota de plasma (μL)	Concentración de Dextropropoxifeno (ng/mL)
75	925	37.5
400	600	200
950	50	475

Nota: Como se explica mas adelante en el método de extracción, la muestra plasmática se evapora y se reconstituye con 150 μL de solución reconstituyente, de modo que la, muestra se concentra al doble. Es por eso que las concentraciones en la curva de calibración se encuentran al doble que las curvas en plasma.

4.5 METODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DEXTROPROPOXIFENO EN PLASMA

4.5.1 METODO DE EXTRACCIÓN

- Se toman 300 μL de la muestra en plasma y se colocan en un tubo de vidrio de 16 x 100 mm con tapón de rosca, previamente lavado con el método mencionado al final de este numeral.

- Se adicionan 100 μL de NaOH 1M a cada tubo y se agita durante 30 s en vortex.
- Se adicionan 3 mL de éter dietílico, se tapan los tubos y se agitan durante 2 minutos utilizando un Vortex.
- Se centrifugan por 5 minutos a 4020 g y a -10°C .
- Se colocan en el ultracongelador (-70°C) durante 15 minutos.
- Se decanta la fase orgánica, la cual se deposita en tubos limpios y se evapora en baño maría.
- Se reconstituyen con 150 μL de solución reconstituyente (Agua: Acetonitrilo 70 : 30) y se agitan en Vortex durante 1 minuto.
- La muestra se transfiere a microviales de 200 μL y se inyecta un volumen de 100 μL en el cromatógrafo.

NOTA (LAVADO DE MATERIAL) :

Tanto los tubos, matraces, puntas, pipetas Pasteur, microviales y todo aquel material que fuera a estar en contacto con la muestra fue previamente lavado dejándolo un tiempo no menor a 12 horas en HNO_3 al 10 %, lavado con abundante agua corriente y posteriormente agua destilada, para finalmente ser enjuagado con alcohol etílico (96%) .

4.5.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.5%,
pH=3 : Acetonitrilo (62 : 38 % v/v)

- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Atenuación: 0.5 AUFS
- Longitud de onda: 198 nm
- Temperatura : Ambiente
- Columna: Columna Xterra C18 MS. Tamaño de partícula 5 μm
4.6 x 150mm Watters, número de parte: 186000490.
- Precolumna: Phenomenex C18
- Volumen de inyección: 100 μL
- Tiempo de corrida: 9 minutos

CAPITULO 5

VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para evaluar la confiabilidad del método se siguieron los lineamientos que marca la NOM 177 ¹ que se describen a continuación:

5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se prepararon 3 curvas en solución, en el rango de concentración de 50 a 1000 ng/mL. A partir de los resultados de área se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación. ¹.

5.2 LINEALIDAD DEL METODO

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon 3 curvas de calibración en plasma así como un blanco de plasma. Las muestras se procesaron de acuerdo al método propuesto y se inyectaron al cromatógrafo. Para cada curva de calibración se determinó el área, se determinó el modelo matemático a utilizar para establecer la relación concentración – respuesta, y se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

5.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

5.3.1 Repetibilidad del método

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Para determinar la repetibilidad del método, se prepararon por quintuplicado los puntos control bajo, medio y alto (37.5, 200 y 475 ng/mL) y se determinó la concentración recuperada interpolando el valor de las áreas en una curva de calibración preparada como se indica en la linealidad del método. Con estos datos se calculó el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas¹

5.3.2 Reproducibilidad del método

La reproducibilidad del método se determinó con puntos control preparados por duplicado en 3 días continuos de trabajo por un analista. Se calculó el coeficiente de variación y la desviación absoluta de sus resultados.

El mismo procedimiento lo realizó un segundo analista y se compararon los resultados obtenidos por ambos analistas utilizando el programa Statgraphics Plus ¹⁹.

5.4 Exactitud del método

La exactitud del método se determinó a partir de los datos de repetibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desviación absoluta} = \frac{\text{Conc. Nominal} - \text{Conc. Recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \times 100$$

5.5 Recobro absoluto

Se prepararon 2 curvas de calibración una en plasma y otra en solución. Las muestras plasmáticas se procesaron e inyectaron de acuerdo al método propuesto, en tanto que las muestras en solución se inyectaron directamente al cromatógrafo. El recobro se determinó mediante la relación de las áreas obtenidas en plasma con las obtenidas en solución ¹.

El por ciento de recobro se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ De Recobro} = \frac{\text{Respuesta en plasma} \times 100}{\text{Respuesta en solución}}$$

5.6 LÍMITE DE CUANTIFICACION

El límite de cuantificación se determinó preparando por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración y con los datos obtenidos se calculó la precisión y exactitud ¹.

5.7 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección se estableció como la concentración a la cual la señal del compuesto en la matriz biológica es tres veces mayor que la señal del ruido ¹.

5.8 SELECTIVIDAD

Para evaluar la selectividad del método se prepararon muestras de plasma adicionadas con: paracetamol, naproxeno sódico, cafeína, ácido salicílico, ácido acetil salicílico, EDTA disódico y heparina. Además de que se analizó una muestra blanco de plasma hemolizado. Para que el método cumpla con esta prueba, no deben existir interferencias en el tiempo de retención del Dextropropoxifeno¹

5.9 ESTABILIDAD

Las pruebas de estabilidad se llevaron a cabo para demostrar que el dextropropoxifeno conserva sus propiedades en el plasma durante su manejo, almacenamiento y procesamiento¹.

5.9.1 Estabilidad en ciclos de congelación – descongelación

Para comprobar que la muestra es estable durante el proceso de congelación-descongelación, se prepararon 2 series de puntos control, los cuales se sometieron a dos ciclos de congelación – descongelación. Al final de cada ciclo se determinó la cantidad de Dextropropoxifeno recuperada y la exactitud y precisión de los valores obtenidos calculando el por ciento de desviación absoluta¹

5.9.2 Estabilidad a temperatura ambiente

Para realizar esta prueba se prepararon 2 series de puntos control los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron e inyectaron a las 26 horas de permanecer a esta temperatura¹.

5.9.3 Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon 2 series de puntos control y se procesaron de acuerdo a la técnica descrita. Se mantuvieron en la solución de inyección dentro del automuestreador (Temperatura ambiente) y se inyectaron después de 12 y 24 horas. Para cada uno de los tiempos se calculó la concentración recuperada y se evaluó la exactitud¹.

5.9.4 Estabilidad de la muestra evaporada en congelación

Esta prueba se realizó procesando 2 series de puntos control de acuerdo al método propuesto. Una vez evaporadas las muestras, se colocaron en el ultracongelador (-70 ° C) y se inyectaron en el cromatógrafo al día siguiente. Se determinó la precisión y exactitud¹.

5.9.5 Estabilidad a largo plazo

Para esta prueba se prepararon 2 series de puntos control de dextropropoxifeno en plasma, las cuales se almacenaron a -70C . Las muestras se analizaron a los 16, 30 y 66 días empleando el método descrito en los puntos 3.4.5 y 3.4.2. Los resultados se compararon contra valor nominal. Para cada tiempo se determinó la exactitud y precisión ¹.

5.9.6 TOLERANCIA

Se evaluó la tolerancia del método alterando 2 condiciones. La primera fue la modificación de pH de la fase móvil de 3 a 3.5. La segunda modificación fue el volumen de NaOH adicionado de 100 a 200 μL ¹.

CAPITULO 6

RESULTADOS

Los resultados de la validación fueron los siguientes.

LINEALIDAD DE SISTEMA

Para realizar la cuantificación de dextropropoxifeno se utilizó, como medida de respuesta el valor de área. En la tabla 4 se presentan los resultados de la linealidad y precisión del sistema. Se encontró que el mejor modelo al cual se ajustaban los datos era la relación log concentración –log respuesta, por lo cual todos los cálculos están expresados en esta relación. En la figura 4 se presenta la gráfica correspondiente a la linealidad.

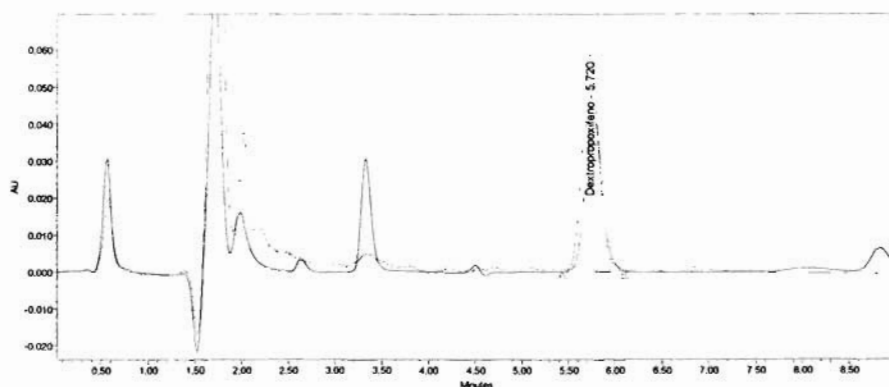


Figura 1. Cromatograma de Dextropropoxifeno en solución y en plasma. Concentración 500ng/mL

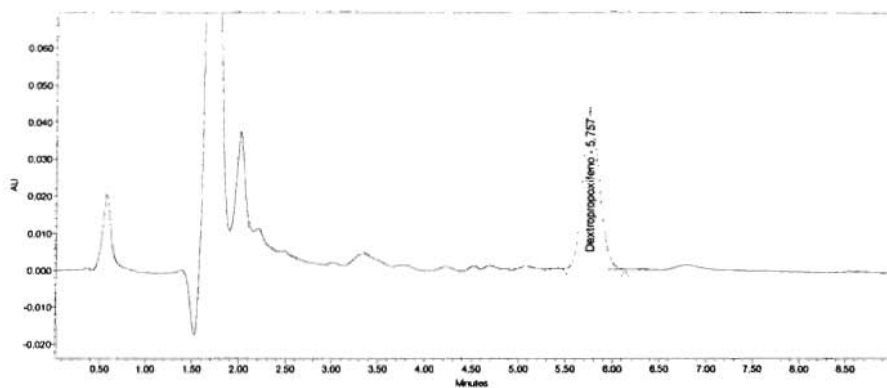


Figura 2. Cromatogramas de Dextropropoxifeno en plasma. Concentración 500ng/mL

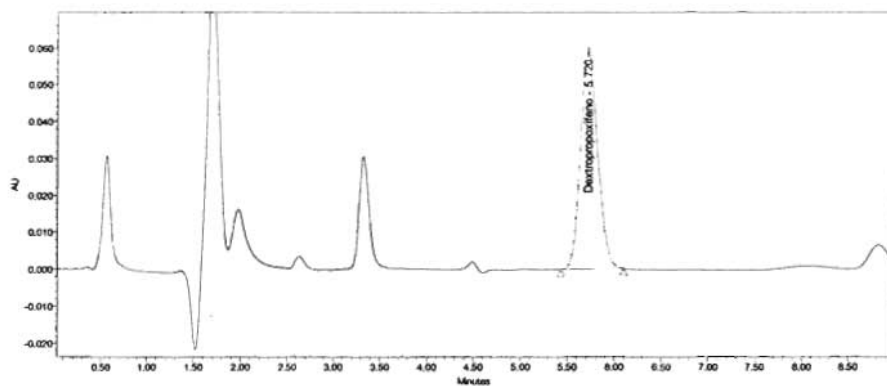


Figura 3. Cromatogramas de Dextropropoxifeno en solución. Concentración 500ng/mL

Tabla 5. Linealidad de sistema para la cuantificación de dextropropoxifeno.

LOGARITMOS							
C. Nominal	Log. Conc.	Log. Curva 1	Log Curva 2	Log Curva 3	Prom	D.S	%CV
50	1.398	4.467	4.477	4.484	4.476	0.009	0.194
125	1.796	4.897	4.900	4.906	4.901	0.005	0.098
250	2.097	5.214	5.214	5.212	5.213	0.001	0.021
375	2.273	5.403	5.404	5.398	5.402	0.003	0.064
500	2.398	5.511	5.509	5.509	5.510	0.001	0.024
1000	2.699	5.805	5.816	5.814	5.812	0.006	0.096
							global
r		0.9995	0.9997	0.9998	0.9997	0.0002	0.9997
m		1.032	1.029	1.021	1.0276	0.0056	1.0276
b		3.038	3.048	3.065	3.0506	0.0138	3.0506

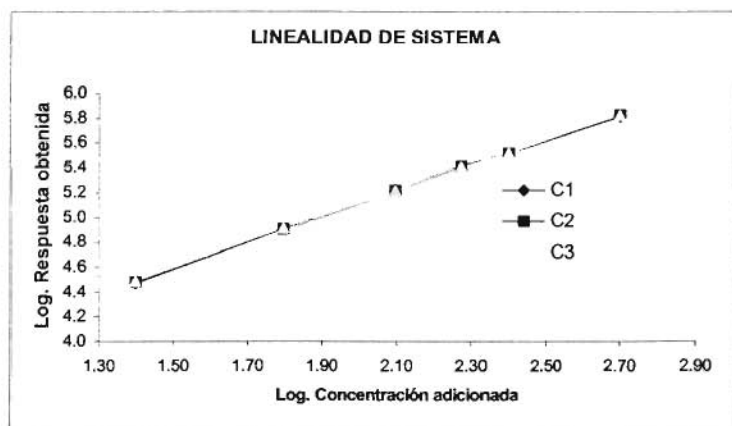


Figura 4. Linealidad de sistema para la cuantificación de Dextropropoxifeno

LINEALIDAD DEL METODO

En la tabla 6 se presentan los parámetros de linealidad (r, m y b) obtenidos para las curvas preparadas en plasma, mientras que en la figura 5 se presenta la gráfica de log de concentración vs log de la respuesta en el intervalo de concentración de 25 a 500 ng/mL.

Tabla 6. Linealidad de método analítico para la cuantificación de dextropropoxifeno en plasma

C. Nominal	Log. Conc.	Log. Resp 1	Log. Resp 2	Log. Resp 3		
25	1.398	1.392	1.400	1.448		
62.5	1.796	1.804	1.802	1.752		
125	2.097	2.102	2.105	2.046		
187.5	2.273	2.285	2.246	2.278		
250	2.398	2.373	2.393	2.409		
500	2.699	2.705	2.715	2.728		
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Global
r		0.9996	0.9995	0.9963	0.9984	0.9971
m		0.981	0.930	0.932	0.948	1.0400
b		3.026	3.119	3.145	3.097	-6.1098

LINEALIDAD DE METODO

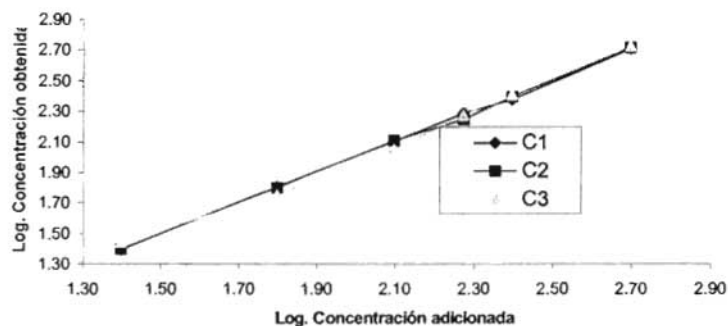


Figura 5. Linealidad de método analítico para la cuantificación de Dextropropoxifeno en plasma.

Los resultados de precisión y exactitud se presentan en la tabla 7

Tabla 7. Precisión y exactitud de método

	TABLA DE COMPARACIÓN					
	Concentración Nominal					
	25	62.5	125	187.5	250	500
	Concentración Recuperada (ng / mL)					
	24.7	63.6	126.4	192.9	236.3	506.6
	25.1	63.4	127.4	176.3	247.1	518.3
	28.0	56.5	111.1	189.8	256.2	534.7
Promedio	25.9	61.2	121.6	186.3	246.5	519.9
Desviación estandar	1.8	4.0	9.1	8.8	10.0	14.1
%Coeficiente de variación	7.1	6.6	7.5	4.7	4.1	2.7
%Desviación absoluta	-3.7	2.1	2.7	0.6	1.4	-4.0

PRECISIÓN

En la tabla 8 se presentan los resultados de precisión y exactitud del método al analizar los 3 puntos de control por quintuplicado.

Tabla 8. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación del

Dextropropoxifeno

REPETIBILIDAD DEL METODO			
REPLICA	Concentración Recuperada (ng / mL)		
	MCB 37.5	MCM 200	MCA 475
1	41.0	190.2	472.4
2	34.7	189.7	519.0
3	34.3	185.3	520.4
4	34.7	190.0	477.5
5	37.7	185.4	488.3
Promedio	36.5	188.1	495.5
Desviación Estandar	2.9	2.5	22.8
% Coeficiente de variación	8.0	1.3	4.6
% Desviación Absoluta	2.7	5.9	-4.3

MCB : Muestra de control bajo

MCM: Muestra de control medio

MCA: Muestra de control alto

REPRODUCIBILIDAD

En las tablas 9 y 10 se presentan los resultados de reproducibilidad del método, al ser analizados por dos analistas diferentes en días diferentes.

Tabla 9. Reproducibilidad interdías del 1er. Analista

TABLA DE REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO 1er. ANALISTA				
DIA	REPLICA	Concentración Recuperada (ng / mL)		
		MCB 37.5	MCM 200	MCA 475
1	1	36.22	198.62	446.15
	2	36.39	204.47	472.36
2	1	40.14	221.87	407.19
	2	38.84	207.75	372.91
3	1	41.04	190.18	472.37
	2	34.71	189.74	519.03
Promedio		37.89	202.11	448.34
Desviación estandar		2.49	12.13	52.04
%Coeficiente de variación		6.57	6.00	11.61
% Desviación absoluta		-1.04	-1.05	5.61

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

Tabla 10. Reproducibilidad interdías del 2do. analista

TABLA DE REPRODUCIBILIDAD DEL METODO 2do. ANALISTA				
DIA	REPLICA	Concentración Recuperada (ng / mL)		
		MCB 37.5	MCM 200	MCA 475
1	1	39.58	188.36	489.06
	2	37.19	186.36	467.78
2	1	37.38	184.68	502.53
	2	31.93	176.19	507.03
3	1	36.08	185.05	482.48
	2	37.00	195.83	476.51
Promedio		36.53	186.08	487.57
Desviación estandar		2.53	6.34	15.13
%Coeficiente de variación		6.93	3.41	3.10
% Desviación absoluta		2.60	6.96	-2.65

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

En la tabla 11 se presentan los resultados promedio de reproducibilidad del método analítico, al analizar Dextropropoxifeno en días diferentes y por dos analistas diferentes

Tabla 11. Tabla de reproducibilidad entre analistas en los 3 días.

Tabla de Comparación Total	Concentración Recuperada (ng / mL)		
	MCB	MCM	MCA
Promedio	37.2	194.1	468.0
Desviación Estandar	2.5	12.5	41.9
% Coeficiente de Variación	6.7	6.4	9.0
% Desviación Absoluta	0.8	3.0	1.5

MCB : Muestra de control bajo

MCM: Muestra de control medio

MCA: Muestra de control alto

RECOBRO ABSOLUTO

La tabla 12 se muestran los resultados de porcentaje de recobro de dextropropoxifeno en plasma

Tabla 12. Recobro absoluto de dextropropoxifeno en plasma

C.Nominal	Área Sistema	Área Plasma	%Recobro
62.5	78802	62350	79.1
125	163619	122239	74.7
187.5	252861	185051	73.2
250	324467	225749	69.6
500	638870	476915	74.7
		Prom	74.3
		%CV	4.6

LIMITE DE CUANTIFICACION

La tabla 13 muestra los valores de concentración recuperada al analizar la concentración de 25 ng/mL así como el cálculo del coeficiente de variación y la desviación absoluta.

Tabla 13. Cálculo del límite de cuantificación

C. Nominal (ng / mL)	Área	Log. Conc.	Log. Area	Log. Resp	Conc. Rec
25	28664	1.40	4.46	1.43	26.94
25	26109	1.40	4.42	1.39	24.53
25	28438	1.40	4.45	1.43	26.73
25	26329	1.40	4.42	1.39	24.73
25	23770	1.40	4.38	1.35	22.31
Promedio					25.05
Desviación Absoluta					1.89
% Coeficiente de Variación					7.53
% Desviación Absoluta					-0.19

LIMITE DE DETECCIÓN

Se encontró que la concentración a la cual la señal equivalía al triple valor del nivel de ruido era la equivalente de 10 ng/mL.

SELECTIVIDAD

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos con a) blanco de plasma, b) plasma adicionado con dextropropoxifeno 25 ng/mL, c) plasma

hemolizado, d) plasma adicionado con paracetamol, e) plasma adicionado con naproxeno sódico, f) plasma adicionado con cafeína, g) plasma adicionado con ácido salicílico, h) plasma adicionado con ácido acetilsalicílico, i) plasma adicionado con EDTA disódico y j) plasma adicionado con heparina. Se puede observar que ninguno de ellos interfiere en la señal cromatográfica de dextropropoxifeno.

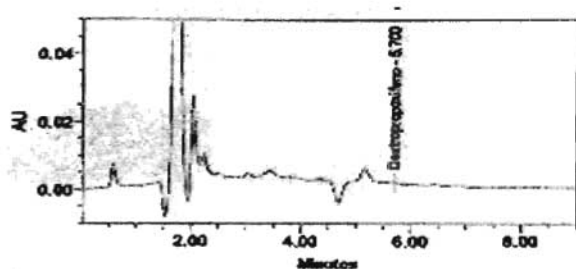


Figura 6.

a) Blanco de plasma

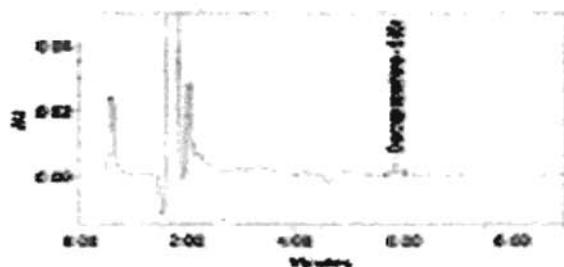


Figura 7.

b) Plasma adicionado con dextropropoxifeno 25 ng/mL

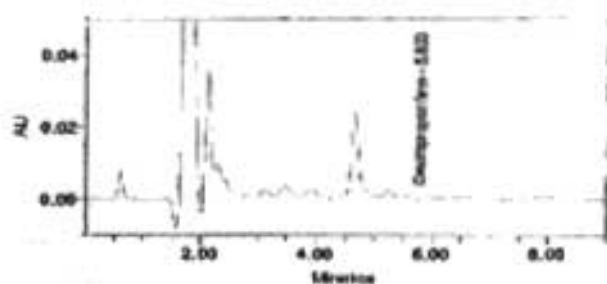


Figura 8.

c) Plasma hemolizado

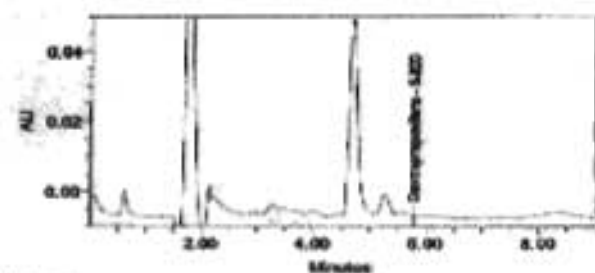


Figura 9.

d) Plasma adicionado con paracetamol

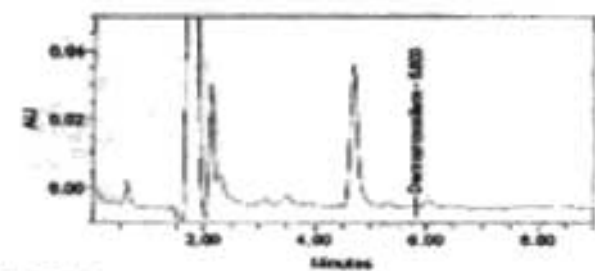


Figura 10.

e) Plasma adicionado con naproxeno sódico

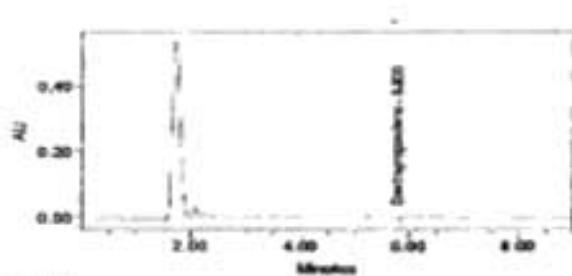


Figura 11.

f) Plasma adicionado con cafeína

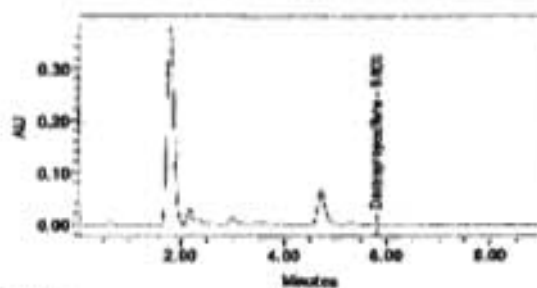


Figura 12.

g) Plasma adicionado con ácido salicílico

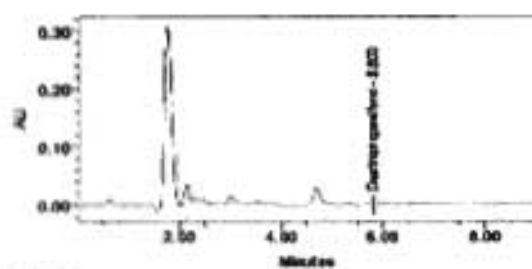


Figura 13.

h) Plasma adicionado con ácido acetilsalicílico

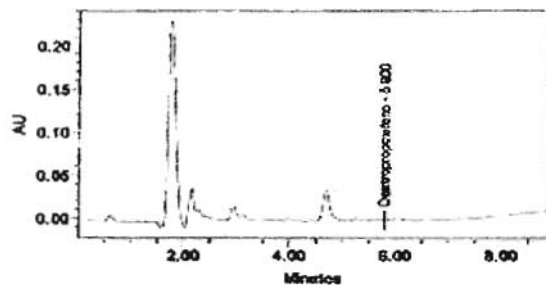


Figura 14.

i) Plasma adicionado con EDTA disódico

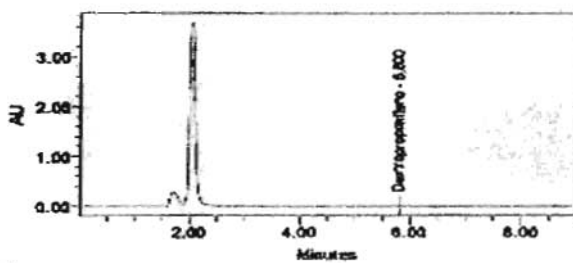


Figura 15.

j) Plasma adicionado con heparina

PRUEBAS DE ESTABILIDAD

En las tablas 14 – 18 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de estabilidad.

Tabla 14. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación – descongelación

C.Nominal (ng / mL)	MCB 37.5	MCM 200	MCA 475
CICLO 1			
	37.5	200	475
Concentración Recuperada (ng / mL)	33.4	190.3	483.2
	35.5	175.2	491.4
Promedio	34.5	182.8	487.3
% Coeficiente de Variación	4.3	5.8	1.2
% Desviación Absoluta	8.1	8.6	-2.6
CICLO 2			
Concentración Recuperada (ng / mL)	37.6	179.7	501.5
	37.0	196.7	443.1
Promedio	37.3	188.2	472.3
% Coeficiente de Variación	1.2	6.4	8.7
% Desviación Absoluta	0.5	5.9	0.6

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

Tabla 15. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente

C. Nominal (ng / mL)	MCB 37.5	MCM 200	MCA 475
C. Recuperada (ng / mL)	38.0	213.6	490.6
	37.1	215.2	523.2
Promedio	37.6	214.4	506.9
% Coeficiente de variación	1.7	0.5	4.5
% Desviación Absoluta	-0.2	-7.2	-6.7

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada

C.Nominal (ng / mL)	MCB	MCM	MCA
	37.5	200	475
T = 12 h			
C.Recuperada (ng / mL)	42.0	173.8	463.3
	40.0	188.6	457.0
Promedio	41.0	181.2	460.2
% Coeficiente de variación	3.4	5.8	1.0
%Desviación Absoluta	-9.4	9.4	3.1
T = 24 h			
C.Nominal (ng / mL)	MCB	MCM	MCA
	37.5	200	475
C.Recuperada (ng / mL)	40.2	215.3	525.6
	41.3	196.1	409.1
Promedio	40.7	205.7	467.4
% Coeficiente de variación	1.9	6.6	17.6
%Desviación Absoluta	-8.6	-2.8	1.6

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

TABLA 17 Estabilidad de la muestra evaporada almacenada a -70°C .

C.Nominal (ng / mL)	MCB	MCM	MCA
	37.5	200	475
C. Recuperada (ng / mL)	39.6	219.4	539.9
	37.5	209.2	508.3
Promedio	38.5	214.3	524.1
% Coeficiente de Variación	3.9	3.4	4.3
% Desviación Absoluta	-2.7	-7.2	-10.3

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

Tabla 18 Estabilidad a largo plazo

C.Nominal (ng / mL)	MCB	MCM	MCA
	37.5	200	475
T = 16 DIAS			
C.Recuperada (ng / mL)	37.2	171.0	477.4
	36.0	180.6	464.3
Promedio	36.6	175.8	470.8
%Coeficiente de Variación	2.3	3.9	2.0
%Desviación Absoluta	2.4	12.1	0.9
T = 30 DIAS			
C.Recuperada (ng / mL)	36.0	194.0	455.1
	38.0	185.7	455.5
Promedio	37.0	189.8	455.3
%Coeficiente de Variación	4.0	3.1	0.1
%Desviación Absoluta	1.3	5.1	4.1
T = 66 DIAS			
C.Recuperada (ng / mL)	42.2	224.1	461.1
	42.8	222.2	490.4
Promedio	42.5	223.2	475.7
%Coeficiente de Variación	1.0	0.6	4.4
%Desviación Absoluta	-13.3	-11.6	-0.2

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

TOLERANCIA

A continuación se presentan los resultados de la tolerancia al cambiar el pH de la fase móvil de 3 a 3.5 y el volumen de NaOH agregado a la muestra de 100 a 200 μ L.

Tabla 19. Tolerancia del método para cuantificar dextropropoxifeno en plasma

C. Nominal (ng / mL)	MCB	MCM	MCA
	37.5	200	475
Condiciones normales Buffer pH = 3.0 y 100 mL NaOH 1 n			
C. Recuperada (ng / mL)	35.1	196.3	532.5
	34.2	194.9	492.2
Promedio	34.6	195.6	512.3
%Coeficiente de Variación	1.9	0.5	5.6
Buffer pH = 3.5			
C. Recuperada (ng / mL)	36.0	218.4	505.6
	35.0	220.7	509.6
Promedio	35.5	219.6	507.6
%Coeficiente de Variación	1.8	0.7	0.6
%Desviación Absoluta	-2.5	-12.2	0.9
200 µL NaOH 1 N			
C. Recuperada (ng / mL)	42.0	202.1	518.8
	37.0	224.2	440.2
Promedio	39.5	213.1	479.5
%Coeficiente de Variación	9.0	7.3	11.6
%Desviación Absoluta	-14.0	-9.0	6.4

MCB : Muestra de control bajo
MCM: Muestra de control medio
MCA: Muestra de control alto

CAPITULO 7.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

7.1.2 Linealidad de sistema

La figura 4, muestra las 3 curvas obtenidas en solución, observándose una respuesta similar en cada nivel de concentración. La tabla 5 muestra un coeficiente de correlación mayor de 0.99 en las 3 curvas ¹.

7.1.3 Linealidad de método

Como se puede observar en la tabla 6 y en la figura 5, el método fue lineal en el intervalo de concentración de 25 a 500 ng/mL. En todos los casos, el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99 ¹.

7.1.4 Precisión y exactitud de método

Como se puede observar en la tabla 7 los valores del coeficiente de variación fueron menores que el 10 %, lo cual indica que no hay dispersión significativa entre los puntos preparados. Al determinar el porcentaje de desviación absoluta, el valor más alto encontrado a lo largo del rango de trabajo fue de 4.0 . Dado que el criterio de aceptación es de no más del 20 % en la concentración mas baja y no más del 15% en el resto del rango de trabajo, el método desarrollado es lineal y preciso en el rango de concentraciones estudiado.

7.1.5 Repetibilidad del método

En la tabla 8 se puede observar que la dispersión entre los puntos de concentración (bajo, medio y alto) en las cinco réplicas es mínima, el coeficiente de variación más alto se encontró en la concentración baja, sin embargo un valor de 8.0 % es un valor bajo. Dado que el criterio menciona un valor no mayor al 15% de coeficiente de variación, el método es preciso.

7.1.6 Reproducibilidad del método

Al analizar los resultados de reproducibilidad (Tablas 8 y 9), se encontró que, para el analista 1, el coeficiente de variación máximo fue de 11.61%, y la desviación absoluta, fue de 5.61 %. mientras que del analista 2, el coeficiente de variación máximo fue de 6.93 % en la concentración baja y la desviación absoluta mayor fue de 6.96, encontrada en el control medio.

De los resultados de reproducibilidad obtenidos con 2 analistas, en días diferentes pero en el mismo laboratorio (Tabla 10), se encontró que en los 3 días de trabajo la concentración recuperada fue semejante.

Al analizar los resultados, de ambos analistas en los diferentes días de trabajo se encontró que el máximo valor del coeficiente de variación fue de 8.95 lo cual indica que no hay una variación significativa entre los dos analistas tomando

en cuenta que el criterio que pide la norma (NOM-177) es un coeficiente de variación menor al 15% ¹.

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los analistas durante los 3 días de trabajo, se llevó a cabo un análisis de varianza utilizando el programa StatgraphicsPlus.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 20 Análisis de varianza para evaluar la reproducibilidad del método analítico entre los analistas en 3 días de trabajo.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
ANALISTA	5.92165	1	5.92165	0.37	0.5748
DIA (ANALISTA)	63.6605	4	15.9151	0.23	0.9216
Residual	2111.43	30	70.3809		
Total (corrected)	2181.01	35			

Se puede observar que el valor de P tanto para los analistas como para los días en que ellos trabajaron es mayor que 0.05. Este valor fue nuestro criterio de rechazo de la hipótesis nula (Existe diferencia en 3 diferentes días de trabajo y entre los analistas).

Las siguientes figuras muestran la comparación de las medias obtenidas entre los analistas y entre los 3 días de trabajo tomando el recobro porcentual de los resultados de los puntos control

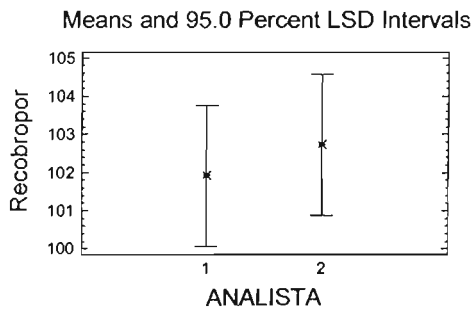


Figura 16. Reproducibilidad entre los 2 analistas

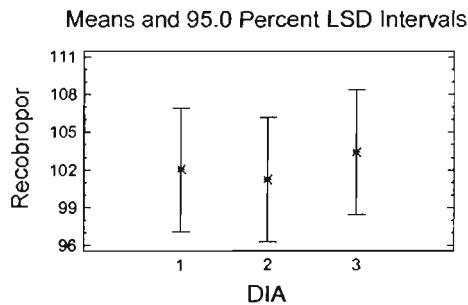


Figura 17. Reproducibilidad entre los 3 días de trabajo

Es posible observar en las dos figuras anteriores que las medias de comparación se interceptan indicándonos precisión en los resultados tanto en la comparación de los analistas como en los días de trabajo

7.1.7 Recobro

Los resultados de la tabla 7 muestran que el recobro de dextropropoxifeno varió entre 69.6 y 79.1 %. El coeficiente de variación fue de 4.62%, se encontró que a lo largo de todo el rango de trabajo el recobro es constante.

7.1.8 Selectividad

Como se puede observar en las figuras 6 al 15, no se observa ninguna interferencia en el tiempo de retención del Dextropropoxifeno, dándole así, confiabilidad a la cuantificación de este.

7.1.9 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación – descongelación

De los resultados que se presentan en la tabla 14 se puede observar que al someter la muestra a 2 ciclos congelación descongelación (Congelación a -70°C y descongelación a temperatura ambiente) el valor más alto de la desviación absoluta fue de 5.9, encontrado lo cual indica que el dextropropoxifeno es estable bajo estas condiciones.

7.1.10 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

La tabla 15 nos permite ver que la muestra plasmática conteniendo dextropropoxifeno es estable a temperatura ambiente durante 26 horas, lo cual es tiempo adecuado para llevar a cabo la extracción de las muestras.

7.1.11 Estabilidad de la muestra procesada

La tabla 16 muestra un valor máximo de 9.4 de desviación absoluta, indicando una confiabilidad de la estabilidad de la muestra en automuestreador por 24 horas a temperatura ambiente.

7.1.11 Estabilidad de la muestra evaporada almacenada a -70°C .

En la tabla 17, se observa que el valor máximo encontrado en la desviación absoluta fue de 10.3. Ya que la norma menciona un valor máximo del 15% , se puede decir que la muestra se puede almacenar evaporada a -70°C por un tiempo de 24 horas con la confiabilidad de que esta mantiene sus propiedades.

7.1.12 Estabilidad a largo plazo

Al analizar los resultados de estabilidad a largo plazo, (tabla 18) se encontró que todos los valores se encuentran dentro del 15 % del valor nominal de concentración, lo que indica que las muestras mantienen su concentración y pueden ser analizadas confiablemente almacenadas a -70°C hasta 66 días después.

7.1.13 Tolerancia

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

De los resultados de la tabla 19 se observa que al modificar el pH de la solución amortiguadora de fosfatos, de 3 a 3.5 el por ciento de desviación absoluta fue menor que 12.5 %. La segunda modificación fue el volumen de NaOH agregado que, se aumentó de 100 a 200 μ L. En la misma tabla se muestra que el valor de la desviación absoluta mayor se encontró en el control bajo (14 %). Ya que la norma indica un máximo de 15 %, se puede decir que el método no se ve afectado por ligeras variaciones en el pH del Buffer o la cantidad de hidróxido de sodio agregada a la muestra.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método por cromatografía de líquidos para cuantificar Dextropropoxifeno en plasma.

El método requiere de 300 μL de plasma, alcalinizar con NaOH, una extracción con 3 mL de éter y 100 μl de hidróxido de sodio y un flujo de 1 mL/min, 198nm y 0.5 AUFS como condiciones cromatográficas

El método es selectivo ya que como se puede observar en los cromatogramas de la prueba de selectividad, los fármacos analizados (que son comúnmente utilizados) no presentan interferencia en la señal del Dextropropoxifeno

El método desarrollado demostró ser lineal en el rango de concentraciones de 25 a 500 ng/mL, reproducible y selectivo

Las muestras se mantienen estables durante 66 días.

El método desarrollado puede ser empleado en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética

BIBLIOGRAFÍA

1. Norma oficial mexicana. NOM-177, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
2. ACUERDO por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles, 1998
3. Helgi Jung Cook, Enrique Hong Chong. Biodisponibilidad y bioequivalencia, editorial AFM, 2003.
4. Hilda Lilia Cardenas Rodríguez, Alma Rosa Cortés Arrollo
Aspectos farmacéuticos de la evaluación de medicamentos, UAM – X, 1996.
5. Guidance for industry. Bioanalytical method validation, FDA, May 2001
6. Merk & Co. Inc.; The Merk index Chemical. Drugd and biologics; 12^a edición, 1996
7. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph 442 Pharmaceutical (Dextropropoxyphéne), 1998.
8. Hardman Joel G. ,Goodman. Las bases farmacológicas de la terapéutica Editorial Mc Graw Hill interamericana; 9na edición; 1996; E.U.
9. Vademécum académico de medicamentos
Editorial Mc Graw – Hill interamericana, segunda edición, 1995

10. Diccionario de especialidades farmacéuticas.
Ediciones PLM; México D.F., 2003.
11. Welage, L. Kirking, D. Ascione, F and Gaither, C. Understanding the
Scientific Issues Embedded in the Generic Drug
Approval Process., J Am Pharm Assos. 2001; 41: 856 – 67
12. Guidance for industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally
Administered Drug, Products – General Considerations
13. Kunka, R. Yong, Ch. Ladik, c. and Bates, t.
Liquid Chromatographic Determination of Propoxyphene and
Norpropoxyphene in Plasma and Breast Milk. Journal of Pharmaceutical
Sciences. 1985; 74: 103-104
14. Rop, P. Grimaldi, F. Bresson, M. Fornaris, M and Viala, A.
Simultaneous determination of dextromoramide, propoxyphene and
norpropoxiphene in necropsic whole blood by liquid chromatography
Journal of chromatography 1993; 615: 355 – 364
15. Verebely, K. Inturrisi, Ch E. The simultaneous determination of
Propoxyphene and Norpropoxyphene in human biofluids using Gas – Liquid
Chromatography
Journal of chromatography, 1973; 75: 195 – 203 1973
16. Margot, P. Crouch, D. Finkle, B. Johnson, J. and Deyman, M.
Capillary and Packed Column GC Determination of Propoxyphene and
Norpropoxyphene in biological Specimens: Analytical problems and
improvements. Journal of Chromatographic Science 1982; 21: 201 – 204
17. Mersch, F. Yegles, M, Wennig, R. Quantification of dextropropoxyphene and

its metabolite by HPLC in hair of overdose cases. *Forensic Sci Int.*

1997; 84: 237 – 242

18. Hedenmalm, K. A Case of Severe Withdrawal Syndrome due to Dextropropoxyphene. *Norrland University Hospital; S-901 85 Ume angstrom; Sweden.* 1995; 123: Page 473
19. Statgraphic Plus. Programa estadístico