



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO  
PARA CUANTIFICAR METOPROLOL EN PLASMA MEDIANTE  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**BLANCA ESTELA BADILLO SANTOYO**



**MÉXICO, D.F.**

**2008**



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: Profra. INÉS FUENTES NORIEGA

Vocal: Prof. LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ

Secretario: Q.F.B. MYRIAM CORTÉS FUENTES

1er. Suplente: Profra. LIZ JANNET MEDINA REYES

2do. Suplente: Prof. RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. de C.V.

Asesor:

Q.F.B. Myriam Cortés Fuentes



---

Supervisor Técnico:

Q.B.P. Juan Ramón Martínez de León



---

Sustentante:

Blanca Estela Badillo Santoyo



---

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias por formar generación tras generación nuevos profesionistas, por brindarnos una oportunidad de superación personal y una educación de excelencia a la que muchos no podríamos tener acceso de no existir tan prestigiada institución.*

*A todos mis profesores muy especialmente a Beatriz Suárez, Jesús Castillo, Sylvia Cataño, Ramiro Domínguez y Socorro Alpizar. Gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por su ayuda y por creer en mí.*

*Con mucho cariño, respeto y agradecimiento a todos mis compañeros de CAFET:*

*A la QFB. Miriam Cortés Fuentes y al QBP. Juan Ramón Martínez de León. Gracias por la oportunidad, por sus enseñanzas, por sus consejos, por su paciencia y por ayudarme a culminar esta meta.*

*A la M. en C. Patricia Valadez y al QFB. Vidal Tovar. Gracias por su ayuda y colaboración en la realización del presente trabajo.*

*A Antonio, Gonzalo, Fabián, Fidel, Maribel y Rey. Gracias por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, por ayudarme a resolver todas mis dudas, ustedes han sido un pilar fundamental en mi formación como profesionista. Gracias por cada momento compartido.*

*A Iliana, Javier, Loana, Omar, Sergio y Zulema. Gracias por sus sonrisas, por sus ocurrencias y por hacer de cada día de trabajo un momento especial.*

*A mis amigos de toda la vida: Yamel, Alfredo, Julián, María Elena, Manuel, Maricela y Guillermo † (en donde quiera que estés). Gracias por su amistad incondicional, por escucharme y apoyarme en todo momento por difícil que sea, gracias por todos esos momentos de alegría y felicidad a su lado...*

*Con todo mi amor y agradecimiento para ustedes*

*A mis padres:*

*Antonia y Martín. Como agradecer su infinito amor, sus cuidados y desvelos, su comprensión y consejos, su ayuda y apoyo en cada locura, todos sus sacrificios por hacer de mis hermanos y de mi lo que ahora somos.*

*A mis hermanos:*

*Marcos y Oscar. Gracias por soportarme y apoyarme en todo momento.*

*A mi tita:*

*Justina. Gracias por cuidar siempre de mis hermanos y de mí.*

*A C. Frausto. Gracias por tu paciencia y por llegar cuando más te necesitaba.*

*Ustedes son mi orgullo, mi fortaleza, mi ejemplo a seguir  
y la razón de superarme cada día.*

*Gracias a ti Dios, por darme la vida y por hacer a todos ustedes parte de ella.*

*LOS AMO  
BLANCA*

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. OBJETIVO</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>2</b>
<b>2.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1 Clasificación de Métodos Cromatográficos</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Parámetros Cromatográficos</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Clasificación de Cromatografía de Líquidos</b>	<b>10</b>
2.1.3.1 <i>Cromatografía Líquido-Sólido (Adsorción)</i>	10
2.1.3.2 <i>Cromatografía de Reparto</i>	10
2.1.3.3 <i>Cromatografía de Intercambio Iónico</i>	12
2.1.3.4 <i>Cromatografía de Exclusión</i>	13
<b>2.1.4 Instrumentación para CLAR</b>	<b>13</b>
2.1.4.1 <i>Reservorio para Fase Móvil</i>	14
2.1.4.2 <i>Sistemas de Bombeo</i>	15
2.1.4.3 <i>Inyectores</i>	15
2.1.4.4 <i>Detectores</i>	15
<b>2.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Propiedades de los Fluidos Biológicos</b>	<b>19</b>
2.2.1.1 <i>Sangre</i>	19
2.2.1.2 <i>Plasma y Suero</i>	19
2.2.1.3 <i>Orina</i>	21
2.2.1.4 <i>Saliva</i>	21
2.2.1.5 <i>Otros Fluidos Biológicos</i>	21
<b>2.2.2 Técnicas Analíticas para el Procesamiento de Fluidos Biológicos</b>	<b>22</b>
2.2.2.1 <i>Ultrafiltración</i>	22
2.2.2.2 <i>Precipitación</i>	22
2.2.2.3 <i>Extracción Líquido-Líquido</i>	25
2.2.2.4 <i>Extracción en Fase Sólida</i>	26
2.2.2.5 <i>Cromatografía Bidimensional</i>	27
<b>2.3 MONOGRAFÍA DEL TARTRATO DE METOPROLOL</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1 Descripción</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2 Propiedades Físico-Químicas</b>	<b>29</b>
<b>2.3.3 Propiedades Farmacológicas</b>	<b>32</b>
<b>2.3.4 Métodos Analíticos Reportados para la Cuantificación de Metoprolol en Fluidos Biológicos mediante CLAR</b>	<b>33</b>
<b>2.4 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>36</b>
<b>2.4.1 Cromatografía de Fase Reversa con Fase Ligada y Control de la Ionización</b>	<b>37</b>
<b>2.4.2 Cromatografía de Fase Reversa con Fase Ligada y Agente de Par Iónico</b>	<b>38</b>
2.4.2.1 <i>Mecanismo de la Cromatografía de Pares de Iones</i>	39
2.4.2.2 <i>Factores que Influyen en la Retención</i>	39
<b>2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS</b>	<b>41</b>
<b>2.5.1 Adecuabilidad del Sistema</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2 Selectividad</b>	<b>41</b>
<b>2.5.3 Linealidad</b>	<b>42</b>

2.5.4 Exactitud	42
2.5.5 Precisión	42
2.5.6 Rango	42
2.5.7 Recuperación Absoluta	42
2.5.8 Limite de Cuantificación	43
2.5.9 Limite de Detección	43
2.5.10 Estabilidad	43
2.5.11 Tolerancia y Robustez	44
<b>3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METOPROLOL EN PLASMA</b>	<b>45</b>
3.1 SELECCIÓN DE MATRIZ O FLUIDO BIOLÓGICO	45
3.2 INTERVALO DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	45
3.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO	46
3.4 CONDICIONES DE DETECCIÓN	46
3.5 TÉCNICA ANALÍTICA PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	48
3.6 DEFINICIÓN DEL SISTEMA PRELIMINAR	48
3.7 MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METOPROLOL EN PLASMA	60
3.7.1 Sustancias de Referencia	60
3.7.2 Reactivos	60
3.7.3 Soluciones	60
3.7.4 Equipo	61
3.7.5 Descripción del Método Analítico	61
3.7.5.1 Preparación de Blancos	61
3.7.5.2 Preparación de las Soluciones	61
3.7.5.3 Preparación de la Curva de Calibración	62
3.7.5.4 Preparación de Puntos Control	62
3.7.5.5 Procesamiento de las Muestras	62
3.7.5.6 Sistema Cromatográfico	63
3.7.5.7 Cálculos	63
<b>4. VALIDACIÓN</b>	<b>64</b>
4.1 SUSTANCIAS DE REFERENCIA	64
4.2 REACTIVOS	64
4.3 EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y CONSUMIBLES	65
4.4 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN EVALUADOS	66
4.4.1 Adecuabilidad del Sistema	66
4.4.2 Selectividad	66
4.4.2.1 Selectividad a la Matriz Biológica	66
4.4.2.2 Selectividad a Fármacos y Anticoagulantes de Uso Común	66
4.4.3 Linealidad, Exactitud y Precisión	67
4.4.3.1 Linealidad	67
4.4.3.2 Exactitud	67

4.4.3.3 <i>Precisión</i>	68
4.4.3.3.1 Repetibilidad	68
4.4.3.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio	68
<b>4.4.4 Rango</b>	<b>68</b>
<b>4.4.5 Recuperación Absoluta</b>	<b>69</b>
<b>4.4.6 Limite de Cuantificación</b>	<b>69</b>
<b>4.4.7 Limite de Detección</b>	<b>70</b>
<b>4.4.8 Estabilidad de las Muestras</b>	<b>70</b>
4.4.8.1 <i>Estabilidad de las Muestras a Ciclos de Congelación-Descongelación</i>	70
4.4.8.2 <i>Estabilidad de la Muestra a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)</i>	71
4.4.8.3 <i>Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección</i>	71
4.4.8.4 <i>Estabilidad a Condiciones de Almacenamiento</i>	72
<b>4.4.9 Tolerancia</b>	<b>72</b>
4.4.9.1 <i>Tolerancia a Cambio de Analista</i>	72
4.4.9.2 <i>Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica</i>	73
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>5.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA</b>	<b>74</b>
<b>5.2 SELECTIVIDAD</b>	<b>75</b>
5.2.1 Selectividad a la Matriz Biológica	75
5.2.2 Selectividad a Anticoagulantes	76
5.2.3 Selectividad a Fármacos de Uso Común	77
<b>5.3 LINEALIDAD</b>	<b>78</b>
<b>5.4 EXACTITUD Y PRECISIÓN</b>	<b>79</b>
<b>5.5 RECUPERACIÓN ABSOLUTA</b>	<b>81</b>
<b>5.6 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	<b>83</b>
<b>5.7 LIMITE DE DETECCIÓN</b>	<b>83</b>
<b>5.8 ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS</b>	<b>84</b>
5.8.1 Estabilidad de las Muestras a Ciclos de Congelación-Descongelación	84
5.8.2 Estabilidad de la Muestra a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)	84
5.8.3 Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección	85
5.8.4 Estabilidad de la Muestra Durante Almacenamiento a -40°C	85
<b>5.9 TOLERANCIA</b>	<b>86</b>
5.9.1 Tolerancia a Cambio de Analista	86
5.9.2 Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica	87
<b>5.10 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DURANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS</b>	<b>88</b>
5.10.1 Adecuabilidad del Sistema	88
5.10.2 Selectividad	89
5.10.3 Linealidad	90
5.10.4 Exactitud y Precisión	91
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>

## INTRODUCCIÓN

Los medicamentos genéricos constituyen una alternativa apropiada para mejorar el acceso a los medicamentos que la población necesita. Aunque existe un debate nacional e internacional acerca de una calidad diferencial entre los medicamentos genéricos y los medicamentos innovadores, conviene precisar que para proteger la salud pública, las autoridades reguladoras de cada país establecen los requisitos necesarios para obtener el registro sanitario que no hace distinción entre productos innovadores y productos competidores buscando así asegurar y garantizar la calidad de todos los medicamentos que se ponen en el mercado.

Dos presentaciones farmacéuticas que contienen el mismo principio activo, en la misma dosis y en la misma forma farmacéutica son equivalentes farmacéuticos, y serían intercambiables si producen el mismo efecto clínico terapéutico. La equivalencia terapéutica puede ser demostrada o inferida mediante diversos mecanismos, y es la normatividad vigente de cada país o región la que define los lineamientos a seguir.

Para establecer la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos es necesario realizar pruebas que demuestren que estos medicamentos son igualmente seguros y eficaces al medicamento de referencia dentro de un intervalo definido. Entre las principales pruebas para determinar la intercambiabilidad de un medicamento destacan los estudios de bioequivalencia, en la mayoría de los casos, para determinar la bioequivalencia de un medicamento basta con demostrar que las concentraciones plasmáticas alcanzadas son similares a las que se alcanzan con el producto original.

Los estudios de bioequivalencia constituyen la base para la autorización de la comercialización de los medicamentos genéricos. Para asegurar la validez de dichas pruebas, es necesario que éstas se realicen de manera apropiada, con calidad, con criterios homogéneos y con estrecho apego a las Buenas Prácticas de Laboratorio; para ello, estos estudios son efectuadas por entidades específicamente establecidas para este propósito que son capaces de demostrar su competencia técnica dentro del marco legal de la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998, la cual establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, así como los requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

Cabe destacar que las pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia son sólo válidas para los lotes del producto que se han sometido a esta prueba. Su validez solo podría extenderse a otros lotes de medicamentos fabricados bajo el mismo proceso (en las mismas condiciones físicas, químicas, ambientales y geográficas del medicamento examinado). Cualquier modificación en alguna de estas variables (cambio de técnica de fabricación, cambio de lugar de fabricación, etc.) implicaría el desarrollo de nuevas pruebas de biodisponibilidad o bioequivalencia. En base a lo anterior, debemos tener en cuenta que los estudios de bioequivalencia no se utilizan solamente para obtener el registro sanitario de un medicamento genérico, sino que también juegan un papel muy importante dentro del desarrollo farmacéutico.

El éxito de un estudio de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia depende en gran medida de un método analítico lo suficientemente sensible, selectivo y perfectamente validado. La validación de un método

## INTRODUCCIÓN

bioanalítico consiste en verificar y documentar su cumplimiento ante determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario, para poder resolver un problema analítico en particular. Una validación completa y perfectamente documentada es fundamental cuando se desarrolla e implementa un método bioanalítico por vez primera.

El presente trabajo tiene como finalidad describir detalladamente los pasos realizados durante el diseño de un método analítico para cuantificar Metoprolol en plasma, desde la etapa del diseño del método, seguida por su respectiva validación, hasta el monitoreo de su adecuada funcionalidad durante un estudio de bioequivalencia, todo ello en base a lo establecido por la legislación mexicana. Así mismo, este trabajo resume los fundamentos teóricos básicos necesarios para el diseño de metodologías analíticas para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos que pueden llegar a ser de apoyo para futuros diseños de métodos analíticos de esta naturaleza.

## 1. OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico sencillo, rápido y económico, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Metoprolol en plasma, que cumpla con los criterios y requisitos establecidos en la NOM-177-SSA1-1998 para su uso en estudios de intercambiabilidad.



## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 2.1.1 Clasificación de Métodos Cromatográficos

La cromatografía agrupa un conjunto de diversos métodos que nos permiten separar compuestos estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible mediante otras técnicas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil la cual puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases deben de elegirse de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan de manera diferente entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes que son retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en forma de bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente (SKOOG, 2001, p. 731).

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de diversas maneras, sin embargo, la clasificación más fundamental se basa en la naturaleza de la fase móvil y la fase estacionaria así como también en el tipo de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases (SKOOG, 2001, p. 731). La tabla 2.1 resume la clasificación de los métodos cromatográficos en función de los parámetros antes mencionados.

**TABLA 2.1. Clasificación de los Métodos Cromatográficos en Columna.**  
(SKOOG, 2001, p. 732)

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos	Líquido-líquido, o de reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase enlazada	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un líquido y una superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase enlazada	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un líquido y una superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un fluido supercrítico y una superficie enlazada



### 2.1.2 Parámetros Cromatográficos

Cada rama de la ciencia posee su propio lenguaje y la cromatografía no es la excepción. Debido a la gran popularidad de esta técnica, varias instituciones internacionales como la *American Society for Testing and Materials (ASTM)* y la *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, se han dado a la tarea de homogenizar este lenguaje así como también estandarizar los términos empleados para los métodos cromatográficos, sin embargo, esto requiere de constante debate y actualización dado que hasta la fecha continúan existiendo ciertas discrepancias en este entorno.

Con la finalidad de una mejor comprensión del presente trabajo, en el presente capítulo serán definidos de manera muy sencilla los conceptos más importantes en cuanto a cromatografía se refiere considerando los documentos nacionales e internacionales más importantes en este ámbito.

De acuerdo a la IUPAC (GARCÍA, 2001, p. 972), un *proceso cromatográfico* es una distribución dinámica entre dos fases inmiscibles y comienza en el momento en el que una muestra (sustancia o mezcla de sustancias), entra en contacto con el sistema cromatográfico y comienza a ser transportado a través de una fase estacionaria debido al movimiento de la fase móvil. El proceso cromatográfico finaliza en el momento en el que el analito sale de la columna.

El término cromatograma fue acuñado por Tsweet a comienzos de siglo. En sus trabajos, Tsweet lograba la separación de los componentes de una mezcla de pigmentos vegetales en solución por percolación de un disolvente (la fase móvil) a través de una columna rellena con un material finamente subdividido (la fase estacionaria). Debido a que el disolvente emergía de la columna antes que cualquier componente, el resultado consistía en una serie de bandas coloreadas separadas a lo largo de la columna debido a su mayor o menor grado de adsorción al relleno, debido a las características cromáticas observadas, Tsweet lo llamó cromatograma (QUATTROCCHI, 1992, p. 42). El método de Tsweet ha sido modificado desde entonces y a pesar de no mantener el significado original, el resultado de un proceso cromatográfico continúa denominándose cromatograma debido a los trabajos de Tsweet.

Hoy en día, de acuerdo a la ASTM (ASTM, 1996, p. 420) el concepto de *cromatograma* es “el resultado de la separación de solutos a través de un proceso cromatográfico. Si la separación es por medio de una columna cromatográfica, el cromatograma es una representación gráfica de la respuesta del detector versus el tiempo de retención o el volumen de retención cuando el soluto sale de la columna y pasa a través del detector”

Un cromatograma comienza en el momento en que la muestra es inyectada. A partir de ese momento, las señales encontradas en el cromatograma son las siguientes:

#### VOLUMEN DE RETENCIÓN ( $V_R$ )

El volumen de retención es el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda del soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector” (WILLARD, 1991, p. 506-507).

#### VOLUMEN MUERTO ( $V_M$ )

Volumen de fase móvil que sale de la columna, cuando un analito no es retenido por la fase estacionaria, desde que el analito es inyectado hasta el momento en que sale del sistema cromatográfico (GARCÍA, 2001, p. 973).



**VOLUMEN AJUSTADO DE RETENCIÓN ( $V_R'$ )**

Volumen de fase móvil que sale de la columna durante el tiempo en que las moléculas del analito se encuentran retenidas en la fase estacionaria (GARCÍA, 2001, p. 973).

$$V_R' = V_R - V_M$$

**LÍNEA BASE**

Es la porción del cromatograma en donde sólo se aprecia la señal debida a la elución de la fase móvil (ASTM, 1996, p420).

**VOLUMEN EXTRACOLUMNA ( $V_{ext}$ )**

El volumen extracolumna se refiere al volumen de fase móvil debido a las contribuciones del volumen del inyector, de las conexiones y del detector. El volumen extracolumna no posee un significado cromatográfico pero es deseable evitarlo o minimizarlo (GARCÍA, 2001, p. 973).

**VOLUMEN DE RETENCIÓN BRUTO ( $V_R^g$ )**

Se denomina así al volumen de retención de una sustancia no retenida, incluyendo también al volumen extracolumna (GARCÍA, 2001, p. 973).

$$V_R^g = V_R' + V_M + V_{ext} = V_R + V_{ext}$$

**TIEMPO DE RETENCIÓN ( $t_R$ )**

Es el tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra es inyectada hasta el momento en el cual se observa la señal correspondiente a la concentración máxima del analito de interés durante la elución (SKOOG, 2001, p. 735).

**TIEMPO AJUSTADO DE RETENCIÓN ( $t_R'$ )**

Debido a que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, el tiempo de retención relativo de un pico se determina como la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto (GARCÍA, 2001, p.973).

$$t_R' = t_R - t_M$$

**TIEMPO MUERTO ( $t_M$ )**

Es el tiempo que permanece en la fase estacionaria un compuesto que no es retenido, dicho de otra manera, es el tiempo necesario para que una molécula de fase móvil pase a través de la columna (GARCÍA, 2001, p. 973).

**TIEMPO MUERTO BRUTO ( $t_M^g$ )**

Es el tiempo que tarda en fluir un compuesto que no es retenido considerando también el tiempo que aportan los factores extracolumnares antes mencionados. En los casos donde se ha minimizado al máximo el tiempo extracolumnar, los valores de tiempo muerto y tiempo muerto bruto pueden ser equivalentes (GARCÍA, 2001, p. 973).

$$t_M^g = t_M - t_{ext}$$



## VELOCIDAD LINEAL PROMEDIO

(SKOOG, 2001, p. 736)

La velocidad de migración de un analito no retenido coincide con la velocidad promedio del movimiento de las moléculas de la fase móvil. La *velocidad lineal promedio del analito* ( $\bar{u}$ ) está dada por la siguiente fórmula:

$$(\bar{u}) = L / t_R$$

en donde L es la longitud del relleno de la columna. De manera semejante, la *velocidad lineal promedio del movimiento de las moléculas de la fase móvil* ( $u$ ) se expresa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$u = L / t_M$$

## CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN O COEFICIENTE DE PARTICIÓN (K)

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria y se establece un equilibrio de distribución entre ambas fases (WILLARD, 1991, p. 508). La concentración en cada fase está dada por una constante de equilibrio K denominada constante de distribución o coeficiente de partición:

$$K = \frac{\text{Concentración de la muestra en la fase estacionaria}}{\text{Concentración de la muestra en la fase móvil}}$$

FACTOR DE CAPACIDAD ( $k'$ )

El factor de capacidad es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en fase móvil. Se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil. Dicho de otra manera, el factor de capacidad es el tiempo adicional que una banda de soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido (para el cual  $k'$  es igual a cero), dividido entre el tiempo de elución de una banda no retenida (WILLARD, 1991, p. 508):

$$\begin{aligned} k' &= (V_R - V_M) / V_M = V_R' / V_M \\ &= (t_R - t_M) / t_M = t_R' / t_M \end{aligned}$$

RETENCIÓN RELATIVA ( $\alpha$ )

Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de compuestos en donde el compuesto 1 eluye antes que el compuesto 2 de tal manera que:

$$\alpha = V_R'2 / V_R'1 = t_R'2 / t_R'1 = K_2 / K_1 = k'2 / k'1$$

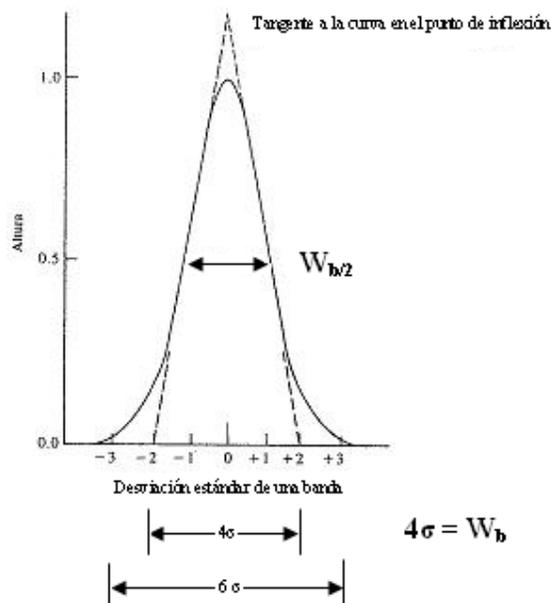
La retención relativa depende de la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil así como también de la temperatura de operación de la columna (WILLARD, 1991, p. 508).

## NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N)

La eficiencia de una columna cromatográfica se mide en función de su número de platos teóricos. El número de platos teóricos es una cantidad adimensional que refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. El número efectivo de platos teóricos se puede definir para el cromatograma de una sola banda, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = L / H = (t_R' / \sigma)^2$$





**FIGURA 2.1. Evaluación de una Banda de Soluta para Determinar la Eficiencia de una Columna Cromatográfica**  
(WILLARD, 1991, p. 510)

en donde  $L$  es la longitud de la columna,  $H$  es la altura del plato y  $\sigma^2$  es la varianza de la banda en unidades de tiempo. El ancho en la base del pico,  $W_b$  (determinado con las intersecciones de las tangentes a los puntos de inflexión con la línea base), es igual a cuatro desviaciones estándar suponiendo una distribución gaussiana ideal (ver figura 2.1). De esta manera podemos decir que  $\sigma = W_b / 4$  y al reordenar la fórmula para calcular el número de platos teóricos se obtiene:

$$N = 16 (t_R' / W_b)^2$$

La porción superior del pico determina la línea tangente, lo que minimiza cualquier contribución de un segmento con coleo o cabeceo. Frecuentemente es más sencillo medir el ancho a la mitad de la altura del pico (WILLARD, 1991, p. 511). Debido a esta razón, la USP (USP 30, p. 253) recomienda calcular el número de platos teóricos empleando la siguiente fórmula:

$$N = 5.54 (t_R' / W_{1/2})^2$$

La medición del ancho de pico a la mitad de la altura es menos sensible a la asimetría del pico debido a que generalmente el coleo se encuentra por debajo de la localización de la medida.

Es importante mencionar que a pesar de que la eficiencia de una columna suele expresarse como el número de platos teóricos, este parámetro cromatográfico es solamente una indicación de la calidad de empaquetamiento de la columna y de su envejecimiento.



### ALTURA EQUIVALENTE A PLATO TEÓRICO (H)

La altura del plato  $H$ , es la distancia que el soluto se mueve mientras se lleva a cabo un reparto:

$$H = L / N$$

La altura del plato es una manera de expresar la eficiencia de la columna en unidades de longitud (WILLARD, 1991, p. 512).

### RESOLUCIÓN ( $R_s$ )

La *resolución* de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos (SKOOG, 1999, p. 689). Se define como la distancia entre los picos de las bandas, dividida entre el ancho promedio de las bandas (WILLARD, 1991, p. 513). Si la retención y el ancho de la banda se miden en unidades de tiempo, entonces tenemos que la resolución es igual a:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

La figura 2.2 representa un cromatograma típico de una elución de dos sustancias en donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención de las sustancias 1 y 2;  $h$  y  $h/2$  son la altura total y la mitad de la altura del pico;  $W_{h/2}$  es el ancho del pico a la mitad de la altura y  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de los picos 1 y 2 respectivamente.

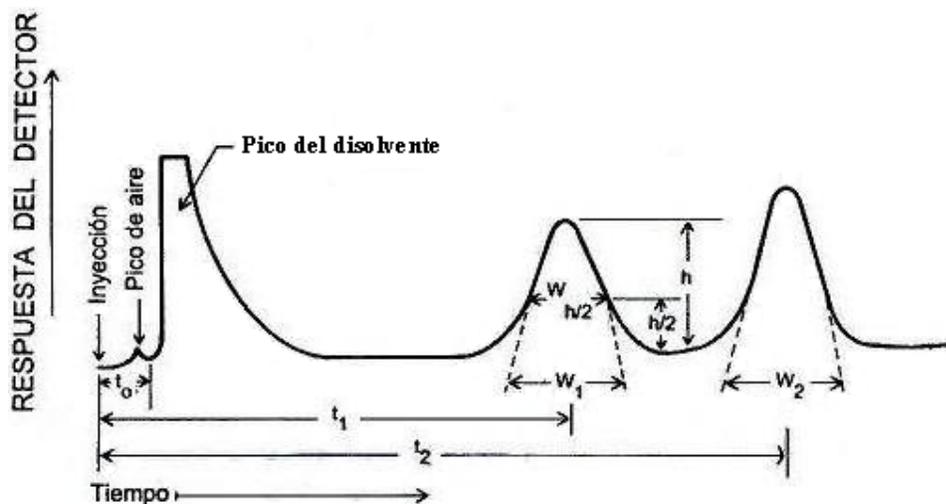


FIGURA 2.2. Separación Cromatográfica de Dos Sustancias (FEUM, 2004, p. 369)

Cuando se emplean integradores electrónicos, la USP recomienda calcular la resolución mediante la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{1.70(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$



Por su parte, la FEUM describe otra forma de expresar la resolución en términos de selectividad y eficiencia:

$$R = N / 4 (\alpha - 1) (k' / 1 + k')$$

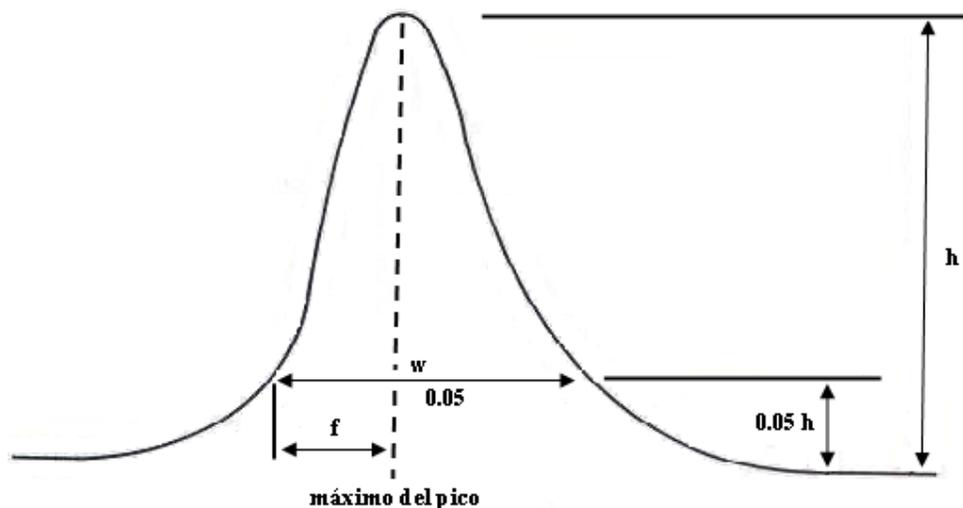
en donde  $k$  es el promedio de  $k'_1$  y  $k'_2$  (FEUM, 2004, p 379).

#### FACTOR DE ASIMETRÍA (T)

El factor de asimetría del pico es una de las formas más comunes de determinar cuando una curva se aleja del comportamiento gaussiano y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación e incluso podría ocultar algunos picos adyacentes (QUATTROCCHI, 1992, p. 51), se define como “la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. Conforme se mida más abajo la asimetría del pico, el factor de asimetría será mayor” (WILLARD, 1991, p. 512). Si bien no existe un criterio único para el cálculo del factor de asimetría, la fórmula empleada con mayor frecuencia es la descrita en la USP (USP 30, p. 253):

$$T = W_{0.05} / 2f$$

en donde  $f$  es la distancia medida entre la bisectriz del máximo del pico y la línea izquierda del pico a una altura del 5% de la altura máxima del pico. La figura 2.3 representa un pico cromatográfico asimétrico.



**FIGURA 2.3. Pico Cromatográfico Asimétrico**  
(FEUM, 2004, p. 374)

#### PROCESOS DE ENSANCHAMIENTO DE BANDA

La teoría cinética de la cromatografía explica en términos cuantitativos las formas de los picos y los efectos de distintas variables en la anchura de estos. Debido a lo anterior, es importante comprender los procesos implicados en el ensanchamiento de las bandas para poder controlarlos y minimizarlos, en medida de lo posible y de esta manera poder mejorar la eficacia de la columna (SKOOG, 2001, p. 737).



### ENSANCHAMIENTO DE BANDA INTRACOLUMNAR

(WILLARD, 1991, p. 517-520)

La eficiencia de la columna se mide, como se ha mencionado anteriormente, por su número de platos teóricos (N), o bien, por la altura equivalente a un plato teórico (H). La ecuación de Van Deemter describe el proceso de ensanchamiento de banda:

$$H = A + (B/u) + C.u$$

De acuerdo a la fórmula anterior, las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son las siguientes:

- a) Proceso multipaso o difusión por remolinos (A). Es el resultado de la no homogeneidad en las velocidades de flujo y en la longitud de los caminos alrededor de las partículas del empaque de la columna.
- b) Difusión longitudinal (B). Se refiere al movimiento molecular aleatorio dentro de la fase móvil.
- c) Resistencia a la transferencia de masa (C). Este término contempla tanto la resistencia a la transferencia de masa debida a la fase móvil como a la fase estacionaria.

La ecuación de Van Deemter emplea la velocidad lineal promedio de la fase móvil debido a que se puede relacionar directamente con la rapidez del análisis.

### ENSANCHAMIENTO DE BANDA EXTRACOLUMNAR

(QUATTROCCHI, 1992, p. 57)

En condiciones ideales, el ensanchamiento de las bandas solamente depende de los procesos que tienen lugar dentro de la columna cromatográfica, sin embargo, varios componentes del equipo cromatográfico son los responsables del ensanchamiento adicional de banda, lo que lleva a la pérdida de eficiencia. Los procesos de ensanchamiento de banda extracolumnares son generalmente producidos por tres fuentes de dispersión:

- El volumen de los componentes entre el inyector y la celda del detector (tuberías), excluida la columna cromatográfica.
- El volumen de inyección
- El detector

Debido a lo anterior, es importante verificar el diseño instrumental para de esta manera controlar el armado (longitud y tipo de tuberías, uniones, etc.) y así poder minimizar el ensanchamiento de banda debido a estos factores.



### 2.1.3 Clasificación de Cromatografía de Líquidos

El método analítico desarrollado para lograr la cuantificación de Metoprolol en plasma fue realizado mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. En el punto 2.1.1 se mencionaron los tipos de Cromatografía en columna existentes, sin embargo, con la finalidad de tener una mejor comprensión de la elección del sistema cromatográfico empleado en el método, a continuación se describirán las diferentes clases de Cromatografía de Líquidos así como también los fundamentos y aplicaciones de cada una de ellas.

#### 2.1.3.1 Cromatografía Líquido-Sólido (de Adsorción)

(WILLARD, 1991, p. 606-607)

La cromatografía de adsorción líquido-sólido es normalmente el tipo de cromatografía más conveniente para la separación de compuestos no ionizables, insolubles en agua y de diferente polaridad.

La polaridad de las moléculas proviene de la presencia y de la posición de diversos grupos funcionales en ellas. Generalmente, en un compuesto polifuncional, el grupo más polar es el que determina sus características de adsorción. La cromatografía de adsorción permite la separación de mezclas complejas en clases de compuestos, agrupándolos de acuerdo al o a los grupos funcionales de mayor polaridad.

Los adsorbentes para empaque de columnas empleados en cromatografía de adsorción pueden ser geles de sílice, alúmina o carbón. Los geles de sílice son más ácidos y por lo tanto son útiles para la separación de materiales básicos, mientras que los geles de alúmina son más básicos y por lo tanto se emplean en la separación de componentes ácidos. La retención y separación en estas dos clases de adsorbentes son similares, sin embargo, los geles de sílice son más comúnmente empleados.

A continuación se describirán brevemente los fundamentos de la cromatografía de adsorción considerando al gel de sílice como fase estacionaria por ser este el adsorbente más usado. El mecanismo principal en la cromatografía de adsorción es la interacción de los grupos hidrófilo del gel de sílice con el grupo funcional más polar de una molécula de soluto o de disolvente. Los grupos silanoles (Si-OH) del gel de sílice se encuentran en la superficie del empaque de la columna y se extienden a lo largo de ella, el número y el arreglo topográfico de los grupos hidroxilo determinan la actividad del adsorbente y por lo tanto la retención de los solutos. Los grupos hidroxilo interaccionan con las especies polares por medio de enlaces de hidrógeno o interacciones dipolares. Esta interacción involucra una competencia entre las moléculas de la fase móvil y las moléculas del soluto por los sitios de adsorción disponibles sobre la superficie del empaque de la columna. Dicha competencia es la que proporciona la fuerza motriz y la selectividad en las separaciones.

#### 2.1.3.2 Cromatografía de Reparto

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. La cromatografía de reparto puede subdividirse en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fases enlazadas (SKOOG, 2001, p. 800).

A continuación se describirán brevemente ambos tipo de cromatografía.



## **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO-LÍQUIDO**

(YOST, 1981, p. 74-76)

La clásica cromatografía líquido-líquido implica el reparto de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil también líquida. La separación tiene lugar debido a las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en ambas fases líquidas. La fase estacionaria líquida se encuentra recubriendo las partículas de un soporte sólido.

Los dos líquidos empleados como fase móvil y fase estacionaria deben de ser inmiscibles y cada uno de ellos debe de estar saturado con respecto al otro. Los líquidos que sean prácticamente inmiscibles entre ellos, normalmente presentarán alguna solubilidad mutua por mínima que sea, esto puede ocasionar un gradual arrastre de la fase estacionaria al exterior de la columna lo que ocasionará una pérdida del poder de separación. Además, la presencia de fase estacionaria en el eluyente puede interferir con la detección y puede contaminar las fracciones recogidas. Por otro lado, si la muestra es demasiado soluble en la fase estacionaria y muy poco soluble en la fase móvil puede no eluirse de la columna.

Debido a los inconvenientes antes mencionados, en la actualidad se prefiere emplear la cromatografía con fase enlazada.

## **CROMATOGRAFÍA CON FASE ENLAZADA**

La diferencia entre la cromatografía líquido-líquido y la cromatografía con fases enlazadas radica en la forma en como se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En la cromatografía líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En la cromatografía de fase enlazada, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte (SKOOG, 2001, p. 746).

Las fases enlazadas se preparan mediante reacciones de los grupos Si-OH situados en la superficie de las partículas del soporte con diversos reactivos (YOST, 1981, p. 76).

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto:

### **a) Cromatografía en fase normal**

En donde la fase estacionaria es de elevada polaridad y la fase móvil es un líquido no polar. El componente menos polar eluye primero debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil, un aumento en la polaridad de la fase móvil provoca la disminución del tiempo de elución.

### **b) Cromatografía en fase reversa**

La fase estacionaria es no polar y la fase móvil es relativamente polar. Los componentes más polares eluyen primero; al aumentar la polaridad de la fase móvil, el tiempo de elución también aumenta.

En la cromatografía de fase enlazada, los rellenos pueden también ser clasificados como de fase normal y fase reversa. Cuando el recubrimiento unido químicamente posee un carácter polar, la fase enlazada se denomina de fase normal. Por el contrario, cuando el recubrimiento posee grupos funcionales no polares, la fase enlazada se denomina de fase reversa (SKOOG, 2001, p. 801).

En la tabla 2.2 se mencionan algunos de tipos de relleno de fase enlazada así como también algunas de sus aplicaciones más comunes (QUATTROCHI, 1992, p 105), (KIUPEC, 2004, p. 505).



TABLA 2.2. Tipos de Relleno de Fase Enlazada y Aplicaciones.

MODIFICACIÓN	GRUPO LIGADO	TIPO DE FASE	APLICACIONES	
C1 C2 C4 C6	-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	metil etil butil hexil	Reversa	Compuestos fuertemente retenidos en columna C18. Análisis de péptidos y proteínas.
C8	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	octil	Reversa	Compuestos fuertemente retenidos en columna C18.
C18	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>	octadecil	Reversa	Empleo general.
FENIL	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Phe	fenilpropil	Normal y Reversa	Compuestos moderadamente polares. Retención similar a C8 pero mejor selectividad para compuestos aromáticos. Separación de mezclas complejas.
CIANO	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN	cianopropil	Normal y Reversa	Rápida separación de mezclas de componentes de diversa naturaleza.
NITRO	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Phe-NO <sub>2</sub>	nitrofenilpropil	Normal y Reversa	Separación de compuestos aromáticos.
AMINO	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	aminopropil	Normal y Reversa	Separación de proteínas. Retención selectiva de compuestos aromáticos. Intercambiador aniónico débil.
DIOL	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -O-CH-CH <sub>2</sub> OH OH	diol	Normal y Reversa	Separación de mezclas complejas con compuestos de polaridades diferentes.
N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	WAX	Normal	Intercambiador aniónico débil
-SO <sub>3</sub> Na	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Phe-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SCX	Normal	Intercambiador catiónico fuerte
-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Phe.NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	SAX	Normal	Intercambiador aniónico fuerte
-COONa	-COO <sup>-</sup>	WCX	Normal	Intercambiador catiónico débil

### CROMATOGRAFÍA DE PARES DE IONES

La cromatografía de par iónico es considerada un subconjunto de la cromatografía de reparto de fase reversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de par iónico la fase móvil está constituida por una disolución reguladora acuosa que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un *contraion* de carga opuesta al analito. Un *contraion* es un ion que se une con el ion del analito para formar una *pareja de iones*. El resultado es una especie neutra que puede ser más fácilmente retenida por el relleno de fase reversa. La elución de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol u otro disolvente orgánico soluble en agua (SKOOG, 2001, p. 808-809).

#### 2.1.3.3 Cromatografía de Intercambio Iónico

(YOST, 1981, p. 112-113)

La cromatografía de intercambio iónico se emplea para analizar y separar compuestos iónicos mediante el uso de resinas intercambiadoras de iones como fase estacionaria. Estas resinas están formadas por materiales que poseen exceso de cargas eléctricas positivas o negativas unidas permanentemente a la superficie de la partícula de



resina por medio de enlaces químicos, compensadas mediante un número igual de iones libres de carga opuesta (contraiones). Al eluir una disolución que contenga nuevos iones del mismo signo que los contraiones de la resina, los nuevos contraiones del eluyente podrán desplazar a los anteriores, ocupando su lugar y compensando las cargas de signo contrario de la superficie de la resina. De la misma manera, la elución de una muestra que contenga moléculas cargadas podrá producir el mismo efecto, pudiendo desplazar a los contraiones que en ese momento se hallen presentes. La conservación de la neutralidad exige que el número de contraiones desplazados y el de iones desplazantes de la muestra sean estequiométricamente equivalentes. Por lo tanto, una muestra cargada fuertemente en un eluyente con carga débil quedará adherida a la columna sin que los iones débiles del eluyente logren desplazar a los iones más fuertes de la muestra. Contrariamente, una muestra con carga débil no logrará desplazar a los contraiones que el eluyente haya introducido en la superficie de la columna si se trata de un eluyente iónico fuerte y por lo tanto la muestra no será retenida por la columna en eluyentes iónicos fuertes.

#### *2.1.3.4 Cromatografía de Exclusión*

La cromatografía de exclusión es una técnica analítica por medio de la cual los componentes de una muestra se separan de acuerdo al tamaño de sus moléculas (YOST, 1981, p. 96).

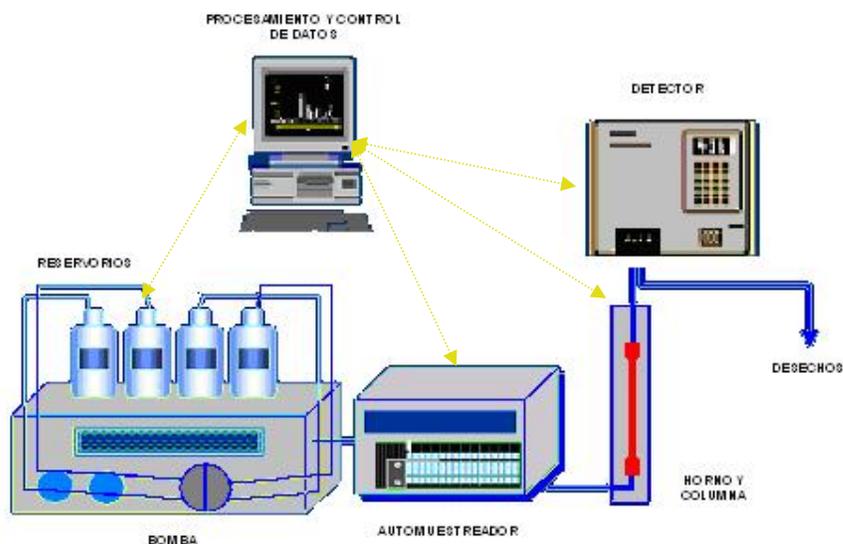
Los rellenos para la cromatografía de exclusión están constituidos por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas de soluto y del disolvente. En los poros, las moléculas son atrapadas y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia en los poros depende del tamaño de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y de esta manera, no son retenidas y por lo tanto son las primeras en eluir. Las moléculas que poseen diámetros significativamente menores que los poros, penetran a través del laberinto de los poros y así resultan atrapadas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, se encuentran las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro; dentro de este grupo tiene lugar el fraccionamiento, el cual está directamente relacionado con el tamaño y forma molecular. Las separaciones cromatográficas por exclusión, a diferencia de los descritos anteriormente, no implican una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria (SKOOG, 2001, p. 765-766).

#### **2.1.4 Instrumentación para CLAR**

La figura 2.4 representa un esquema general de la instrumentación básica para CLAR. Los componentes básicos de dicho equipo son:

1. Reservorio para fase móvil.
2. Sistema de bombeo para propulsar la fase móvil.
3. Un mecanismo para introducir la muestra.
4. Un manómetro para medir la presión de entrada a la columna.
5. Una columna que contenga la fase estacionaria en la cual se llevará a cabo la separación de la muestra.
6. Un detector para determinar la separación que tiene lugar y que además proporcione datos que permitan una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados (YOST, 1981, p. 17-18).





**FIGURA 2.4. Instrumentación Empleada en CLAR**

#### 2.1.4.1 Reservorio para Fase Móvil

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Los reservorios deben de colocarse algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija al disolvente hacia la bomba manteniendo llenas las conexiones. Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de vidrio, de acero inoxidable o de algún polímero resistente con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas extrañas. Al extremo del tubo de salida del disolvente debe de conectarse un filtro de acero que impida el ingreso de partículas a la bomba. La capacidad del reservorio depende del consumo esperado de fase móvil (QUATTROCCHI, 1992, p. 11). Los recipientes que sirven como reservorios pueden equiparse con un sistema para eliminar los gases disueltos, generalmente oxígeno y nitrógeno, que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o un sistema de difusión que permita arrastrar los gases disueltos fuera de la fase móvil mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Frecuentemente, estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración de polvo y de partículas sólidas en suspensión de los disolventes. Los desgasificadores y filtros no necesariamente forman parte del sistema de CLAR, en estos casos es conveniente filtrar la fase móvil a través de membranas especiales mediante vacío, de esta manera se lograra eliminar tanto gases como materia en suspensión (SKOOG, 2001, p. 789).



#### 2.1.4.2 *Sistemas de Bombeo*

Las bombas se encargan de impulsar a la fase móvil proveniente del reservorio de disolvente hacia el inyector y posteriormente a la columna. Los requisitos deseables en un sistema de bombeo son los siguientes (SNYDER, 1979, p. 91), (SKOOG, 2001, p. 790), (QUATTROCCHI, 1992, p. 5-6):

1. Materiales resistentes a la corrosión y al desgaste mecánico.
2. Generación de presiones por encima de 6000 psi.
3. Flujo libre de pulsos.
4. Intervalo de flujo de 0.1 a 10 mL/min.
5. Regulador del flujo y una reproducibilidad del mismo menor al 0.5% relativo.
6. Exactitud en la entrega de flujo.
7. Volúmenes muertos pequeños para proporcionar cambios rápidos de disolventes.

Existen tres tipos fundamentales de bombas: bombas reciprocantes, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

#### 2.1.4.3 *Inyectores*

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo de la fase móvil a través del sistema. Las características que debe reunir un inyector son las siguientes (SNYDER, 1979, p. 111), (QUATTROCCHI, 1992, p. 23):

1. Inserción de la muestra en la columna en forma de pulso fino para evitar ensanchamiento del pico.
2. No debe presentar volumen muerto.
3. Ser inerte y capaz de soportar altas presiones.
4. Ser reproducibles en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

Existen tres principales tipos de inyectores:

- Válvulas y lazos (o bucles) de muestreo.
- Inyectores de flujo suspendido.
- Inyectores con jeringa.

#### 2.1.4.4 *Detectores*

El detector es la parte del equipo cromatográfico que nos permite ubicar la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. No existe un detector universal en HPLC, sin embargo, a continuación se describen las características deseables de un detector (SNYDER, 1979, p. 126), (QUATTROCCHI, 1992, p. 26-27), (WILLARD, 1991, p. 710):

1. Sensibilidad apropiada.
2. Respuesta a todos los analitos o una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.



3. Poseer una amplia respuesta lineal.
4. No debe de ser afectado por cambios en la temperatura ni por el cambio de flujo de la fase móvil.
5. No debe contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
6. No debe de destruir la muestra.
7. Tiempo de respuesta corto.
8. Reproducible.

Es necesario seleccionar el sistema de detección en base al problema que se desea resolver. Los detectores empleados en cromatografía de líquidos se clasifican en dos tipos (SNYDER, 1979, p. 127):

- a) *Los detectores generales o de granel.* Miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Este tipo de detectores está representado por el detector de índice de refracción.
- b) *Los detectores selectivos o de soluto.* Son aquellos que responden a una propiedad física del soluto que no presenta la fase móvil pura.

## **DETECTORES GENERALES**

### **a) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN**

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra. Es un detector universal y no destructivo. Es vulnerable a los cambios de temperatura. No puede utilizarse con programación de disolventes debido a que el cambio de la composición de la fase móvil va acompañado del cambio de su índice de refracción y por lo tanto no podría estabilizarse la línea base. Existen tres diferentes detectores de índice de refracción: Fresnel, Deflexión e Interferométrico (QUATTROCCHI, 1992, p. 28).

## **DETECTORES SELECTIVOS**

### **a) DETECTOR UV**

Los detectores basados en la absorción de luz visible-ultravioleta son prácticamente insensibles a las variaciones de temperatura del líquido de prueba. Es un detector no destructivo y puede emplearse con gradientes. La concentración del analito en la muestra se determina por la aplicación de la ley de Beer. Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable (QUATTROCCHI, 1992, p. 29-30).

Un detector de longitud de onda variable ofrece un intervalo de longitudes de onda que va de 190 a 600 nm, lo que permite elegir una longitud de onda donde la absorbancia absoluta sea máxima. Es posible seleccionar una longitud de onda que suprima la absorción de un soluto interferente o de la fase móvil en donde el soluto tenga alguna absorbancia. Con este tipo de detectores es posible evaluar la pureza de un pico cromatográfico (WILLARD, 1991, p. 595-596).



### **b) DETECTOR DE FLUORESCENCIA**

(SHELLY, 1983, p 88-89)

Los detectores de fluorescencia son los más sensibles y específicos de todos los detectores ópticos, debido a esto, los detectores de fluorescencia se emplean ventajosamente en la determinación de especies con fluorescencia específica en muestras complejas.

La fluorescencia tiene lugar cuando los compuestos que poseen grupos funcionales específicos son excitados por medio de energía a determinadas longitudes de onda, como resultado, las moléculas excitadas emiten radiación a una longitud de onda mayor.

La fluorescencia es un medio de incrementar tanto la sensibilidad como la selectividad de un análisis por HPLC.

La sensibilidad se mejora porque la señal fluorescente se mide contra un fondo de baja intensidad, suponiendo que la fase móvil no presenta fluorescencia. La detección mediante fluorescencia puede llegar a ser de 100 a 1000 veces más sensible que por absorbancia.

La selectividad se debe a dos factores:

- a) No todos los compuestos que absorben radiación fluorescen y a pesar de que los compuestos que no presentan fluorescencia nativa pueden derivatizarse con reactivos específicos para formar compuestos fluorescentes, esto implica la presencia de un grupo funcional que pueda ser derivatizado.
- b) El empleo de dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una determinada longitud de onda, varios componentes de la muestra podrían absorber energía, sin embargo, pocos emitirán a la misma longitud de onda elegida.

El detector de fluorescencia no es de uso general y puede emplearse con gradientes.

### **c) DETECTOR ELECTROQUÍMICO**

Este tipo de detectores se basan en la oxidación o reducción del compuesto eluido en un electrodo adecuado, midiéndose la corriente resultante. La fase móvil debe de ser conductora de electricidad lo cual se consigue mediante la adición de alguna sal adecuada, esto limita su aplicación en el uso de fases móviles no polares. Este tipo de detectores son altamente sensibles y específicos debido a que las muestras deben de ser oxidables o reducibles a un potencial que no de lugar a la electrólisis de la fase móvil o de los demás componentes de la muestra a analizar. Se pueden emplear sistemas de gradiente. Las aminas aromáticas y los compuestos fenólicos son las clases de compuestos de mayor importancia a la que se les ha aplicado un sistema de detección electroquímica (YOST, 1981, p. 208-209).

### **d) REFRACTÓMETROS DIFERENCIALES**

Este tipo de detectores pueden considerarse universales, a excepción de los compuestos que posean el mismo índice de refracción que la fase móvil. Las limitaciones de los refractómetros diferenciales son su poca sensibilidad, la falta de selectividad y su extrema sensibilidad a los cambios de flujo y temperatura. El uso de gradientes queda restringido a unos pocos pares de disolventes que deben tener prácticamente el mismo índice de refracción (WILLARD, 1991, p. 597).



### **c) DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTOMETRÍA DE MASAS**

El espectrómetro de masas es probablemente el detector ideal para cromatografía líquida ya que es capaz de proporcionar tanto información estructural, como análisis cuantitativo de los compuestos separados (WILLARD, 1991, p. 597).

El problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes relativamente grandes de disolvente empleados en la primera y los requerimientos de vacío de la última (SKOOG, 2001, p. 799). Otro problema es la dificultad de vaporizar moléculas no volátiles y térmicamente lábiles sin degradarlas excesivamente (WILLARD, 1991, p. 597).



## 2.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

El procesamiento de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis, en especial cuando se requiere la cuantificación de pequeñas cantidades de un compuesto en particular y cuando la matriz que rodea al analito es muy compleja. Tal es el caso de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

Para seleccionar el método de procesamiento más apropiado, es necesario considerar diversos factores como los que a continuación se mencionan:

- a) Propiedades físico-químicas del analito
- b) Concentración del analito en la muestra
- c) Naturaleza de la matriz de la muestra
- d) Forma en la que se presenta el analito en la muestra
- e) Compatibilidad entre el disolvente de inyección final y el sistema cromatográfico
- f) Tipo de detector y su compatibilidad con la muestra

Los fluidos biológicos son una mezcla muy compleja de compuestos de diversa naturaleza. A continuación se describen brevemente las características de los fluidos biológicos analizados con mayor frecuencia.

### 2.2.1 Propiedades de los Fluidos Biológicos

#### 2.2.1.1 Sangre

(NELSON, 2005, p. 900-901)

La sangre es el fluido biológico más complejo de los comúnmente analizados.

En promedio, un ser humano adulto medio posee entre 5 y 6 litros de sangre. La sangre presenta un pH estable de 7.36. Aproximadamente, el 50% de la sangre está constituido por tres diferentes tipos de células:

- Eritrocitos (glóbulos rojos). Cargadas de hemoglobina y especializadas en el transporte de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.
- Leucocitos (glóbulos blancos). Esenciales para el sistema inmune.
- Plaquetas. Participan en la coagulación sanguínea.

El otro 50% de la sangre está constituido por una parte líquida a la cual se le conoce como plasma.

#### 2.2.1.2 Plasma y Suero

El plasma está constituido por aproximadamente un 90% de agua y un 10% de solutos. La composición química del plasma es muy compleja; en él se encuentran disueltos o en suspensión una enorme y diversa cantidad de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabolitos, productos de desecho, iones inorgánicos y hormonas. Más de un 70% de los sólidos del plasma son proteínas plasmáticas. Las principales proteínas plasmáticas incluyen inmunoglobulinas, seroalbúmina, apolipoproteínas, transferrina y proteínas para la coagulación sanguínea como el fibrinógeno y la protombina (NELSON, 2005, p. 901).



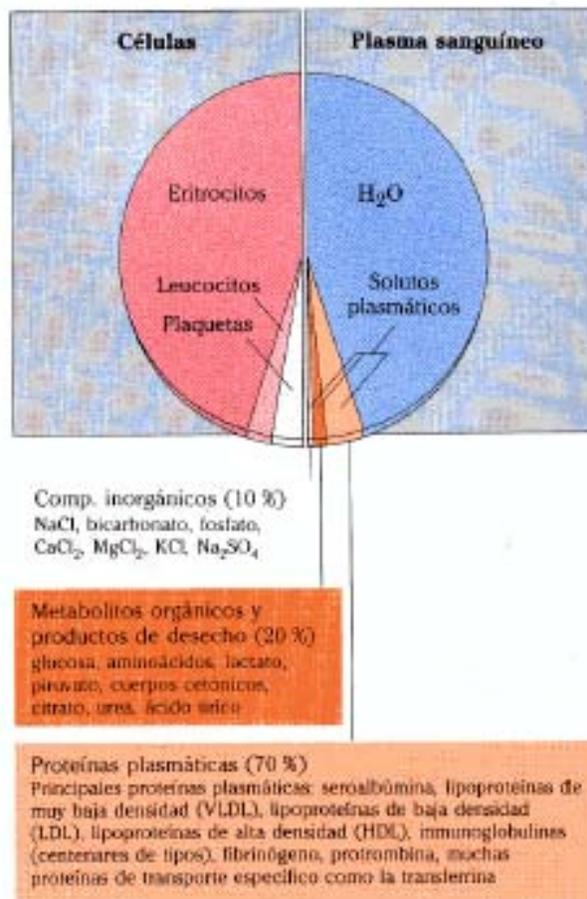
Los iones y los solutos de bajo peso molecular no son unos componentes fijos en el plasma sanguíneo, sin embargo, a pesar de que se hallan en continuo intercambio entre la sangre y los tejidos, algunos de ellos pueden encontrarse en concentraciones estables. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de iones como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen alrededor de 140, 5 y 2.5 mM respectivamente (NELSON, 2005, p. 901).

La concentración de la glucosa disuelta en plasma también se encuentra regulada. La concentración de la glucosa es de aproximadamente unos 80 mg/mL de sangre (4.5mM) (NELSON, 2005, p. 901).

A pesar de que el plasma presenta una composición muy compleja, ésta es sorprendentemente estable. El pH plasmático nunca se encuentra fuera del rango de 7.30 a 7.50, su contenido total de proteínas y sales también es estable. El contenido de lípidos puede variar considerablemente en función de los hábitos alimenticios de cada persona (CHAMBERLAIN, 1987, p 42).

La composición del suero es muy similar a la del plasma a diferencia de que el primero no contiene factores de coagulación.

La figura 2.5 ilustra de manera esquemática la composición de la sangre y plasma humanos.



**FIGURA 2.5. Componentes de la Sangre y Plasma Humanos**  
(NELSON, 2005, p. 901)



### 2.2.1.3 Orina

(CHAMBERLAIN, 1987, p 43-45)

La orina, a diferencia del suero y el plasma, se encuentra generalmente libre de lípidos y proteínas lo que facilita su limpieza. Los tipos de compuestos presentes en la orina son generalmente solubles en agua, considerando que muchos fármacos son hidrofóbicos, estos pueden extraerse fácilmente con algún disolvente orgánico.

El pH normal de la orina se encuentra en el rango de 5.5 a 7, este puede ser fácilmente modificado a causa de la dieta o por el uso de medicamentos. La orina posee una extensa variación en su composición, esto se debe principalmente a los hábitos alimenticios de cada persona.

Una de las principales dificultades en el análisis de orina es el volumen de muestra obtenido. Por un lado, si el volumen de orina es muy grande, el analito de interés puede encontrarse demasiado diluido y se corre el riesgo de no poder cuantificarlo. Mientras que por otro lado, la cantidad cuantificada del analito debe de ser multiplicada por el volumen de orina para lograr conocer su concentración en la muestra, esto puede llevar a cierto grado de error si el volumen de orina no fue medido con exactitud.

### 2.2.1.4 Saliva

(CHAMBERLAIN, 1987, p 46)

La saliva es un líquido transparente o translúcido de baja viscosidad. Una persona normal produce alrededor de 2 litros de saliva cada 24 horas a un flujo aproximado de 15 mL/hr. Cuando se requiere de un gran número de muestras, el proceso puede llegar a ser tedioso, sin embargo, las glándulas salivales pueden ser estimuladas masticando un material inerte como el parafilm o mediante el uso de ácido cítrico. El pH normal de la saliva obtenida mediante estimulación se encuentra entre 7.0 a 7.8.

El análisis de saliva puede reflejar los niveles sanguíneos de fármacos que no se unen a proteínas.

La saliva se encuentra relativamente libre de sustancias que puedan interferir con la cuantificación de analitos de interés los cuales pueden ser fácilmente extraídos con algún disolvente orgánico. Los métodos ya existentes para la cuantificación de fármacos en otros fluidos biológicos más complejos (plasma o suero), pueden ser fácilmente adaptados para su cuantificación en saliva.

### 2.2.1.5 Otros Fluidos Biológicos

Otros fluidos biológicos analizados con menor frecuencia son la leche materna, el líquido cefalorraquídeo, los líquidos biliares, el líquido sinovial y el humor acuoso. El análisis de este tipo de fluidos biológicos puede llevarse a cabo mediante la adaptación de algún método ya existente para la cuantificación del o los fármacos de interés en plasma o suero.



### 2.2.2 Técnicas Analíticas para el Procesamiento de Fluidos Biológicos

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a analizar. Para el tratamiento previo de las muestras podemos ayudarnos de todas las técnicas analíticas existentes.

Como hemos visto anteriormente, debido a la complejidad de la sangre, se prefiere analizar suero o plasma. La característica principal del plasma y el suero es la presencia de una gran cantidad de proteínas. A pesar de que las proteínas son muy diferentes tanto física como químicamente a los fármacos que comúnmente se desean cuantificar, puede llegar a existir una fuerte afinidad entre ellos y representar una dificultad en su análisis.

Las muestras a inyectar deben de estar libres de partículas en suspensión puesto que estas pueden rayar los sellos del inyector o bloquear algún componente del equipo cromatográfico, especialmente las tuberías y la columna. Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben de ser eliminadas antes de inyectar la muestra en el sistema cromatográfico, tanto para evitar los problemas antes mencionados así como también para eliminar la posible unión entre estas y el fármaco a cuantificar. A este proceso se le denomina desproteínización.

La desproteínización de las muestras puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas que se mencionan a continuación.

#### 2.2.2.1 Ultrafiltración

En la ultrafiltración se obliga a la muestra a pasar a través de una membrana semipermeable mediante presión. El disolvente y los solutos pequeños atraviesan la membrana dejando atrás a la disolución macromolecular más concentrada eliminando así una gran cantidad de proteínas y otros compuestos (VOET, 1992, p. 95). La ultrafiltración de las muestras se realiza en filtros desmontables o fijos que contienen membranas de un material apropiado.

Uno de los principales factores que se deben de contemplar al usar esta técnica es la posible adsorción del analito en las membranas, esto puede causar problemas en la recuperación absoluta del analito (recobro) e impactar en la precisión y exactitud del método (MÁRQUEZ, 1996, p. 58). Otro factor que debe evaluarse es si la membrana introduce señales adicionales en la solución por analizar.

El uso de esta técnica se recomienda en el análisis de fármacos que presentan una baja unión a proteínas.

#### 2.2.2.2 Precipitación

Los múltiples grupos ácido-base de una proteína determinan que sus propiedades de solubilidad dependan de diversos factores tales como la concentración de las sales disueltas, la polaridad del disolvente, el pH y la temperatura (VOET, 1992, p. 83).

##### a) Precipitación con sales (Salting-out)

La solubilidad de una proteína en disolución acuosa es una función sensible a las concentraciones de las sales disueltas (VOET, 1992, p. 83).



Cuando se agregan sales neutras en una matriz biológica, la atracción de las moléculas de las proteínas disminuye de tal manera que su solubilidad en agua aumenta, a este fenómeno se le conoce como *salting-in*. Si se continúan adicionando sales, éstas comienzan a competir con las moléculas de las proteínas por el agua logrando como resultado la precipitación de la proteína por deshidratación, a este fenómeno se le conoce como *salting-out* o precipitación por sales.

#### b) Precipitación con ácidos

Las proteínas son portadoras de diversos grupos ionizables que exhiben una amplia variedad de valores de pKa's. Ciertos ácidos pueden formar sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente induciendo así la precipitación de éstas (VOET, 1992, p. 85). Estos ácidos se agregan a la muestra en soluciones de baja concentración (10 a 20%), posteriormente la muestra se homogeniza y se centrifuga, el sobrenadante puede ser directamente inyectado en el sistema cromatográfico aunque debido a su elevada acidez, en ocasiones resulta conveniente neutralizar la solución antes de ser inyectada.

A pesar de que las soluciones cáusticas son igual de efectivas que las soluciones ácidas para la precipitación de proteínas, no son recomendadas debido a que son muy propensas a formar emulsiones. Los ácidos más comúnmente empleados incluyen al ácido tricloroacético, el ácido perclórico y el ácido tungsténico (CHAMBERLAIN, 1987, p. 40).

El principal problema que puede llegar a presentarse en la aplicación de este método es la inestabilidad de ciertos fármacos a bajos valores de pH.

#### c) Precipitación con disolventes orgánicos

En el análisis de fármacos inestables a pH's ácidos, la precipitación con disolventes orgánicos puede ser una buena opción.

Los disolventes orgánicos son generalmente buenos agentes precipitantes de proteínas debido a que por sus constantes dieléctricas pequeñas, provocan la disminución del poder de solvatación de sus disoluciones acuosas respecto a los iones disueltos, entre ellos los de las proteínas, de tal manera que su solubilidad se ve disminuida y así se induce su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del disolvente adicionado, mejor será su capacidad de desproteínización. La disminución de la constante dieléctrica debida a los disolventes orgánicos aumenta también las diferencias en el comportamiento de la precipitación por sales (*salting-out*), de modo que ambas técnicas pueden ser combinadas (VOET, 1992, p. 85).

Se recomienda emplear proporciones de 1.5 a 2 de disolvente orgánico con respecto al volumen de la muestra. Los disolventes orgánicos más empleados son el etanol, el metanol y el acetonitrilo (CHAMBERLAIN, 1987, p. 40).

El principal inconveniente en esta técnica puede llegar a ser la dilución del analito de interés en aquellos casos en que las concentraciones presentes de este sean demasiado pequeñas.

En la tabla 2.3 se presentan diversos métodos de tratamiento de muestras biológicas en base a la precipitación de proteínas empleando diferentes reactivos así como también algunas consideraciones generales para cada uno de ellos.



**TABLA 2.3. Técnicas Empleadas para la Precipitación de Proteínas.**

(CHAMBERLAIN, 1987, p. 41; QUATTROCHI, 1992. p. 209)

MÉTODO	COMENTARIO
Calentamiento a 90°C durante 5 a 15 minutos	Poca eficiencia Riesgo de descomposición del analito
Ciclos de congelación-descongelación	Poca eficiencia Consumo de tiempo elevado
Saturación con Sulfato de Amonio	Moderadamente eficiente Alta concentración de sales en el sobrenadante pH final cercano a 7.0
Sulfato de Zinc-Ácido Sulfosalicílico	Soluciones limpias Puede ser empleado en RIA
Sulfato de Zinc-Hidróxido de Sodio	Excelente eficiencia Precipitado fino con pH cercano a 7 Es conveniente trabajar a bajas temperaturas Se requiere de una proporción de 2.0 volúmenes de reactivo con respecto a la muestra
Ácido Metafosfórico	Excelente eficiencia Los reactivos necesitan ser almacenados en refrigeración Probable descomposición del analito debido al bajo pH (< 3)
Ácido Perclórico (6% p/v)	Excelente eficiencia Los reactivos necesitan ser almacenados en refrigeración, peligro de explosión Se requiere de una proporción de 0.8 volúmenes de reactivo con respecto a la muestra Probable descomposición del analito debido al bajo pH (< 3) Los compuestos básicos pueden ser extraídos con seguridad
Ácido Tricloroacético (10% p/v)	Buena eficiencia Los reactivos necesitan ser almacenados en refrigeración Se requiere una proporción de 0.2 volúmenes de reactivo con respecto a la muestra Dificultad para separar el reactivo del analito
Etanol Metanol	Se requieren una proporción de 2.0 volúmenes de disolvente con respecto a la muestra Recomendado para fármacos inestables a pH bajo
Acetonitrilo	Se requiere de una proporción de 1.5 volúmenes de disolvente con respecto a la muestra Adecuado para posterior análisis mediante HPLC
Cloruro de amonio	Ofrece mejores resultados que el Sulfato de Amonio y el Ácido túngstico para compuestos básicos

En general, el tratamiento de muestras mediante precipitación es una técnica muy sencilla, sin embargo, en ocasiones puede llegar a presentarse una pérdida del analito por adsorción de éste al precipitado. Este fenómeno puede provocar muchas variaciones en los ensayos debido a que el analito puede no ser recuperado de manera reproducible y también puede manifestarse en un recobro bajo (MÁRQUEZ, 1996, p. 58).



### 2.2.2.3 Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido es una técnica analítica que se basa en la transferencia de un soluto de un disolvente a otro en la cual el soluto se extrae mediante un proceso de distribución.

Cuando una solución (solute A en el disolvente 1) se pone en contacto con un segundo disolvente (disolvente 2) con el cual es inmisible, el soluto se distribuye entre las dos fases hasta lograr un equilibrio. Al separar las dos capas de disolventes inmiscibles se determina la concentración del soluto en cada disolvente, la relación de las concentraciones en cada fase es una constante K llamada coeficiente de distribución (o de partición) la cuál esta definida por la siguiente fórmula:

$$K = \frac{C_2}{C_1}$$

en donde C1 y C2 son las concentraciones en equilibrio del soluto en el disolvente 1 y en el disolvente 2, respectivamente, a una temperatura determinada (ÁVILA, 2001, p. 90-91).

Para este cálculo se asume que las variaciones en la concentración del analito no modifican de manera considerable la miscibilidad entre los dos disolventes empleados. El valor de K depende del tipo de disolvente orgánico a utilizar, de la temperatura y, en el caso de compuestos ionizables, del valor del pH del medio acuoso. Debido a que el valor de K es finito, en muchos casos es necesario favorecer el proceso de partición empleando grandes volúmenes del agente extractante o realizando varias extracciones de una misma muestra (QUATTROCHI, 1992, p. 209-210).

Durante el proceso de extracción líquido-líquido es importante considerar los siguientes factores:

#### - *Propiedades ácido-base del analito de interés*

Las sustancias neutras de características no polares pueden extraerse directamente desde medios acuosos a orgánicos. Las sustancias con características ionizables requieren de la supresión de su disociación mediante la modificación del valor de pH del medio, de tal manera que los compuestos ácidos se extraen después de una acidificación y los compuestos básicos se extraen después de una alcalinización.

#### - *Tiempo y velocidad de agitación*

El mezclado para la extracción se realiza por agitación de la muestra. La intensidad y la duración de la agitación influyen en el rendimiento de la extracción, por lo que se hace necesario establecer con exactitud estos parámetros para que la extracción se lleve a cabo de manera reproducible. En general, se prefiere una agitación suave para evitar la formación de emulsiones (MÁRQUEZ, 1996, p. 60).

#### - *Propiedades físico-químicas de los disolventes de extracción*

Los disolventes orgánicos utilizados en extracciones líquido-líquido deben tener baja solubilidad en agua, alta capacidad de solvatación hacia la sustancia que se va a extraer y un bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación posterior (ÁVILA, 2001, p. 90-91).

La extracción líquido-líquido, como toda técnica analítica, presenta ventajas y desventajas. Por un lado, se considera una técnica muy laboriosa y está expuesta a diversas complicaciones tales como la formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de disolventes tóxicos e inflamables, e incluso, algunas impurezas de



los disolventes de extracción pueden llegar a interferir con la determinación de los compuestos de interés de la muestra a analizar. Por otro lado, esta técnica nos ofrece la posibilidad de concentrar la cantidad del analito presente en la muestra; esto es de gran relevancia cuando las concentraciones del o los analitos de interés que se requieren cuantificar son muy bajas.

#### 2.2.2.4 Extracción en Fase Sólida

(MÁRQUEZ, 1996, p. 64-68)

Otra técnica para extraer solutos de muestras biológicas es mediante su adsorción selectiva sobre la superficie de partículas sólidas. La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de los cartuchos empleados.

La selección de las condiciones óptimas para la extracción depende de la naturaleza del analito de interés y de la matriz que lo rodea. A grandes rasgos, la metodología para una extracción en fase sólida consta de los siguientes pasos:

- Lavado y activación del cartucho. Esta operación tienen por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno del cartucho. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente “activados”.
- Aplicación de la muestra. La muestra se introduce en el cartucho relleno con partículas sólidas recubiertas de diversos materiales similares a los usados en la cromatografía de fase enlazada. Los analitos contenidos en el fluido biológico presentan una gran afinidad por la superficie del sólido siendo fuertemente adsorbido sobre la superficie del empaque del cartucho.
- Lavado del cartucho. Este paso se debe de realizar con disolventes cuya fuerza de elución sea suficiente para que los compuestos que puedan interferir sean eluidos del cartucho pero no así el analito.
- Elución del analito. Finalmente, el analito se eluye con un disolvente tal que posea la fuerza de elución apropiada y se colecta para su análisis posterior.

Como hemos visto anteriormente, las muestras biológicas contienen un gran número de compuestos endógenos que difieren ampliamente en su polaridad los cuales muestran una afinidad variable por los empaques sólidos no polares. Esto es muy importante para seleccionar la composición de los disolventes de lavado y de desadsorción a fin de lograr que el compuesto más polar de la matriz se eluya y el compuesto más lipofílico permanezca sobre el empaque sólido. Es necesario que la diferencia en la fuerza de elución de los disolventes de lavado y desadsorción sea lo más pequeña posible, de esta manera se puede colectar el analito de interés junto con algunos pocos componentes de la matriz biológica de polaridad similar.

Un aspecto importante que hay que considerar en esta técnica es el hecho de que la superficie de la fase sólida se modifica debido a la fuerza de adsorción de los compuestos presentes en la matriz biológica en una cantidad relativamente grande. En el caso del plasma, la superficie de la fase sólida puede llegar a saturarse con proteínas de tal modo que la adsorción del analito y los compuestos de la matriz ocurra sobre las proteínas adsorbidas como una especie de enlace entre ellos en vez de adsorberse en el empaque del cartucho. Esta es una situación indeseable puesto que la extracción dependerá de la cantidad de proteínas presentes en la muestra y del tipo de empaque sólido



empleado (diferentes marcas y lotes). Esto conlleva a obtener una recuperación no reproducible debido a que el enlace a las proteínas no puede ser controlado.

#### 2.2.2.5 *Cromatografía Bidimensional*

(MAJORS, 1996, p. 557-558)

El switching de columna o cromatografía bidimensional se basa en el uso de dos o más columnas para la separación de los componentes de una muestra. Las proteínas y muchos otros componentes que no son de interés, pasan a través de una columna de extracción hasta la línea de desechos permitiendo sólo el paso del compuesto de interés hacia la columna analítica. Las columnas son conectadas por medio de una válvula de cambio que controla el flujo y la dirección del disolvente.

Cuando la cromatografía bidimensional es utilizada para realizar la limpieza de la muestra se divide en cuatro etapas:

- Cargado de muestra. En esta etapa la muestra es introducida en la columna de extracción por el sistema de inyección.
- Lavado de muestra. Durante esta etapa, los componentes indeseables de la matriz se lavan de la columna de extracción y son enviados a desechos mientras que el analito es retenido. Es recomendable utilizar una fase móvil con bajo poder de elución para mantener al analito retenido.
- Elución. En esta etapa la válvula cambia de posición y el analito es enviado a la columna analítica mediante la acción de una fase móvil con mayor poder de elución. El tiempo empleado para esta etapa es crítico, ya que si es demasiado corto, el recobro será incompleto y si es demasiado largo, se corre el riesgo de introducir sustancias que afecten el desempeño de la columna analítica con el paso del tiempo.
- Equilibrio. En esta etapa la columna y la guarda columna son regresadas a las condiciones iniciales para su acondicionamiento.

La cromatografía bidimensional es una herramienta analítica que al ser implementada de manera adecuada, es capaz de reducir considerablemente los tiempos de procesamiento de muestra, además aumenta la precisión de los métodos, aprovechando la gran reproducibilidad de los sistemas de inyección actuales y minimizando la manipulación de la muestra.



## 2.3 MONOGRAFÍA DEL TARTRATO DE METOPROLOL

### 2.3.1 Descripción

#### NOMBRE

(LUCH, 1983, p. 326)

El Tartrato de Metoprolol es una sal compuesta por dos moléculas de Metoprolol y una molécula de Tartrato.

El Tartrato de Metoprolol ha sido descrito con los siguientes nombres químicos:

- 2-Propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[(1-metil)amino]-, (+)-, [R-(R\*, R\*)]-2,3-dihidroxiбутanodioato. Sal 2:1
- (+)-1-(Isopropilamino)-3-[p-(2-metoxietil)-penoxi]-2-propanol L-(+)-tartrato. Sal 2:1.
- 1-(Isopropilamino)-3-[p-(2-metoxietil)-fenoxi]-2-propanol. Sal 2:1 dextro-tartrato.

En el mercado mexicano se encuentran los siguientes nombres comerciales:

- Lopresor 100
- Seloken

De acuerdo a la Relación de Medicamentos de Referencia de la COFEPRIS (2008), el medicamento de referencia para el Tartrato de Metoprolol es el Lopresor 100.

#### FÓRMULA Y PESO MOLECULAR

(LUCH, 1983, p. 326)

$(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$

PM = 684.82 g/mol

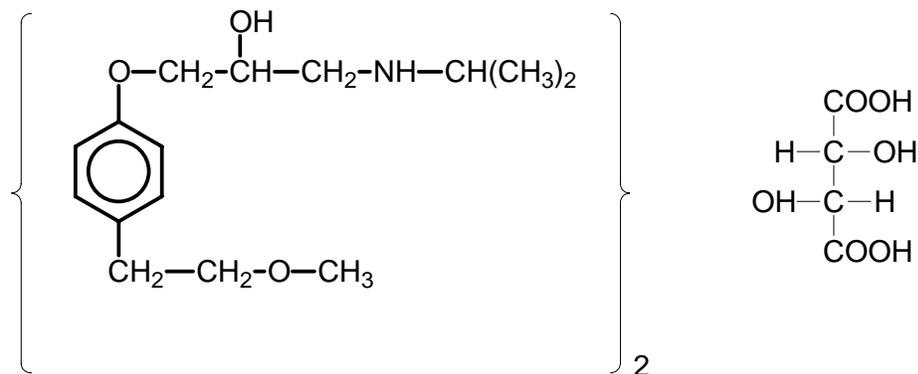


FIGURA 2.6. Estructura Molecular del Tartrato de Metoprolol

#### APARIENCIA, COLOR, OLOR

(LUCH, 1983, p. 326)

Cristales de color blanco inodoros.



### 2.3.2 Propiedades Físico-Químicas

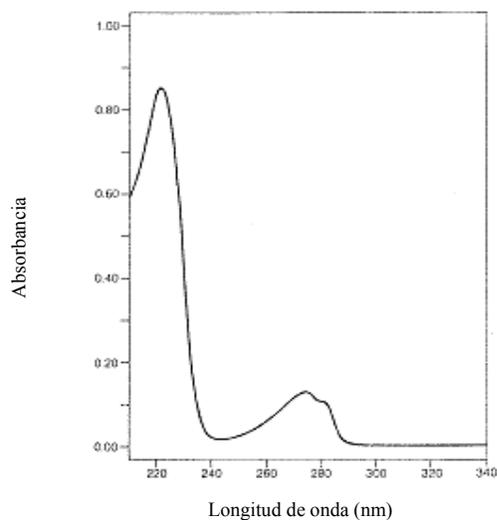
#### ESPECTRO DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA

Las longitudes de onda máximas para absorción ultravioleta y las absorptividades molares del Tartrato de Metoprolol en diversos disolventes se presentan en la tabla No. 2.4.

**TABLA 2.4. Longitudes de Onda de Máxima Absorción UV y Absortividades Molares del Tartrato de Metoprolol.**  
(LUCH, 1983, p. 328)

SOLVENTE	$\lambda_{\text{máx}}$	$\epsilon \times 10^{-3}$
Ácido clorhídrico 0.1 N	221	19.5
	274	2.83
	281 hombro	2.31
Agua	223	23.4
	274	3.6
	280 hombro	2.94
Hidróxido de sodio 0.01 N	223	24.0
	274	3.66
	280	3.00
Metanol	223	21.5
	276	3.11
	282	2.62
Cloroformo	277	3.36
	283	2.86

En la figura 2.7 se presenta un típico espectro de absorción UV del Tartrato de Metoprolol en una solución de ácido clorhídrico 0.1N.

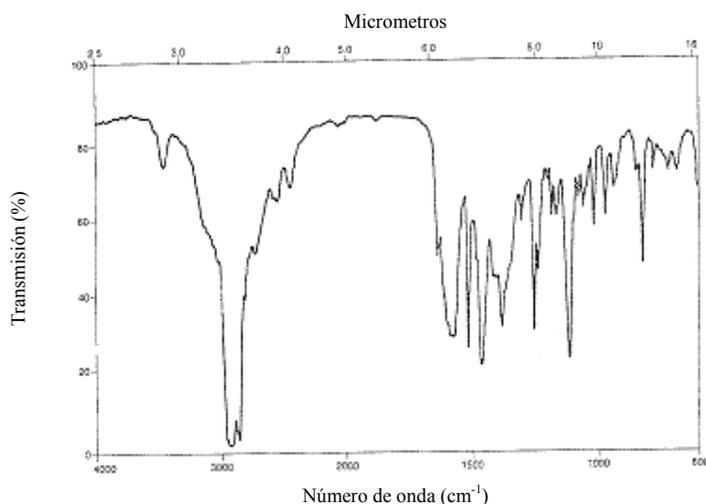


**FIGURA 2.7. Espectro de Absorción UV del Tartrato de Metoprolol en HCl 0.1N**  
(LUCH, 1983, p. 327)



### ESPECTRO DE ABSORCIÓN INFRARROJA

En la figura 2.8 se presenta el espectro de absorción infrarroja del Tartrato de Metoprolol.



**FIGURA 2.8. Espectro de Absorción Infrarrojo del Tartrato de Metoprolol**  
(LUCH, 1983, p. 329)

La asignación espectral para las principales bandas de absorción descritas en la tabla 2.5, son congruentes con la estructura del Tartrato de Metoprolol.

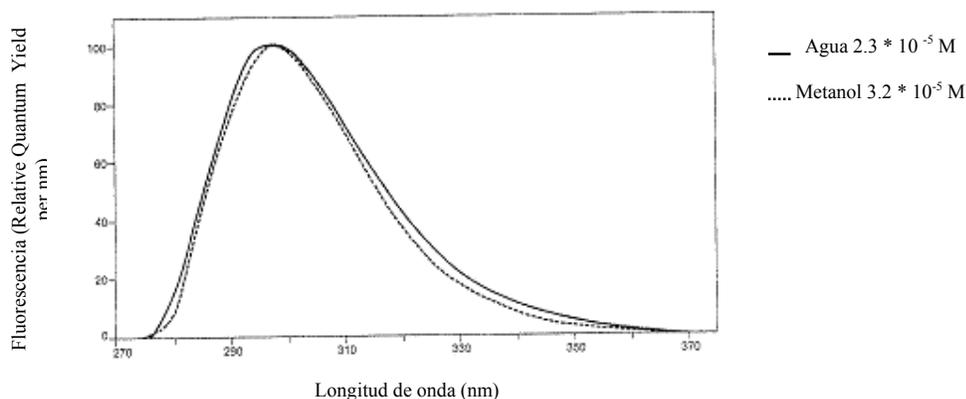
**TABLA 2.5. Asignación Espectral de las Principales Bandas de Absorción del Tartrato de Metoprolol.**  
(LUCH, 1983, p. 328)

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignaciones
3600-2300	+ -NH <sub>2</sub> , -OH, CH's aromáticos y alifáticos
1580	Sales de ácido carboxílico
1580,1515	Anillo aromático
1250,1015	Éter aromático
1180	Grupo isopropil
1100	Éter alifático, alcohol secundario
820	1,4-Benceno disustituido

### ESPECTRO DE FLUORESCENCIA

Las soluciones de Tartrato de Metoprolol en agua o en metanol, exhiben fluorescencia cuando es excitado con luz ultravioleta. La figura 2.9, muestra el espectro de emisión corregido del Tartrato de Metoprolol en agua y en metanol. El espectro fue obtenido usando una longitud de onda de excitación de 275 nm la cual corresponde al máximo del espectro de absorción (LUCH, 1983, p. 334).





**FIGURA 2.9. Espectro de Fluorescencia del Tartrato de Metoprolol**  
 (LUCH, 1983, p. 336)

### PUNTO DE FUSIÓN

(LUCH, 1983, p. 337)

El punto de fusión del Tartrato de Metoprolol reportado en la literatura es de 120-123°C.

### CONSTANTE DE DISOCIACIÓN

En la tabla 2.6 se muestran los datos de constantes de disociación obtenidos para la amina secundaria del Tartrato de Metoprolol.

**TABLA 2.6. Constantes de Disociación del Tartrato de Metoprolol.**  
 (LUCH, 1983, p. 339)

pKa	CONDICIONES
8.9 + 0.2	$8 \times 10^{-4}$ M en agua a 25°C
9.68 + 0.02	Fuerza iónica 0.1
9.5 + 0.2	

### SOLUBILIDAD

La solubilidad aproximada del Tartrato de Metoprolol en diversos disolventes se describe en la tabla 2.7. La solubilidad fue determinada después de agitar una suspensión saturada de Tartrato de Metoprolol durante 2 horas.

**TABLA 2.7. Solubilidad del Tartrato de Metoprolol.**  
 (LUCH, 1983, p. 339)

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg/mL)
Agua	> 1000
Metanol	> 500
Cloroformo	496
Acetona	1.1
Acetonitrilo	0.89
Hexano	0.001



## **ESTABILIDAD**

### **Estabilidad en el Estado Sólido**

(LUCH, 1983, p. 342)

El Tartrato de Metoprolol almacenado a temperatura ambiente y a 35°C durante 5 años ha demostrado ser física y químicamente estable. Después de un almacenamiento a 50°C durante 30 meses no se observó degradación alguna, a pesar de volverse opalescente. Bajo condiciones de alta humedad (>70% H.R.) se observa que el Tartrato de Metoprolol es higroscópico; sin embargo, después de un periodo de secado y su posterior análisis, se observa que el compuesto retiene su integridad física y química.

### **Estabilidad en Solución**

(LUCH, 1983, p. 342)

No se observa cambio químico en soluciones de Tartrato de Metoprolol amortiguadas a pH's de 4, 7 y 9 almacenadas a 60°C durante 10 días. Soluciones de Tartrato de Metoprolol preparadas en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 0.1N, fueron sometidas a reflujo durante 20 horas sin evidencia de cambio químico. Soluciones acuosas de Tartrato de Metoprolol a una concentración de 1 mg/mL con cloruro de sodio al 0.9%, contenidas en ampollitas, no han demostrado evidencia de alteraciones químicas después de permanecer almacenadas durante 77 meses a 50°C y a temperatura ambiente.

### **2.3.3 Propiedades Farmacológicas**

## **FARMACOCINÉTICA**

(PLM, 2005, p. 2055)

El metoprolol se absorbe completamente tras la administración oral.

Más del 95% de una dosis oral se detecta en forma de Metoprolol y de sus metabolitos en la orina.

Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de hora y media a dos horas aproximadamente con las grageas de liberación prolongada. Debido al efecto de primer paso, alrededor del 50% de una dosis simple oral de metoprolol alcanza la circulación sistémica. Si se repite la dosis, el porcentaje de la dosis disponible sistémicamente es mayor que con una dosis simple, y se eleva también en función de la dosis. La disponibilidad sistémica de cada dosis simple oral puede aumentar en 20-40% aproximadamente, si se administra junto con alimentos. Aunque la variabilidad interindividual es grande, los perfiles del nivel plasmático pueden reproducirse bien en cada individuo.

En estudios de farmacocinética realizados por YUEN y colaboradores, se reporta un intervalo de  $C_{m\acute{a}x}$  entre 68.7 a 344.3 ng/mL (1996, p. 332; 1998, p. 957).

Menos del 5% de la dosis se excreta en forma inalterada en la orina de la mayoría de los sujetos. Los pobres hidroxiladores pueden excretar 30% en forma inalterada.

La vida media de eliminación promedio es de unas tres horas y media (extremos: una y nueve horas). El aclaramiento sistémico de una dosis intravenosa es de 1 litro/min aproximadamente y la fijación protéica se eleva



entre un 8 y 10% (Clarke's, 2004, p. 1276). Las concentraciones plasmáticas del Metoprolol en personas de edad avanzada no son significativamente diferentes de las de los jóvenes.

La insuficiencia renal apenas influye en la biodisponibilidad de la tasa de eliminación de Metoprolol, sin embargo, disminuye la excreción de los metabolitos. Se ha observado una acumulación significativa de metabolitos en los pacientes con una tasa de filtración glomerular de unos 5 mL/min aproximadamente, pero la acumulación de los metabolitos no disminuye las propiedades betabloqueadoras de metoprolol. La cirrosis hepática puede incrementar la biodisponibilidad del metoprolol inalterado y reducir el aclaramiento total. Los pacientes con anastomosis portocava tenían un aclaramiento total de 0.3 litros/min aproximadamente y los valores ABC hasta seis veces mayores que los sujetos sanos.

#### **2.3.4 Métodos Analíticos Reportados para la Cuantificación de Metoprolol en Fluidos Biológicos mediante CLAR**

En la tabla. 2.8 se resumen algunos de los métodos analíticos reportados en la literatura para la cuantificación del Tartrato de Metoprolol en fluidos biológicos.



**TABLA 2.8. Métodos Analíticos Reportados en la Literatura para Cuantificar Metoprolol en Fluidos Biológicos Mediante CLAR.**

COLUMNA	FASE MÓVIL FLUJO	DETECCIÓN	INTERVALO	ESTÁNDAR INTERNO	MATRIZ BIOLÓGICA	TRATAMIENTO DE MUESTRAS	REFERENCIA
Método 1: Hypersil 5-ODS 10cm* 5 mm 5 µm  Método 2: Spherisorb Fenil 5 µm	Método 1: Mezcla de agua- acetonitrilo (80:20) conteniendo trietilamina al 1% y pH = 3.0 ajustado con ácido ortofosfórico Flujo = 2.0 mL/min  Método 2: Mezcla de agua- metanol (55:45) conteniendo heptanosulfonato de sodio 5mM y 0.1% de ácido acético (w/v) Flujo = 2.0 mL/min	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 222 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = 320 \text{ nm}$	10-400 ng/mL	clorhidrato de 1-(4- butiramido-2-butiril- fenoxi)-2-hidróxi-3- isopropilaminopropano	Método 1: Plasma        Método 2: Orina	Método 1: Volumen de muestra = 1.0 mL Extracción líquido-líquido con diclorometano en medio básico      Método 2: Volumen de muestra = 1.0 mL Extracción líquido-líquido con diclorometano y carbonato de sodio (0.5M)	LENNARD, 1983.
µBondapak C <sub>18</sub> 30*3.9 mm 10 µm	Mezcla de 150 mL de acetonitrilo, 300 mL de metanol y 550 mL de agua pH de la mezcla = 3.0 ajustado con ácido fosfórico Flujo = 2.0 mL/min	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 275 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = 300 \text{ nm}$	5-500 ng/mL	Alprenolol	Plasma	Volumen de muestra = 1.0 mL Extracción líquido-líquido con <i>n</i> -butil cloruro en medio básico y posterior neutralización con ácido sulfúrico  Recobro promedio = 74 %	JOHNSTON, 1983
LiChrosorb RP-8 25cm* 4.7mm 5 µm Temp = 50°C	Mezcla de solución amortiguadora de acetatos (0.008M de acetato de sodio más 0.08 M de ácido acético) con acetonitrilo (75:25) Flujo = 1.2 mL/min	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 225 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = >320 \text{ nm}$	36.5-1462 pmol	Alprenolol	Plasma	Volumen de muestra = 1.0 mL Extracción líquido-líquido con una mezcla de diétil éter y diclorometano (4:1) en medio básico y posterior neutralización con ácido sulfúrico  Recobro promedio = 98 %	LECAILLON, 1984

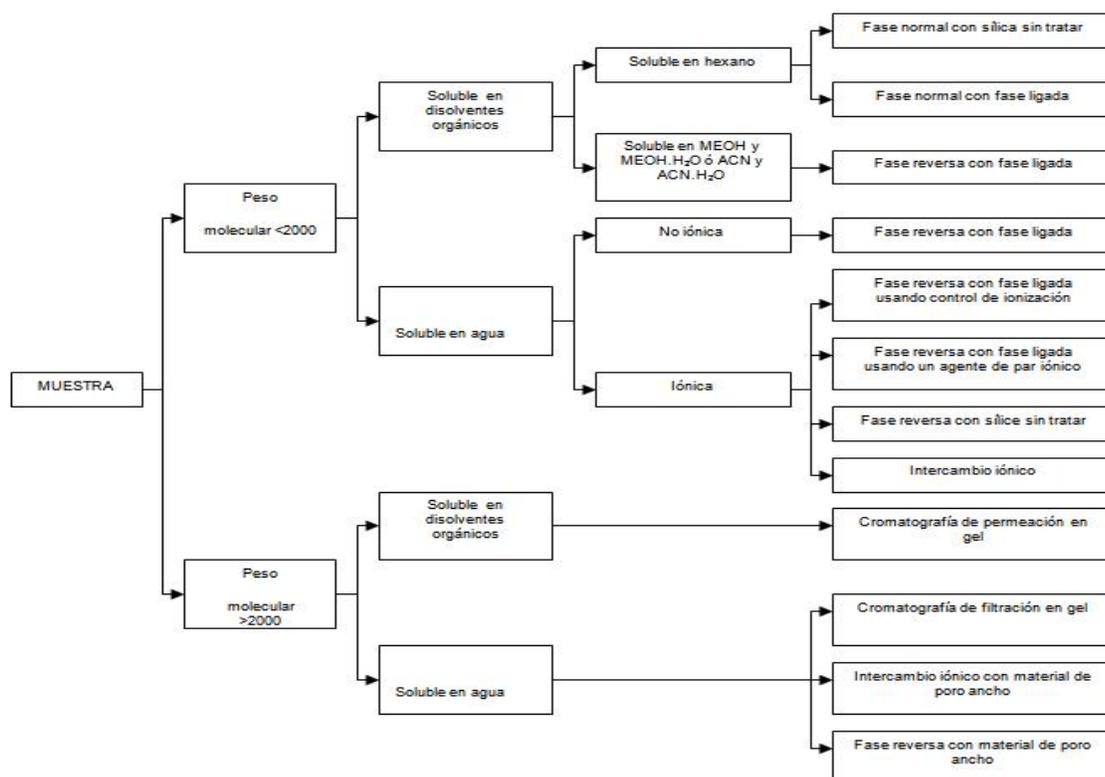
TABLA 2.8. Métodos Analíticos Reportados en la Literatura para Cuantificar Metoprolol en Fluidos Biológicos Mediante CLAR (continuación).

COLUMNA	FASE MÓVIL FLUJO	DETECCIÓN	INTERVALO	ESTÁNDAR INTERNO	MATRIZ BIOLÓGICA	TRATAMIENTO DE MUESTRAS	REFERENCIA
Columna C18 3.9mm*30cm	Mezcla de disolventes A y B (50:50) Flujo: 2 mL/min Disolvente A: 25 mL de heptanosulfonato de sodio 0.005M en 1L de ácido acético al 1.0% Disolvente B: 25 mL de heptanosulfonato de sodio 0.005M diluido en 1L de acetonitrilo	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 230 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = 300 \text{ nm}$ Atenuación = 0.02	5 - 600 ng/mL	Pronetalol	Suero Orina Líquido Cefalorraquídeo	Volumen de muestra = 1 mL Precipitación con ácido tricloroacético al 30% seguida por una extracción líquido- líquido con diclorometano en medio básico.  Recobro promedio = 80%	GENGO, 1984.
LiChrosorb Si-60 125*4 mm 5 $\mu\text{m}$	Mezcla de acetonitrilo, agua y solución amortiguadora de fosfato de amonio 1M pH= 4.0 (5:90:5)  Flujo = 1.0 mL/min	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 225 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = 300 \text{ nm}$	25-400 ng/mL	Atenolol	Plasma	Volumen de muestra = 0.5 mL Extracción líquido líquido con diclorometano en medio básico seguida de otra extracción líquido-líquido con <i>n</i> -hexano  Recobro promedio = 84.7 %	YUEN, 1996.
Novapak C <sub>18</sub> 100*5 mm 4 $\mu\text{m}$	Mezcla de acetonitrilo, metanol y solución amortiguadora de fosfatos y trietilamina (solución al 0.5% de trietilamina ajustada a pH de 3.0 con ácido fosfórico) (9:1:90, v/v) Flujo = 1.4 mL/min	Fluorescencia $\lambda_{excitación} = 229 \text{ nm}$ $\lambda_{emisión} = 309 \text{ nm}$	0.25-4.0 $\mu\text{g/mL}$	Sulfato de Guanoxan	Orina	Volumen de muestra = 100 $\mu\text{L}$ Extracción en fase sólida empleando cartuchos C <sub>18</sub>  Recobro promedio = 85%	CHIU, 1997.

## 2.4 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Cuando se emplea la técnica de CLAR para la cuantificación de un fármaco se debe comenzar por definir el tipo de cromatografía que se va a emplear y por consiguiente el tipo de columna cromatográfica. Esto depende no solo de las características fisicoquímicas del analito sino también de la naturaleza de la matriz biológica.

La figura 2.10 muestra una guía para seleccionar la técnica cromatográfica adecuada de acuerdo a la naturaleza de la muestra.



**FIGURA 2.10. Selección de Técnicas Cromatográficas**  
(BIDLINGMEYER, 1992 p. 109)

En general, cuando la muestra es soluble en agua y los pesos moleculares son menores a 2000 daltons, las técnicas cromatográficas recomendadas son las siguientes:



- Fase reversa con fase ligada utilizando control de la ionización
- Fase reversa con fase ligada utilizando un agente de par iónico
- Fase reversa con sílice sin tratar
- Intercambio iónico

Las ramas de la cromatografía y los métodos de cromatografía líquida se describieron brevemente en el punto 2.1. Con la finalidad de ayudar a comprender los sistemas cromatográficos evaluados durante la etapa de desarrollo del método analítico del presente trabajo, a continuación se establecen algunas recomendaciones y pasos a seguir durante el desarrollo de un método analítico mediante las técnicas cromatográficas de “Fase reversa con fase ligada utilizando control de la ionización” y “Fase reversa con fase ligada utilizando un agente de par iónico”.

#### **2.4.1 Cromatografía de Fase Reversa con Fase Ligada y control de la Ionización**

Una buena selección inicial de fase ligada es C18 o C8, si los solutos de la muestra no se separan adecuadamente en éstas, se pueden emplear columnas CN y Fenilo. Estas pueden ofrecer diferencias significativas en cuanto a selectividad frente a las fases alquílicas lineales durante la separación. (BIDLINGMEYER, 1992 p. 109)

La selección de la fase móvil para un sistema de fase reversa comienza con la elección del modificador orgánico. El metanol y el acetonitrilo son los disolventes más populares debido a su baja viscosidad y grado de pureza, sin embargo, las diferencias de selectividad y la retención de la muestra pueden llegar a variar significativamente entre las fases móviles que contienen acetonitrilo o metanol. La solubilidad de la muestra suele variar en estos disolventes, dictaminando el uso de disolventes específicos.

Tanto el pH como la fuerza iónica de la porción acuosa de la fase móvil son parámetros importantes para desarrollar métodos robustos e insensibles a pequeñas variaciones de las condiciones. La retención de compuestos ionizables presenta cambios significativos en función del valor de pH. En sistemas de fase reversa, el control del pH se vuelve crítico para lograr estabilizar la retención y la separación de las bandas.

La resolución cromatográfica entre dos o más picos depende de tres factores: eficiencia de la columna, selectividad y retención. En presencia de analitos ionizables, bases y ácidos, todos estos factores cambian drásticamente con el pH. Los cambios en el pH de la fase móvil también mejoran la eficiencia de la columna ya que puede modificarse la ionización del analito y la de los silanoles residuales, de esta manera se minimizan las interacciones secundarias entre los analitos y la superficie de sílice que ocasionan deformaciones al pico cromatográfico.

El punto de partida recomendado para el desarrollo de métodos es el uso de una fase móvil amortiguada a pH's en torno a 2-3, tanto para compuestos básicos como para compuestos ácidos débiles. Estas condiciones de pH proporcionan con frecuencia las mejores formas de pico para compuestos básicos en columnas basadas en sílice y suele ofrecer las condiciones de retención más estables frente a pequeños cambios de pH. A



pH's bajos, los silanoles de la sílice están completamente protonados, por lo que los compuestos básicos con carga positiva no interaccionan de forma notoria; el resultado es una buena forma de pico.

En fase reversa las formas no disociadas se retienen más favorablemente que las disociadas. En estos casos el pH de la fase móvil es fundamental para la cuantificación del analito. En las proximidades del pKa, el pico puede presentar asimetría debido a la presencia simultánea de ambas formas. Para corregir este efecto puede ajustarse el pH a modo tal de desplazar el equilibrio hacia la izquierda o derecha, según convenga, o emplear soluciones reguladoras de pH que modifiquen ese equilibrio. A este efecto se le conoce como control de la ionización o supresión iónica. En ausencia de regulación de pH, tanto los ácidos débiles como las bases, estarán en sus formas disociada y no disociada. Sin embargo, para el caso de las bases, si se desea desplazar el equilibrio hacia la forma no iónica, se necesitará un pH que es, en general, incompatible con la integridad de la columna. Estas condiciones no pueden usarse con columnas de fase ligada a sílica gel, ya que los pH's superiores a 7-7.5 conducen a disolución de la matriz. En estos casos es posible recurrir a la cromatografía de par iónico (QUATTROCCHI, 1992, p.275).

Respecto a la determinación de la proporción de agua-modificador orgánico adecuada, ésta generalmente es obtenida mediante pruebas de ensayo y error pero se recomienda seguir alguno de los siguientes caminos (QUATTROCCHI, 1992, p.273):

- Comenzar con una concentración "media" de modificador (50% de MeOH o ACN en agua) y ajustar la proporción según los resultados obtenidos.
- Comenzar con una concentración alta de modificador orgánico reduciendo luego su proporción en fracciones de 10-20% de acuerdo a los resultados y luego en proporciones menores, hasta obtener una retención y resolución razonables para todos los constituyentes de la muestra.
- Efectuar un gradiente de elución y calcular la composición adecuada para un disolvente isocrático.

#### **2.4.2 Cromatografía de Fase Reversa con Fase Ligada y Agente de Par Iónico**

Los grupos silanol libres están ubicados en zonas muy profundas e inaccesibles en los poros de la partícula de silicagel y son muy pocos los que pueden permanecer en la superficie de la misma, pero son suficientes para justificar mecanismos de retención. En el caso de las bases pueden darse dos tipos de interacción: mecanismos de fase reversa y de intercambio iónico. Como resultado de estas interacciones, se obtienen picos muy anchos y coleados. Es posible minimizar este fenómeno con distintas estrategias: reduciendo el pH de la fase móvil hasta valores de 3-3.5, adicionando una base a la misma, o bien hacer uso de ambas técnicas. La disminución del pH tiene por objeto impedir la disociación de los grupos silanol, para que puedan actuar como intercambiadores iónicos, mientras la adición de una base bloquea por competencia los grupos silanoles residuales (QUATTROCCHI, 1992, p.276-277).

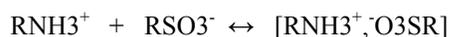
Cuando se decide emplear la técnica de fase reversa con un agente de par iónico, generalmente la columna empleada es C18 debido a que el volumen de fase ligada ofrece un mejor efecto protector contra la disolución de la matriz de sílica subyacente. Las columnas de grupos funcionales más pequeños suelen ser menos estables (WILLARD, 1991, p.620).



Inicialmente se emplea un contraión de cadena corta en una concentración de 0.01M; si el contraión tiene grupos alquilo decilo o mayores la concentración deberá de ser menor (aproximadamente 0.005M). Las combinaciones de disolvente más comunes son agua/metanol y agua/acetonitrilo. Aun cuando el acetonitrilo da mejores eficiencias para la columna debido a su menor viscosidad, su utilidad está limitada por la baja solubilidad que tienen en él muchos de los reactivos de pares de iones. Una concentración razonable para cualquier regulador de pH que se necesite es de 0.001-0.005M. Los componentes de la solución amortiguadora deben seleccionarse con propiedades pobres para la formación de pares de iones pero con buena solubilidad (WILLARD, 1991, p.620).

Para iones orgánicos positivos se emplean como contraiones los alquilsulfatos y los ácidos alquil sulfónicos, los cuales proporcionan selectividades diferentes al usarse como contraión. Las aminas cuaternarias de trietilalquilo proporcionan un intervalo correspondiente de reactivos para los iones orgánicos negativos.

Para nuestro caso en particular, el ion del analito es un ion de amonio cuaternario y el contraión es un anión sulfato. Así, con un contraión adecuado, los compuestos iónicos o ionizables pueden convertirse en compuestos eléctricamente neutros que pueden repartirse entre la fase móvil y estacionaria no polar. Al mismo tiempo, la fase estacionaria no habrá perdido nada de su habilidad para retener y separar sustancias orgánicas no ionizadas.



#### 2.4.2.1 Mecanismo de la Cromatografía de Pares de Iones

Existen dos modelos fundamentales para explicar el mecanismo de pares de iones. El primero postula que las moléculas del analito forman un par iónico con el contraión en la fase móvil. Este par iónico sin carga se reparte entonces dentro de la fase estacionaria lipofílica. El otro mecanismo postula que el contraión se reparte hacia la fase estacionaria, o es “cargado” en el empaque de fase inversa enlazada, con su grupo iónico orientado hacia la superficie. Esto produce dos posibilidades de retención del analito: puede ser atraído hacia la porción de hidrocarburo en la manera usual de la fase inversa o puede interaccionar en un modo de intercambio iónico. Es muy probable que el mecanismo real involucre ambos postulados. Cualquiera que sea el mecanismo, la cromatografía de pares de iones permite separaciones únicas que no son posibles de obtener por fase inversa o intercambio iónico (WILLARD, 1991, p.619).

#### 2.4.2.2 Factores que Influyen en la Retención

La retención puede ser afectada por el grado en el que la muestra ionizada y el contraión forman el complejo de par iónico, así como por la fuerza de unión del complejo con la fase estacionaria. Para controlar estos factores, el analista puede elegir un contraion en particular y su concentración o bien, ajustar el pH de forma que algunos o todos los componentes de la muestra estén presentes en su forma iónica (WILLARD, 1991, p.619-620).

Además de la variación en la proporción del disolvente, la separación puede controlarse variando la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraión (de butanosulfonato hasta dodecilsulfonato de sodio para la



bases), su concentración (0 a 200 mM), y la fuerza iónica a través de la concentración de la solución amortiguadora empleada. El tamaño relativo del grupo lipofóbico en el contra ion afecta el grado de retención. Conforme mayor sea la cadena de alquilo, la población de iones en la fase estacionaria será más densa lo que a su vez produce mayor retención. Por otro lado, al aumentar la concentración del contraión aumenta la retención, hasta un límite que generalmente está dado por la solubilidad del contraión en la fase móvil, especialmente cuando se utiliza un modificador orgánico en el sistema. El cambio en la concentración generalmente se reserva para el ajuste fino de la separación (WILLARD, 1991, p.620).

El control del pH es sin duda el parámetro más importante. La retención aumenta conforme el pH maximiza la concentración de la forma iónica de los solutos. Mantener el pH alrededor de 2-4 asegura que tanto las bases fuertes como las débiles están en su forma iónica protonada y que los ácidos débiles presentes están en su forma no iónica principalmente.

Los contraiones de apareamiento (alquilsulfonatos, tetraalquilamonio) son difíciles de remover completamente por lavado y quedan retenidos modificando la selectividad de la columna. Esto no representa ninguna dificultad, salvo el tener que reservar la columna para esta única finalidad.



## 2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus metodologías analíticas proporcionan resultados confiables y adecuados para la finalidad y propósito perseguido ya que muchas de las decisiones que se toman estarán basadas en la información que estos datos proporcionan.

La adopción de un nuevo método analítico debe de estar soportada por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada que cumpla con los requisitos establecidos en México por la Secretaria de Salud y por instituciones internacionales como la FDA. Para hablar de validación, primero es necesario conocer su significado. De acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de QFB's, la validación de métodos analíticos se define como “el proceso por el cual se demuestra mediante estudios de laboratorio, que la capacidad de un método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir, cumple con su propósito”.

Para lograr llevar a cabo un estudio biofarmacéutico de manera exitosa, es necesario contar con un método analítico validado. La validación de un método bioanalítico incluye diversos experimentos para demostrar que el método empleado para la cuantificación del o los analitos de interés en determinada matriz biológica es confiable y reproducible para el propósito de su uso.

En México, la Secretaria de Salud, a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable así como también los requisitos a los que deben de sujetarse los laboratorios autorizados para realizar este tipo de estudios. Es por ello que la validación descrita en el presente trabajo, está enfocada en el cumplimiento de esta Norma.

A continuación se dará una breve descripción de los parámetros fundamentales a evaluar durante la validación de un método bioanalítico.

### 2.5.1 Adecuabilidad del Sistema

La prueba de adecuabilidad del sistema es una parte integral de los métodos cromatográficos. De acuerdo a la USP, esta prueba es empleada para verificar que la resolución y reproducibilidad de un sistema es adecuada para el análisis que se llevara a cabo. La adecuabilidad del sistema se basa en el concepto de que los equipos, las operaciones analíticas, los reactivos y las muestras, entre otros, constituyen un sistema integral que debe de ser evaluado en su totalidad.

### 2.5.2 Selectividad

Es la habilidad de un método analítico para lograr diferenciar y cuantificar al analito o analitos de interés en presencia de otros compuestos que pudieran encontrarse en la muestra.

Las sustancias que potencialmente pueden llegar a interferir en la cuantificación de los analitos de interés son los componentes endógenos de la matriz biológica, productos de degradación del compuesto de interés, fármacos administrados de manera concomitante, metabolitos y xenobióticos exógenos como lo son los anticoagulantes empleados durante la toma de muestra.



### 2.5.3 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, dentro de un intervalo determinado, de obtener resultados de manera directa o mediante alguna transformación matemática definida que sean directamente proporcionales a la concentración del analito de interés en la muestra.

Es necesario establecer previamente el intervalo o rango de trabajo en función de las concentraciones del compuesto de interés que se esperan obtener durante el análisis de muestras. El intervalo debe de estar constituido al menos por cinco concentraciones diferentes.

### 2.5.4 Exactitud

La exactitud se refiere a la concordancia existente entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

### 2.5.5 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el método se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.

Las dos medidas más comunes de precisión son la repetibilidad y la reproducibilidad, ambas se expresan en términos de coeficiente de variación.

#### **- Repetibilidad**

La repetibilidad es la precisión más pequeña esperada, expresa la variabilidad entre determinaciones independientes realizadas dentro de un mismo laboratorio y bajo las mismas condiciones.

#### **- Reproducibilidad Intralaboratorio**

Representa la variabilidad entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio pero empleando diferentes condiciones de análisis.

La precisión generalmente depende de la concentración del analito, por lo tanto, se deben de evaluar un mínimo de tres concentraciones conocidas que se encuentren dentro del intervalo de trabajo pero que sean diferentes a las concentraciones de los puntos de la curva de calibración.

### 2.5.6 Rango

Se define como el intervalo comprendido entre la concentración más baja y la concentración más alta del analito en el cual se ha demostrado que el método es lineal, exacto y preciso.

### 2.5.7 Recuperación Absoluta

La recuperación absoluta se refiere a la eficiencia de un método analítico para extraer el o los compuestos de interés presentes en la muestra biológica.



El recobro debe de ser evaluado para cada uno de los compuestos de interés así como para el estándar interno en caso de que este exista. La recuperación absoluta debe de ser reproducible para cada nivel de concentración evaluada.

#### **2.5.8 Límite de Cuantificación**

Es la concentración mínima del compuesto que puede ser cuantificada cumpliendo con los criterios de precisión y exactitud establecidos en el método.

#### **2.5.9 Límite de Detección**

Es la concentración mínima del compuesto que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

#### **2.5.10 Estabilidad**

Es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características físico-químicas cuando es sometido a diversas condiciones, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Los experimentos realizados para evaluar la estabilidad deben de reflejar las situaciones a las que serán sometidas las muestras durante su manipulación y análisis tal como se describe a continuación:

##### ***- Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación***

Un ciclo de congelación-descongelación se cumple cuando después de que una muestra ha permanecido congelada por más de 24 horas, es descongelada a temperatura ambiente y una vez descongelada deberá de ser nuevamente congelada y permanecer así durante un periodo de 12 a 24 horas.

Se debe de evaluar la estabilidad del compuesto después de un mínimo dos ciclos de congelación-descongelación.

##### ***- Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente)***

Se debe de evaluar la estabilidad de las muestras después de ser descongelada y haber permanecido a temperatura ambiente durante un periodo de 4 a 24 horas. Este procedimiento se realiza para asegurar la estabilidad de las muestras durante el tiempo que tarde el procesamiento de éstas.

##### ***- Estabilidad en el disolvente de inyección***

Esta prueba deberá de realizarse para asegurar que tanto el analito de interés, como el estándar interno, son estables en el disolvente en el que se encuentran una vez procesadas durante el tiempo que permanecerán en estas condiciones hasta ser cuantificadas.



**- Estabilidad a condiciones de almacenamiento**

Esta prueba se realiza para asegurar que las condiciones de almacenamiento a las cuales son sometidas las muestras desde su recolección hasta su análisis son las adecuadas para mantener la integridad fisicoquímica del o los compuestos de interés.

**2.5.11 Tolerancia y Robustez**

Ambos conceptos se refieren a la capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo.

La NOM-177-SSA1-1998 solo hace mención al parámetro de Tolerancia, sin embargo, algunas guías internacionales manejan el término de Robustez, en tanto que la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de QFB's hace una aclaración al respecto y diferencia los dos términos de la siguiente manera:

***Tolerancia***

Factores ajenos al método como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso. Su evaluación dependerá de la aplicación analítica y naturaleza del método

***Robustez***

Variaciones de los parámetros de método. Algunos ejemplos de estas variaciones analíticas dependiendo del método son: influencia del pH, la composición de la fase móvil, tiempo de extracción, estabilidad de las preparaciones de la muestra y sustancia de referencia, temperatura, velocidad de flujo, tipo de columna, entre otros.



### **3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METOPROLOL EN PLASMA**

Dado que el desarrollo de métodos analíticos es costoso y requiere de mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos, evitando análisis innecesarios y documentando los resultados, no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones.

Antes de iniciar el desarrollo de una metodología analítica, es necesario fijar con claridad cuál es la meta perseguida, y los límites de dichos objetivos los cuales fueron descritos en el capítulo 1.

Al desarrollar un método analítico, el primer paso consiste en realizar una investigación bibliográfica exhaustiva.

Con respecto a la muestra, es importante conocer algunas de sus características específicas tales como:

- Identidad del componente de interés
- Rango de pesos moleculares de los componentes de interés
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV
- Concentración de los componentes de interés
- Naturaleza de la matriz
- Posibles metabolitos

Una vez completada esta información, se podrá comenzar a definir las características con las que debe cumplir nuestro método analítico para lograr establecer un sistema preliminar.

A continuación se detallan los pasos realizados durante la etapa de desarrollo para seleccionar y establecer las características del método analítico para la cuantificación de Metoprolol en plasma.

#### ***3.1 SELECCIÓN DE LA MATRIZ O FLUIDO BIOLÓGICO***

Para seleccionar la matriz biológica en la cuál se realizará la cuantificación del compuesto de interés, es necesario conocer previamente las propiedades farmacocinéticas del analito las cuales son descritas en el punto 2.3.3.

El fluido biológico seleccionado para llevar a cabo la cuantificación de Metoprolol para realizar estudios de intercambiabilidad es el plasma, esto debido a que se sabe que menos del 5% de la dosis es excretada en forma inalterada en la orina y que además el Metoprolol presenta una variabilidad interindividual grande pero los perfiles del nivel plasmático son reproducibles en cada individuo.

#### ***3.2 INTERVALO DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO***

Para establecer el intervalo de trabajo, es necesario conocer los niveles de concentración que alcanza el fármaco en el plasma. Como se ha mencionado anteriormente, el Metoprolol presenta una gran variabilidad interindividual, los



valores de  $C_{m\acute{a}x}$  reportados en bibliografía se encuentran dentro del intervalo de 68.7 a 344.3 ng/mL para una dosis de 100 mg.

LA NOM-177-SSA1-1998, en su punto 8.7, establece que en un estudio de intercambiabilidad el muestreo debe de realizarse por un periodo que permita cubrir por lo menos el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática, esto es, como mínimo 4 vidas medias para el caso de la sangre o 7 vidas medias en el caso de orina. En base a lo anterior y considerando el valor de  $C_{m\acute{a}x}$  de 68.7 ng/mL, el límite de cuantificación del método propuesto es de 5 ng/mL.

Por otro lado, el límite superior del intervalo de trabajo propuesto es de 500 ng/mL el cual equivale a aproximadamente el 150% del valor reportado de  $C_{m\acute{a}x}$  de 344.6 ng/mL.

### **3.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

El método de mayor difusión es, sin duda, la fase reversa debido a sus ventajas y a su versatilidad.

En base a la información presentada en el punto 2.4, las técnicas cromatográficas recomendadas para realizar la cuantificación de Metoprolol son las siguientes:

- Fase reversa con fase ligada utilizando control de la ionización
- Fase reversa con fase ligada utilizando un agente de par iónico
- Fase reversa con sílice sin tratar
- Intercambio iónico

Las técnicas cromatográficas evaluadas durante la etapa de desarrollo del método para cuantificar Metoprolol en plasma fueron la fase reversa con fase ligada utilizando control de la ionización y la fase reversa con fase ligada utilizando un agente de par iónico. En la tabla 3.3 se resumen los sistemas cromatográficos probados durante la etapa de desarrollo del método analítico para cuantificar Metoprolol en plasma.

### **3.4 CONDICIONES DE DETECCIÓN**

La selección de las condiciones de detección depende de las propiedades del analito así como también de la sensibilidad y selectividad requeridas.

El detector de primera elección y el más empleado es el UV, por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su empleo por que el analito carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible emplear otros detectores o métodos de derivatización.

Como se mencionó en el capítulo 2, la detección mediante fluorescencia es una manera de incrementar la sensibilidad y selectividad de un análisis mediante CLAR. Por otro lado, en la tabla 2.8 se observa que en todos los métodos analíticos reportados para cuantificar Metoprolol en plasma la detección es realizada mediante fluorescencia. De acuerdo a lo anterior se decide emplear un detector de fluorescencia para realizar la cuantificación de Metoprolol.



Una vez elegido el equipo de detección es necesario establecer los parámetros de detección adecuados tales como las longitudes de onda de excitación y emisión. Estos parámetros fueron elegidos en base a las propiedades fisicoquímicas del Metoprolol y a los métodos de cuantificación descritos en la tabla 2.8.

En la tabla número 3.1 se muestran las diferentes condiciones de detección evaluadas empleando una solución de Metoprolol de 5 ng/mL de concentración y el sistema cromatográfico 1 descrito en la tabla 3.3.

**TABLA 3.1. Establecimiento de las Condiciones de Detección.**

<b>LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN</b>	<b>LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN</b>	<b>RESPUESTA DEL METOPROLOL</b>
222	320	1289
275	300	---
225	320	---
230	300	---
225	300	---
229	309	---
275	310	13 551
275	320	---
275	330	No es cuantificable
275	340	---
275	350	No es cuantificable

En base a los resultados anteriores, se decide emplear una longitud de onda de excitación de 275 nm y una longitud de onda de emisión de 310 nm.

Un segundo experimento para establecer las condiciones de detección apropiadas consistió en variar los parámetros de atenuación y ganancia del detector. Estos parámetros son propios del detector y nos ayudan a afinar la sensibilidad de la detección. En la tabla 3.2 se muestran los resultados del experimento para establecer los valores de ganancia y atenuación del método. Se observa que la sensibilidad es mayor al emplear una ganancia de 1000, una vez establecido el valor de ganancia a emplear, se comenzó a variar el parámetro de atenuación; se puede observar que no existe variación significativa al modificar la atenuación por lo cual se decide emplear una atenuación de 64.

**TABLA 3.2. Establecimiento de los Parámetros de Detección.**

<b>GANANCIA</b>	<b>ATENUACIÓN</b>	<b>RESPUESTA DEL METOPROLOL</b>
1	128	802
10	128	1267
100	128	181405
1000	128	181405
1000	64	175991
1000	32	191953
1000	16	180053
1000	8	185949
1000	256	206409



### ***3.5 TÉCNICA ANALÍTICA PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS***

En estudios de intercambiabilidad, generalmente la cantidad de muestra de la que se dispone para el análisis suele ser escasa y la matriz biológica es demasiado compleja como para ser analizada en forma directa. Debido a lo anterior, resulta necesario establecer un procesamiento adecuado para lograr cuantificar selectivamente el compuesto de interés del resto de los componentes de la muestra que pudieran llegar a dañar la columna o que pudieran ser interferencias potenciales.

El número de muestras a evaluar puede no ser relevante para pocos ensayos, pero en largas rutinas es necesario contar con un método de procesamiento de muestras rápido y sencillo.

Como se mencionó anteriormente, la selección de un procesamiento de muestras adecuado está en función de diversos factores tales como:

- a) Propiedades físico-químicas del analito
- b) Naturaleza de la matriz de la muestra
- c) Concentración del analito en la muestra
- d) Forma en la que se presenta el analito en la muestra
- e) Fijación proteica del analito
- f) Compatibilidad entre el disolvente de inyección final y el sistema cromatográfico
- g) Tipo de detector y su compatibilidad con la muestra

En el capítulo 2 se describen los fundamentos de las diferentes técnicas analíticas que fueron probadas para el procesamiento de las muestras.

### ***3.6 DEFINICIÓN DEL SISTEMA PRELIMINAR***

En la tabla 3.3 se resumen brevemente los sistemas cromatográficos probados y las técnicas de procesamiento de muestra empleados en cada uno de ellos, así mismo, se describen las ventajas y desventajas observadas en cada caso. En las figuras 3.1 a 3.12 se presentan los cromatogramas representativos de los sistemas cromatográficos evaluados.

Como se puede observar, inicialmente se realizaron intentos para definir un sistema cromatográfico y un procesamiento de muestras lo más sencillo y rápido posible. Sin embargo, debido a la falta de sensibilidad en los métodos evaluados fue necesario elegir un procesamiento que nos permitiera concentrar la muestra para lograr cuantificar de manera exacta y precisa el límite de cuantificación propuesto (5 ng/mL). Debido a lo anterior, se decidió emplear una técnica de extracción líquido-líquido para el procesamiento previo de las muestras. A diferencia de los otros procesamientos evaluados, la extracción líquido-líquido es un método que requiere de mayor manipulación de las muestras por lo que fue necesario elegir un estándar interno que minimizara las posibles causas de error durante el procesamiento y la cuantificación. Los métodos compendiales para la cuantificación de Metoprolol emplean al Oxprenolol como estándar interno (USP 30, p. 2649-2652), razón por la cual se decidió emplear a este compuesto como estándar



interno. En las figuras 3.13 y 3.14 se presentan los cromatogramas típicos de un blanco plasma y una muestra de Metoprolol en plasma, respectivamente, analizados mediante este método.

Debido a que este último método demostró ser específico, así como también, lineal, exacto y preciso dentro del intervalo de concentraciones requerido, se decidió dar inicio a la validación del método analítico desarrollado en base a los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA1-1998 para poder ser empleado posteriormente en estudios de bioequivalencia.



**TABLA 3.3. Métodos Analíticos Evaluados para Cuantificar Metoprolol en Plasma Mediante CLAR.**

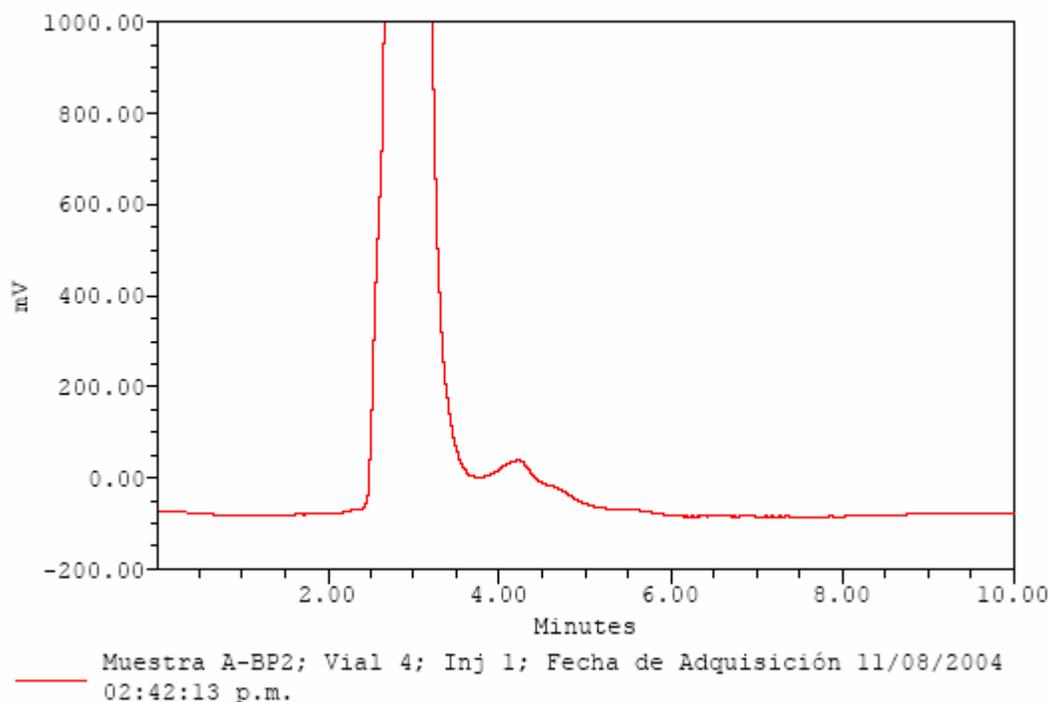
TÉCNICA ANALÍTICA	COLUMNA	FASE MÓVIL	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	PROCESAMIENTO DE MUESTRA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cromatografía de fase reversa con fase ligada empleando control de ionización	Spherisorb CN-RP 4.6*250mm 5µm	70% Solución amortiguadora de fosfatos pH=3  30%Acetonitrilo	Flujo= 1mL/min  Vol de inyección = 150µL  Temp. en columna = 30°C	PRECIPITACIÓN CON DISOLVENTES ORGÁNICOS:  a) Acetonitrilo (Ver figuras 3.1 y 3.2) b) Etanol (Ver figuras 3.3 y 3.4) c) Metanol (Ver figuras 3.5 y 3.6)	Procesamiento rápido y sencillo	a) Picos deformes  b) Falta de sensibilidad y especificidad c) Falta de sensibilidad y especificidad
				PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO:  a) Pérclorico al 30% (Ver figuras 3.7 y 3.8) b) Trifluoroacético 10%	Procesamiento rápido y sencillo	a) Falta de sensibilidad  b) Muestras excesivamente sucias y por lo tanto no fueron inyectadas en el sistema
			Flujo= 2mL/min  Vol de inyección = 150µL  Tem en columna = 30°C	ULTRAFILTRACIÓN (Ver figuras 3.9 y 3.10)	Procesamiento rápido y sencillo  Método específico	- Falta de sensibilidad
Cromatografía de fase reversa con fase ligada empleando control de ionización	YMC CN 4.6*250mm 5µm	70% Solución amortiguadora de fosfatos pH=3  30%Acetonitrilo	Flujo=1mL/min  Vol de inyección = 150µL  Temp. en columna = 30°C	PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO: Pérclorico al 30% (Ver figura 3.11)	Procesamiento rápido y sencillo	- Desgaste de la columna cromatográfica - No específico
				ULTRAFILTRACIÓN (Ver figura 3.12)	Procesamiento rápido y sencillo	- Método analítico no lineal



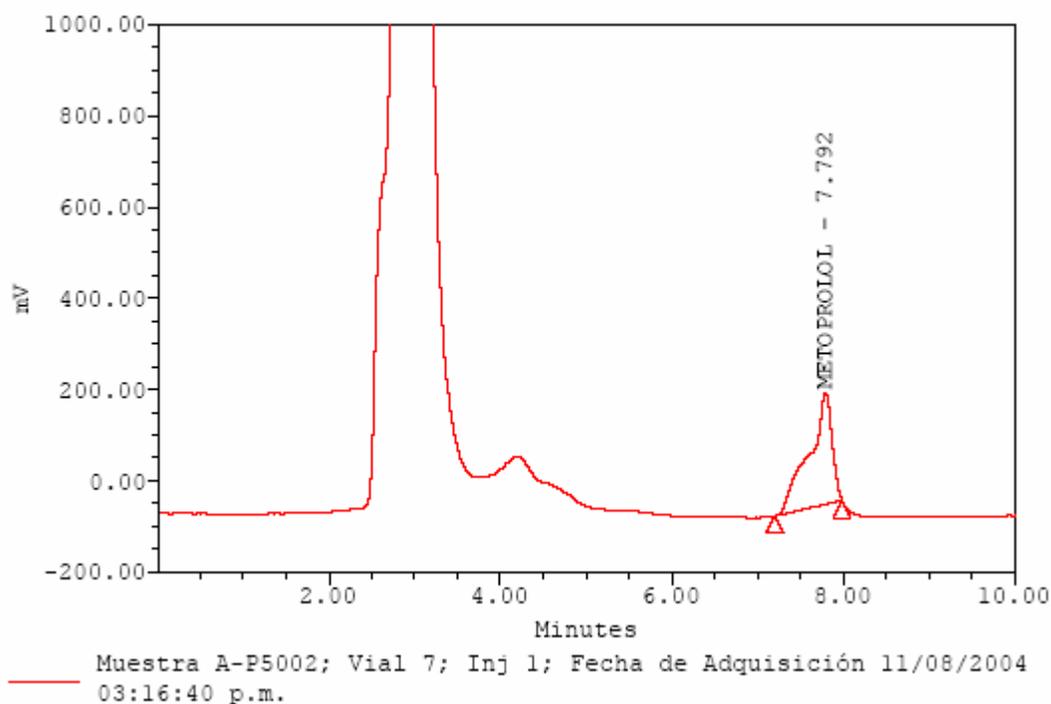
**TABLA 3.3. Métodos Analíticos Evaluados para Cuantificar Metoprolol en Plasma Mediante CLAR (continuación).**

<b>TÉCNICA ANALÍTICA</b>	<b>COLUMNA</b>	<b>FASE MÓVIL</b>	<b>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b>	<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRA</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Cromatografía de fase reversa con fase ligada empleando un agente de par iónico	Zorbax SB-C18 4.6*250mm 5µm	75% Solución amortiguadora de fosfatos pH=3  25% Acetonitrilo	Flujo= 1mL/min  Vol. de inyección = 100µL  Temp. en columna = 35°C	EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (Ver figuras 3.13 y 3.14)	Concentración de la muestra Sensibilidad apropiada Método específico Método lineal, exacto y preciso	- Uso de par iónico - Uso de estándar interno (Oxprenolol)



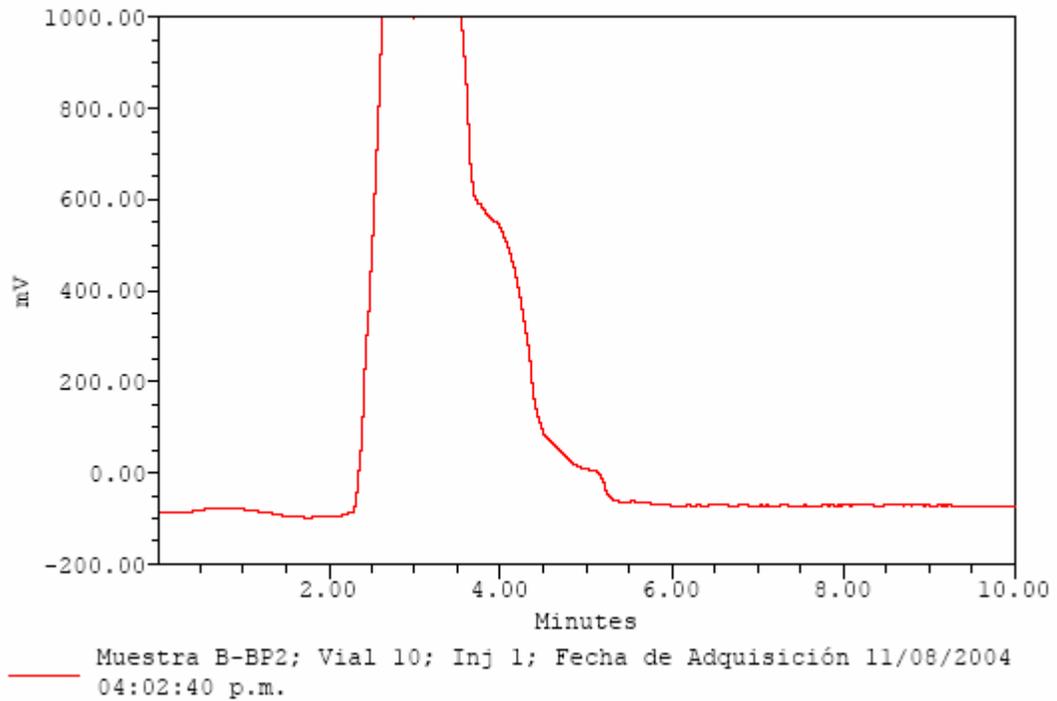


**FIGURA 3.1. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Acetonitrilo (Blanco Plasma)**

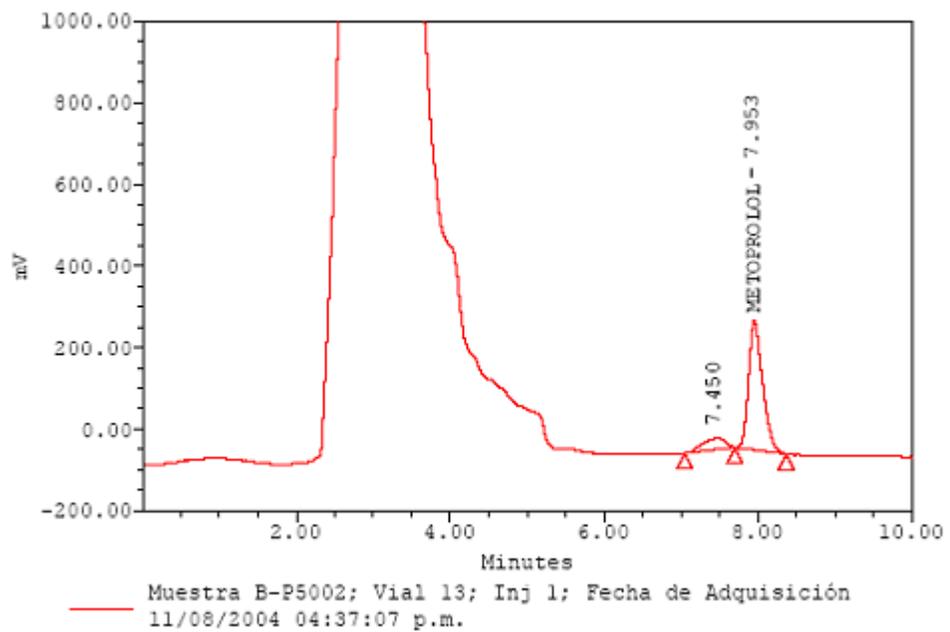


**FIGURA 3.2. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Acetonitrilo (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)**



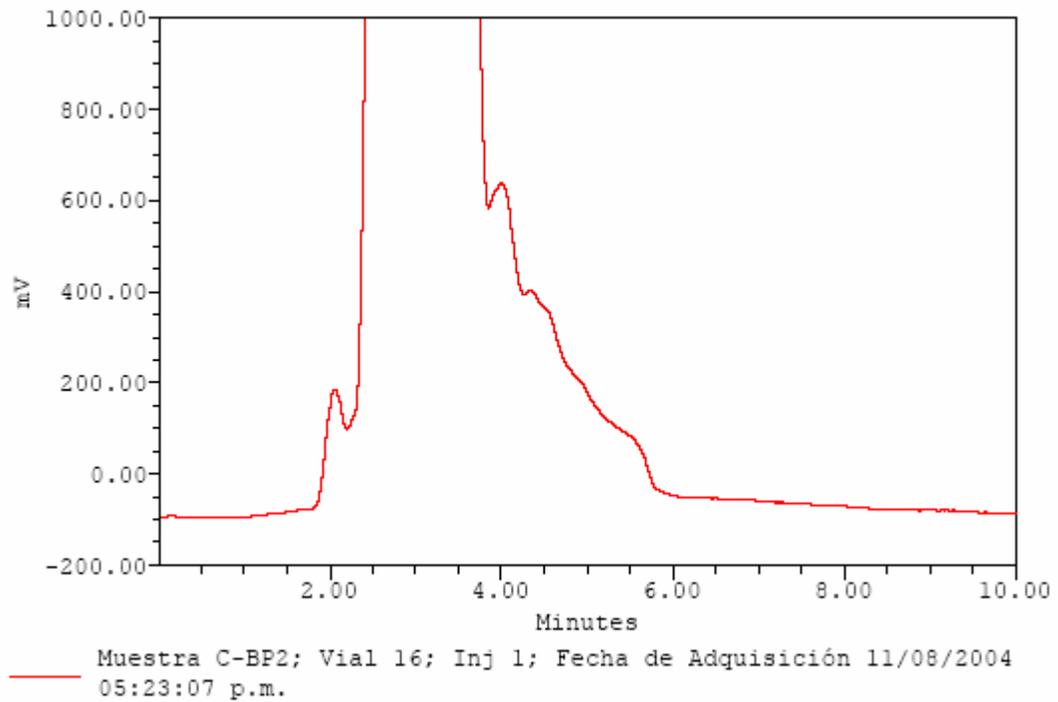


**FIGURA 3.3. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Etanol (Blanco Plasma)**

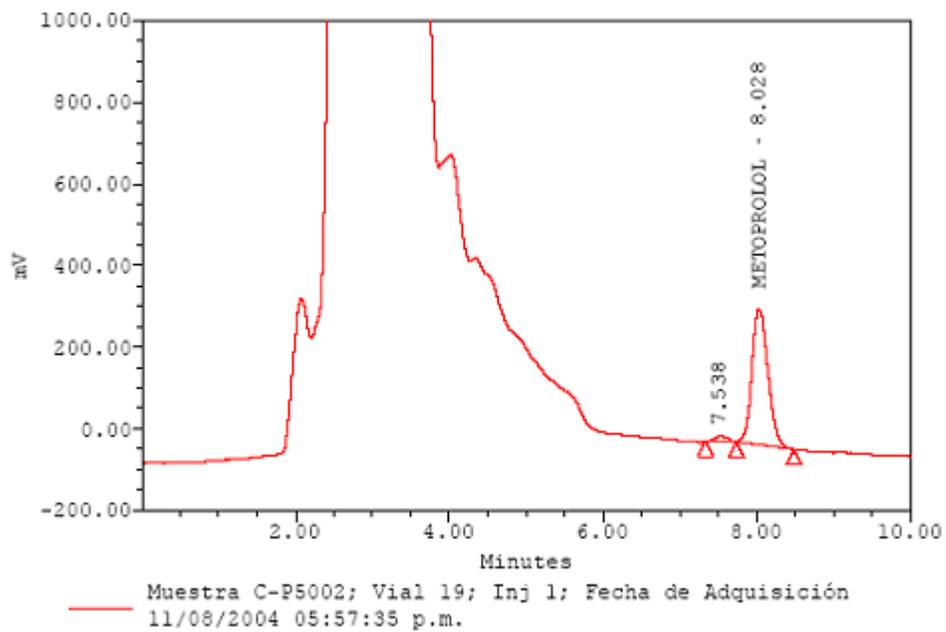


**FIGURA 3.4. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Etanol (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)**



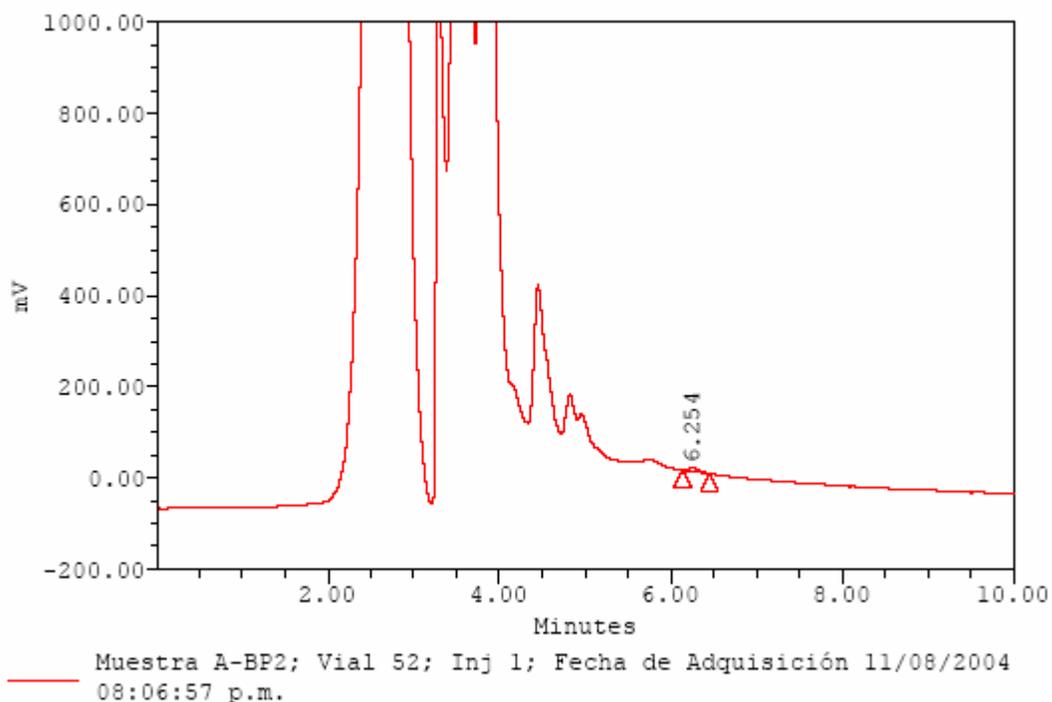


**FIGURA 3.5. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Metanol (Blanco Plasma)**

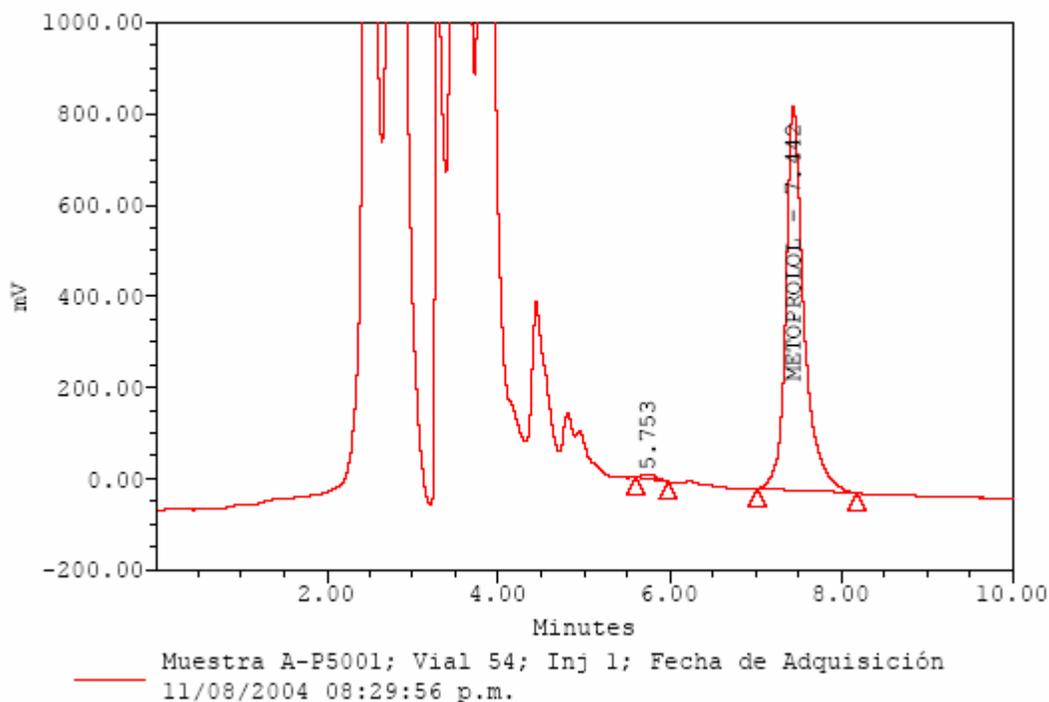


**FIGURA 3.6. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Metanol (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)**



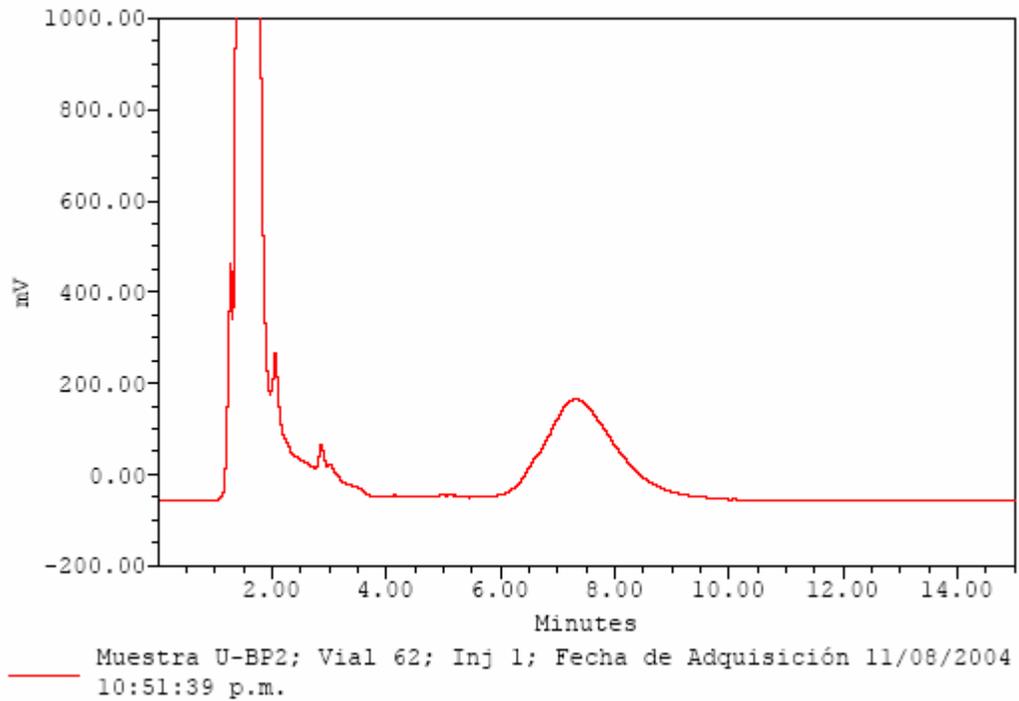


**FIGURA 3.7. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Ácido Perclórico (Blanco Plasma)**

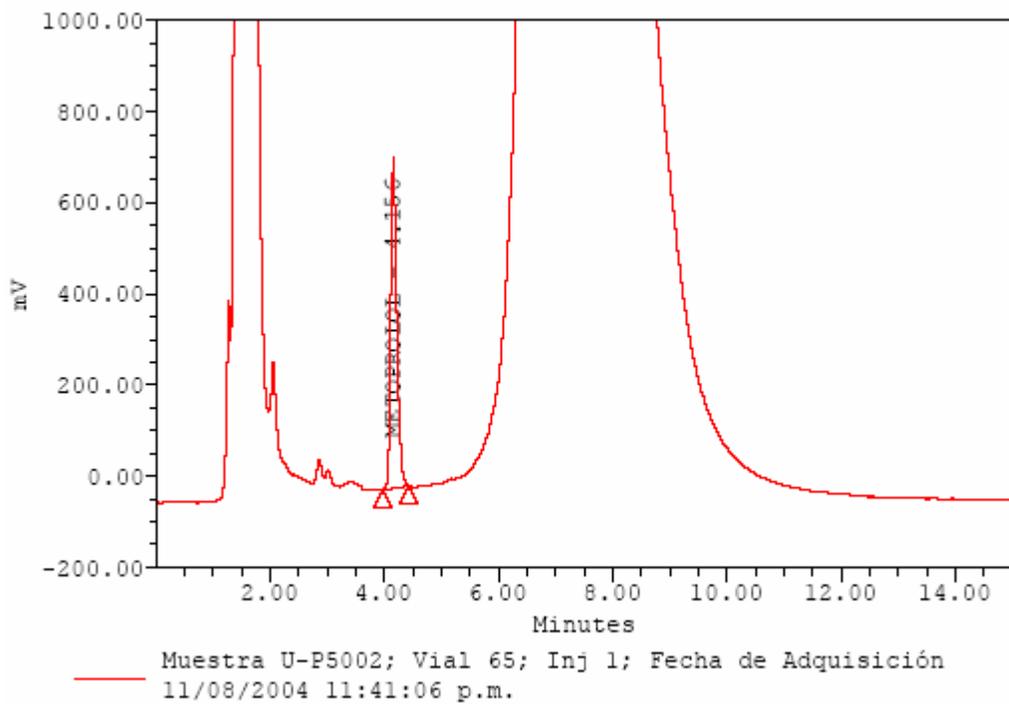


**FIGURA 3.8. Columna Spherisorb CN  
Precipitación con Ácido Perclórico (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)**



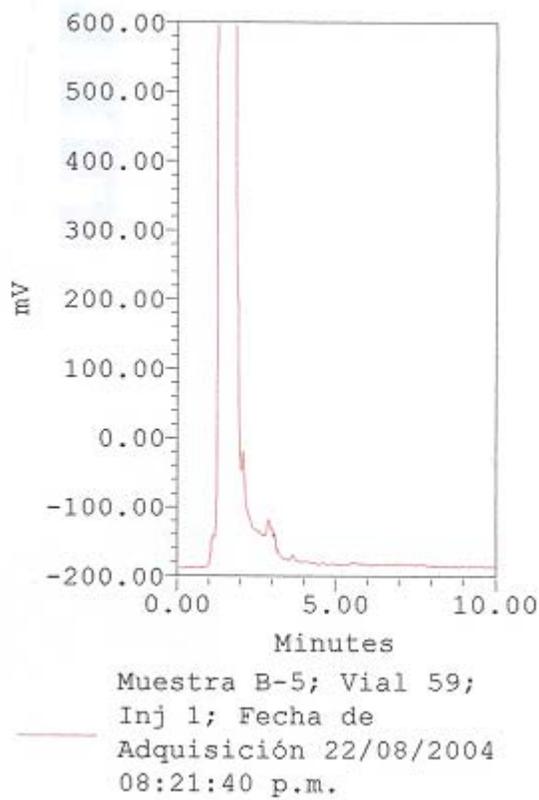


**FIGURA 3.9. Columna Spherisorb CN  
Ultrafiltración (Blanco Plasma)**

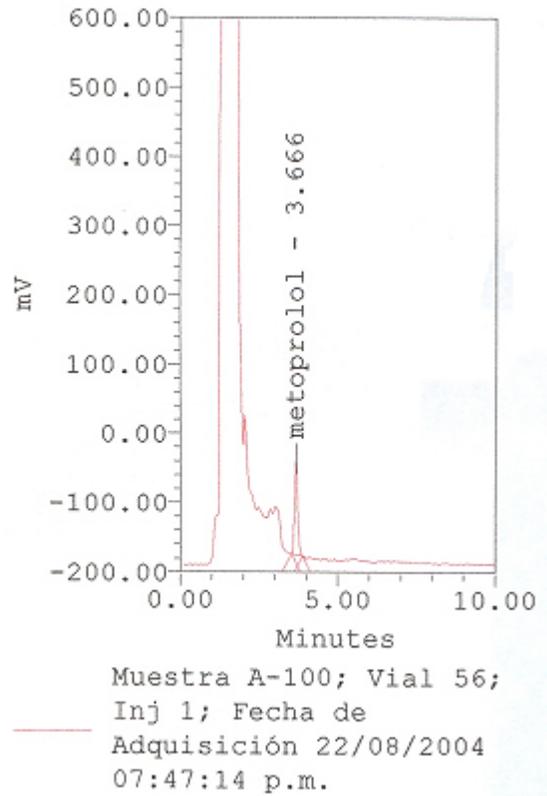


**FIGURA 3.10. Columna Spherisorb CN  
Ultrafiltración (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)**





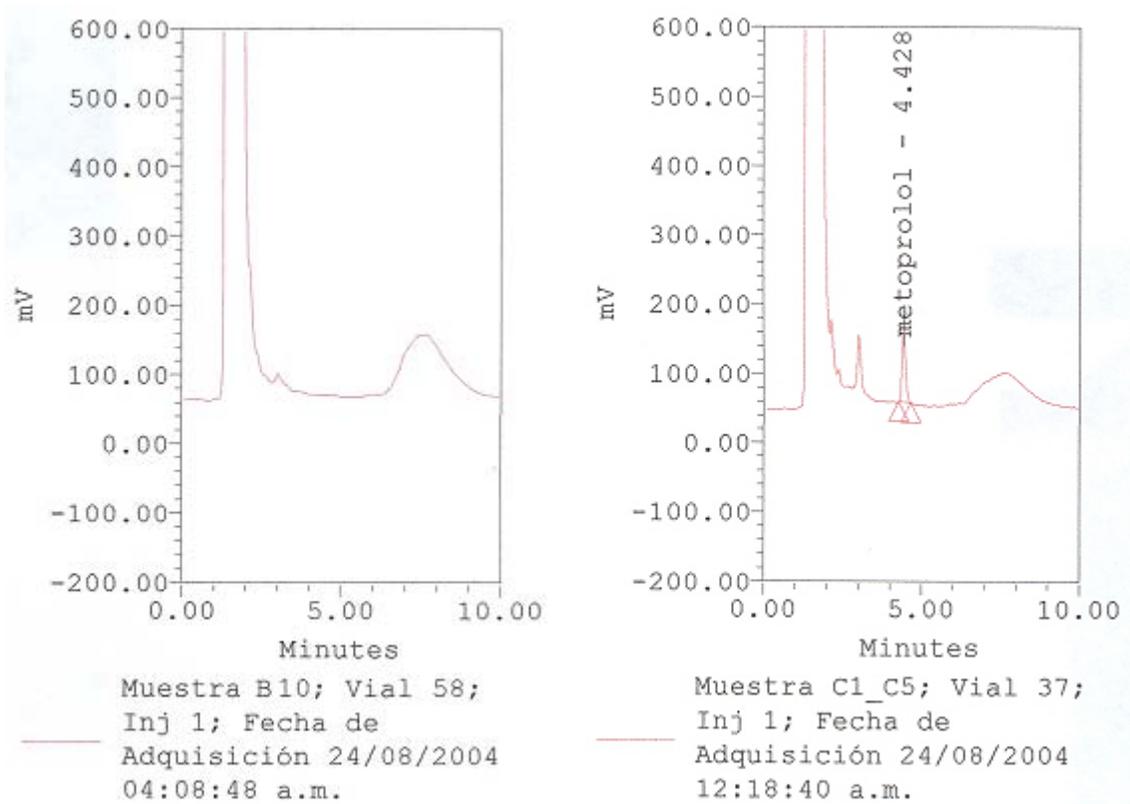
BLANCO PLASMA



METOPROLOL EN PLASMA 100 ng/mL

**FIGURA 3.11. Columna YMC CN  
Precipitación con Ácido Perclórico**



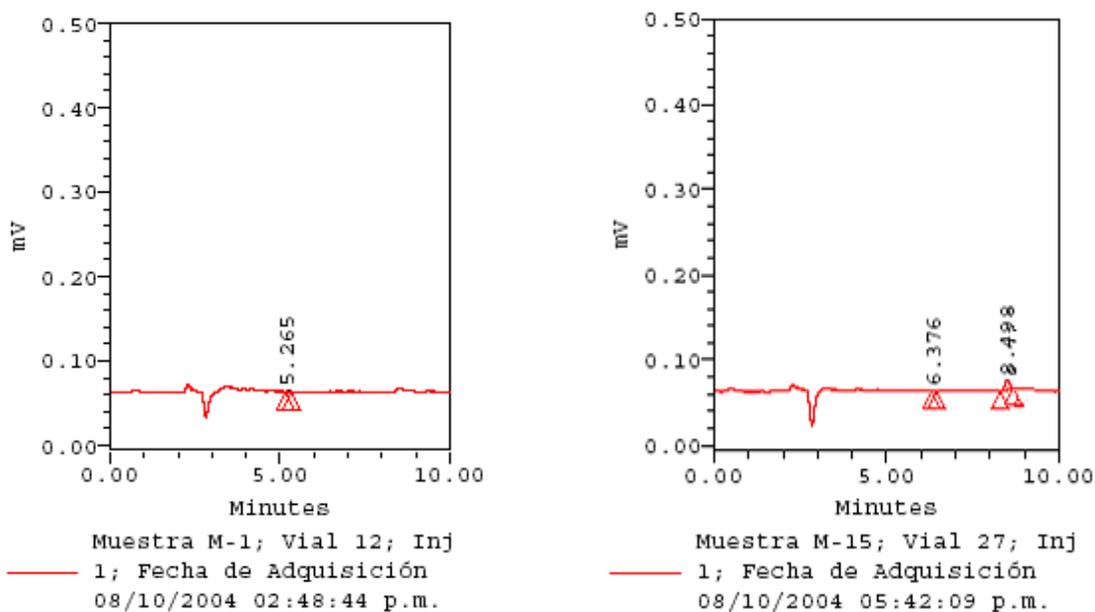


BLANCO PLASMA

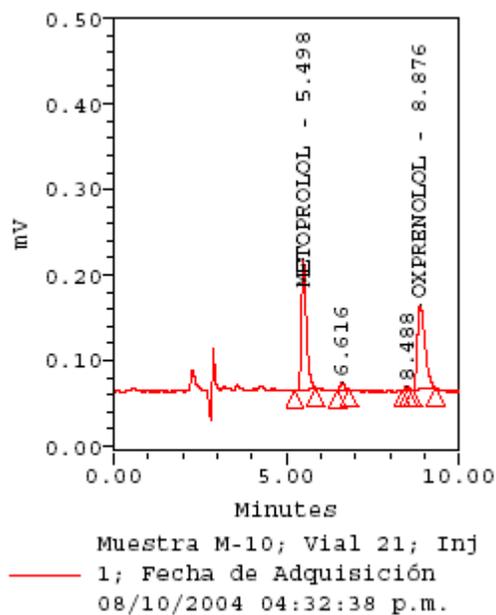
METOPROLOL EN PLASMA 100 ng/mL

**FIGURA 3.12. Columna YMC CN  
Ultrafiltración**





**FIGURA 3.13. Columna ZORBAX SB-C18  
Extracción Líquido-Líquido  
Cromatogramas tipo de Blancos de Plasma**



**FIGURA 3.14. Columna ZORBAX SB-C18  
Extracción Líquido-Líquido  
Cromatograma tipo de Metoprolol en Plasma**



### **3.7 MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR METOPROLOL EN PLASMA**

A continuación se describe detalladamente el método analítico propuesto para cuantificar Metoprolol en plasma.

#### **3.7.1 Sustancias de Referencia**

Metoprolol Tartrato. Sustancia de Referencia Primaria. Usar sin secar

Oxprenolol Clorhidrato. Sustancia de Referencia Primaria. Usar sin secar

#### **3.7.2 Reactivos**

Agua purificada

Acetonitrilo grado HPLC

Ácido fosfórico RA ACS

Fosfato monobásico de potasio RA ACS

Hidróxido de potasio RA ACS

Butanosulfonato de sodio RA ACS

Cloruro de metileno HPLC

#### **3.7.3 Soluciones**

##### **Solución de Hidróxido de potasio 1M**

Transferir aproximadamente 5.6 gramos de hidróxido de potasio a un matraz aforado de 100 mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC.

##### **Solución amortiguadora de fosfatos (para fase móvil)**

Transferir aproximadamente 1.3609 g de fosfato monobásico de potasio y 0.801 g de butanosulfonato de sodio, a un matraz aforado de 1000 mL, disolver y llevar a volumen con agua HPLC. Ajustar el pH a  $3.0 \pm 0.05$  con ácido fosfórico concentrado. Filtrar y desgasificar con agitación suave y vacío a través de una membrana de 0.45 micras, millipore tipo PVDF ó equivalente.

##### **Fase móvil**

Mezclar 75 partes de la solución amortiguadora de fosfatos con 25 partes de acetonitrilo HPLC. Filtrar y desgasificar con agitación suave y vacío a través de una membrana de 0.45 micras, millipore tipo PVDF ó equivalente.



### 3.7.4 Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia, horno para columna y una columna Zorbax SB-C18 de 4.6 X 250 mm con tamaño de partícula de 5 $\mu$ m.

### 3.7.5 Descripción del Método Analítico

#### 3.7.5.1 Preparación de Blancos

##### **BLANCO DE REACTIVOS (BR)**

Utilizar agua, procesar igual que las muestras, sin adicionar estándar interno.

##### **BLANCO DE PLASMA (BP)**

Utilizar plasma blanco y preparar igual que las muestras, sin adicionar estándar interno.

#### 3.7.5.2 Preparación de Soluciones

##### **SOLUCIÓN CONCENTRADA DE METOPROLOL (M1)**

Transferir el equivalente a 10.0 mg de Metoprolol, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 50-mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Metoprolol de 200.0  $\mu$ g/mL.

##### **SOLUCIÓN DILUIDA DE METOPROLOL (M2)**

Transferir una alícuota de 0.500 mL de la solución de Metoprolol M1 a un matraz volumétrico de 10-mL, llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Metoprolol de 10.0  $\mu$ g/mL.

##### **SOLUCIÓN DILUIDA DE METOPROLOL (M3)**

Transferir una alícuota de 0.050 mL de la solución de Metoprolol M1 a un matraz volumétrico de 10-mL, llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Metoprolol de 1.0  $\mu$ g/mL

##### **SOLUCIÓN CONCENTRADA DE OXPRENOLOL CLORHIDRATO (O1)**

Transferir 5.0 mg de Oxprenolol Clorhidrato, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 5-mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Oxprenolol clorhidrato de 1000.0  $\mu$ g/mL.

##### **SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO (EI)**

Transferir una alícuota de 0.250 mL de la solución de Oxprenolol O1 a un matraz volumétrico de 10-mL, llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Oxprenolol de 25  $\mu$ g/mL



### SOLUCIÓN DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA (SA)

Transferir una alícuota de 0.250 mL de la solución de metoprolol M2 a un matraz volumétrico de 10-mL y 2 mL de EI. Llevar a volumen con fase móvil. Concentración final de Metoprolol de 250 ng/mL y de Oxprenolol Clorhidrato de 5 µg/mL.

#### 3.7.5.3 Preparación de la Curva de Calibración

Transferir las alícuotas que se indican en la Tabla 3.4 a matraces volumétricos de 10-mL. Llevar a volumen con plasma y homogeneizar.

**TABLA 3.4. Preparación de la Curva de Calibración**

Identificación	Solución	Alícuota de solución (µL)	Concentración final (ng/mL)
C1	M3	50	5.0
C2	M3	100	10.0
C3	M3	250	25.0
C4	M3	500	50.0
C5	M2	100	100.0
C6	M2	250	250.0
C7	M2	500	500.0

Procesar la curva igual que las muestras.

#### 3.7.5.4 Preparación de Puntos Control

Transferir las alícuotas que se indican en la Tabla 3.5 a matraces volumétricos de 10-mL. Llevar a volumen con plasma y homogeneizar.

**TABLA 3.5. Preparación de Puntos Control**

Identificación	Solución	Alícuota de solución (µL)	Concentración final (ng/mL)
PC-1	M3	150	15.0
PC-2	M2	70	70.0
PC-3	M2	300	300.0

Procesar los puntos control igual que las muestras.

#### 3.7.5.5 Procesamiento de las Muestras

Transferir 80 µL de la solución EI a un tubo de vidrio de 13 x 100 mm con tapa de rosca. Adicionar 400 µL de la muestra a analizar, 50 µL de la solución de hidróxido de potasio 1M, y 3 mL de cloruro de metileno. Tapar y agitar durante 15 minutos con agitador tipo vórtice. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm a  $10 \pm 5^\circ\text{C}$ . Separar la fase orgánica y evaporar a sequedad a  $60^\circ\text{C}$  con corriente suave de nitrógeno. Reconstituir la muestra con 400 µL de fase móvil agitando durante 5 minutos con agitador tipo vórtice. Inyectar 100 µL al sistema cromatográfico.



### 3.7.5.6 Sistema Cromatográfico

El sistema cromatográfico debe de constar del equipo necesario para dar las siguientes condiciones:

Flujo:	1.0 mL/min
Volumen de Inyección:	100 µL
Temperatura de la columna:	35°C
Integración:	Áreas
Respuesta:	Áreas relativas
Longitud de onda de detección (excitación):	275 nm
Longitud de onda de detección (emisión):	310 nm
Atenuación:	64
Ganancia	1000
Temperatura del inyector:	20°C

### 3.7.5.7 Cálculos

De acuerdo a la guía para la validación de métodos bioanalíticos de la FDA (mayo 2001), es posible emplear un modelo matemático sencillo que describa adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta de las muestras analizadas. El software Empower versión 5.00.00.00, empleado para el procesamiento de los resultados obtenidos, ofrece una serie de ponderaciones matemáticas que pueden ser empleadas de acuerdo a nuestras necesidades.

Para realizar el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, se empleó al logaritmo de la concentración de Metoprolol como “x” y al logaritmo de la respuesta como “y”. En base a esto, se obtienen la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Para determinar la concentración de Metoprolol en las muestras analizadas, se interpolan las respuestas de las muestras en la curva de calibración y se calcula la concentración de Metoprolol mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Log Concentración de Metoprolol (ng/mL)} = \log \frac{y - b}{m}$$

Donde:

y = respuesta de la muestra

m = pendiente de la curva

b = ordenada al origen



## 4. VALIDACIÓN

En el presente capítulo se describirá detalladamente el proceso de validación del método analítico desarrollado para cuantificar Metoprolol en plasma mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### 4.1 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Nombre: Tartrato de Metoprolol COSUFAR  
Clave: ER368  
Lote: 58A-6  
Condiciones de uso: Usar sin secar.

Nombre: Oxprenolol Clorhidrato USP  
Clave: ER367  
Lote: IOC 344  
Condiciones de uso: Usar sin secar

### 4.2 REACTIVOS

**TABLA 4.1. Reactivos Empleados en la Validación del Método.**

REACTIVO	GRADO	MARCA	LOTE
Agua	Purificada	-----	AH 2004 079, AH 2004 083, AH 2004 084, AH 2004 085, AH 2004 086
Ácido fosfórico 85%	RA ACS	Fermont	204351
Acetonitrilo	HPLC	Fermont	401132
Fosfato monobásico de potasio	RA ACS	Fermont	208601
Cafeína	USP	N/A	J
Ácido salicílico	USP	N/A	J2B147
Acetaminofén	Estándar interno secundario	N/A	ER02013-3
Butanosulfonato de sodio	RA	Sigma	110K3724
Hidróxido de potasio	RA	Fermont	138102
Cloruro de metileno	HPLC	Fermont	339531
Citrato de sodio	RA	Sigma	062K0017
E.D.T.A. sal disódica	RA	Fermont	211108
Heparina sódica	RA	Sigma	54H08751



### 4.3 EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y CONSUMIBLES

Equipo de cromatografía líquida de alta resolución equipado con lo siguiente:

**TABLA 4.2. Equipo Cromatográfico Empleado en la Validación del Método**

<b>EQUIPO CROMATOGRÁFICO</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Módulo de separación	Waters	2690
Detector de fluorescencia	Waters	474
Bomba	Waters	515
Inyector	Waters	717
<b>NOMBRE</b>	<b>MARCA</b>	<b>No. DE SERIE</b>
Computadora	Dell OptiPlex GX260	D02BLM078T
<b>NOMBRE</b>	<b>MARCA</b>	<b>VERSIÓN</b>
Software EMPOWER	Waters	5.00.00.00

Otros equipos:

**TABLA 4.3. Equipos Empleados en la Validación del Método**

<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>
Horno	PRECISION 19
Agitador Vortex multitubo	VWR / VX-2500
Centrífuga	Sorvall RT6000D
Baño de temperatura controlada	Science electro / Polytherm
Refrigerador	REVCO / REC5004A18
Ultracongelador	Nuaire

Instrumentos empleados:

**TABLA 4.4. Instrumentos Empleados en la Validación del Método**

<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>
Balanza	Mettler AE 260
Balanza granataria	OHAUS
Balanza	Mettler AM 100
Microbalanza	Mettler Toledo / UMT2
Potenciómetro	Beckman / PHI 660
Pipeta automática	Labsystems
Pipeta automática	Labsystems
Pipeta de descargas múltiples	Eppendorf

Consumibles:

**TABLA 4.5. Consumibles Empleados en la Validación del Método**

<b>CONSUMIBLES</b>		
<b>COLUMNA</b>	<b>MARCA</b>	<b>TIPO</b>
Zorbax 5µm 4.6 x 250 mm	Agilent	SB-C18
*Zorbax 5µm 4.6 x 250 mm	Agilent	SB-C18

\* Columna para evaluación de tolerancia



#### **4.4 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN EVALUADOS**

##### **4.4.1 Adecuabilidad del Sistema**

La adecuabilidad del sistema fue evaluada al inyectar al inicio de cada experimento de validación la solución de adecuación (SA) por quintuplicado.

##### **CÁLCULOS**

Se calculó el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) de la respuesta de las cinco inyecciones.

##### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

El criterio de aceptación establecido fue que el coeficiente de variación de la respuesta obtenida para los compuestos de interés sea menor o igual a 2.0%.

##### **4.4.2 Selectividad**

###### *4.4.2.1 Selectividad a la Matriz Biológica*

La selectividad a la matriz biológica se evaluó al analizar plasmas blanco provenientes de ocho diferentes donadores.

##### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

El criterio de aceptación fue que ningún plasma mostrara señales cromatográficas a los mismos tiempos de retención tanto del Metoprolol como del estándar interno (Oxprenolol).

###### *4.4.2.2 Selectividad a Fármacos y Anticoagulantes de Uso Común.*

Para evaluar la selectividad tanto a fármacos como a anticoagulantes de uso común, se prepararon de manera individual soluciones acuosas de Cafeína, Ácido Salicílico, Acetaminofén, EDTA, Heparina y Citrato de Sodio a una concentración de 0.2 mg/mL. Estas soluciones fueron inyectadas posteriormente al sistema cromatográfico.

##### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método es selectivo a los compuestos evaluados, se verificó que ninguno de ellos presentara señales a los mismos tiempos de retención tanto del Metoprolol como del estándar interno.



#### **4.4.3 Linealidad, Exactitud y Precisión**

La linealidad, exactitud y precisión del método fueron evaluadas conjuntamente durante un periodo de 3 días consecutivos de la siguiente manera:

##### *4.4.3.1 Linealidad*

Durante cada día de evaluación de dichos parámetros, se analizó una curva de calibración recién preparada.

#### **CÁLCULOS**

Para las curvas generadas, se obtuvo la ecuación de la recta por el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (x) al logaritmo de la concentración y como variable dependiente (y) al logaritmo de la respuesta. Se obtuvo la ordenada al origen (A), pendiente (B) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para cada curva individual.

Se estimó la calidad de ajuste mediante el cálculo de la concentración de las muestras al interpolar la respuesta obtenida en la misma recta generada y el porcentaje de diferencia relativa de cada concentración para cada curva individual.

#### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Los criterios de aceptación establecidos para considerar que el método es lineal fueron los siguientes:

- El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 para cada una de las curvas analizadas.
- El porcentaje de diferencia relativa de la concentración cuantificada para cada punto con respecto a la concentración nominal debe ser menor o igual al 15 % a excepción del punto de 5 ng/mL que debe ser menor o igual al 20%.

##### *4.4.3.2 Exactitud*

Para evaluar la exactitud del método se prepararon muestras adicionadas en plasma de Metoprolol a las concentraciones de 15.0, 70.0 y 300.0 ng/ mL. Las concentraciones de las muestras adicionadas fueron diferentes a las que constituyen la curva de calibración pero incluidas dentro del rango definido. Las muestras adicionadas se almacenaron en criotubos a -40°C hasta el día de su análisis.

Durante tres días consecutivos, las muestras adicionadas fueron analizadas por quintuplicado.

#### **CÁLCULOS**

Se calculó el porcentaje de diferencia relativa del promedio de cada nivel de concentración interpolada en la curva de calibración correspondiente al día de análisis, respecto a su concentración nominal.



### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método es exacto, se estableció como criterio de aceptación que el porcentaje de diferencia relativa del promedio de las concentraciones cuantificadas, para cada nivel de concentración, no fuera mayor al 15 % respecto a la concentración nominal.

#### *4.4.3.3 Precisión*

La precisión del método fue evaluada empleando las mismas muestras procesadas para el experimento de exactitud.

##### 4.4.3.3.1 Repetibilidad

### **CÁLCULOS**

Con las concentraciones de las muestras interpoladas en la curva de calibración correspondiente durante los tres días de este experimento, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada nivel probado.

### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método es preciso, el criterio de aceptación establecido fue que los valores calculados de coeficiente de variación, para cada nivel de concentración, no fueran mayores al 15 %.

##### 4.4.3.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio

### **CÁLCULOS**

Se calculó el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas para las muestras adicionadas obtenidas durante los tres días consecutivos de manera global.

### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método es preciso, el criterio de aceptación establecido fue que los valores calculados de coeficiente de variación, para cada nivel de concentración de manera global, no fueran mayores al 15 %.

#### **4.4.4 Rango**

Se consideró como el rango del método analítico a aquel intervalo de concentraciones comprendido entre 5.0 a 500.0 ng/mL a lo largo del cual se demostró linealidad, exactitud y precisión.



#### 4.4.5 Recuperación Absoluta

Para evaluar la recuperación absoluta, se prepararon soluciones de Metoprolol en plasma (muestras adicionadas) y en agua a las concentraciones de 15.0, 70.0 y 300.0 ng/mL. Las soluciones acuosas de Metoprolol contenían además Oxprenolol a la concentración de 5.0 µg/mL para evaluar también su recuperación absoluta.

Las muestras adicionadas fueron procesadas con el método desarrollado y posteriormente inyectadas en el sistema cromatográfico mientras que las soluciones acuosas fueron inyectadas directamente.

#### CÁLCULOS

Se calculó el promedio del área de las señales obtenidas de Metoprolol para cada nivel de concentración tanto para las muestras en plasma como para las acuosas. El porcentaje de recuperación absoluta para el Metoprolol se obtuvo comparando el área promedio de las soluciones en plasma contra el área promedio de las soluciones en agua.

Para evaluar el recobro del Oxprenolol, se calculó el promedio del área de las señales obtenidas de las muestras en plasma así como también el promedio del área de las señales obtenidas para las soluciones acuosas. El porcentaje de recuperación absoluta para el Oxprenolol se obtuvo comparando el área promedio de las soluciones en plasma contra el área promedio de las soluciones en agua.

Para ambos compuestos, se determinó el promedio y el C.V. del porcentaje de recuperación absoluta para cada nivel de concentración así como también el promedio y el C.V. global.

#### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para determinar que la recuperación absoluta obtenido tanto para Metoprolol como para el estándar interno son reproducibles, los criterios de aceptación establecidos fueron los siguientes:

- El coeficiente de variación del por ciento de recuperación absoluta para cada nivel de concentración no debe ser mayor al 15.0%.
- El coeficiente de variación del por ciento de recuperación absoluta obtenido entre los tres niveles de concentración evaluados no debe ser mayor al 15.0%.
- El promedio del porcentaje de la recuperación absoluta para cada nivel de concentración de Metoprolol no debe variar  $\pm 15\%$  del promedio del porcentaje de la recuperación absoluta global.

#### 4.4.6 Límite de Cuantificación

Para considerar que la concentración más baja del rango de trabajo propuesto tiene validez como límite de cuantificación, se analizó por sextuplicado una muestra adicionada a la concentración de 5.0 ng/mL.

#### CÁLCULOS

Se calculó la concentración de Metoprolol en las seis réplicas y se calculó el valor promedio, el coeficiente de variación y el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal.



#### **CRITERIO DE ACEPTACION**

Para considerar a la concentración de 5.0 ng/mL de Metoprolol como límite de cuantificación, los criterios de aceptación establecidos fueron que el porcentaje de diferencia del valor promedio cuantificado debe ser menor o igual al  $\pm 20\%$  respecto a la concentración nominal y el coeficiente de variación sea menor o igual al 20%.

#### **4.4.7 Límite de Detección**

Para establecer el límite de detección, se prepararon diluciones en plasma a partir del punto C1 de una curva de calibración (5 ng/mL) hasta obtener las concentraciones de 2.5 y 1.25 ng/mL de Metoprolol, cada una de las diluciones fue procesada por sextuplicado y posteriormente inyectadas en el sistema cromatográfico.

#### **CÁLCULOS**

Una vez obtenidos los cromatogramas, se calculó la relación señal-ruido para el pico de Metoprolol.

#### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Se consideró como el límite de detección a aquella concentración en la que la relación señal- ruido se encontrara entre 1:2 a 1:4.

#### **4.4.8 Estabilidad de las Muestras**

Para asegurar que el compuesto de interés permanece estable durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, se evaluó su estabilidad a las siguientes condiciones:

##### *4.4.8.1 Estabilidad de la Muestra a Ciclos de Congelación-Descongelación*

Las muestras adicionadas a los tres diferentes niveles de concentración (15.0, 70.0 y 300.0 ng/ mL), fueron sometidos a tres ciclos de congelación-descongelación (de  $-40^{\circ}\text{C}$  a temperatura ambiente). Una vez terminados los ciclos, las muestras fueron procesadas por triplicado y cuantificadas empleando una curva de calibración recién preparada.

#### **CÁLCULOS**

Para cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para las concentraciones interpoladas, así como también el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración cuantificada con respecto a la concentración nominal.

#### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que las muestras de Metoprolol en plasma son estables a los tres ciclos de congelación-descongelación a los que fueron sometidas, los resultados obtenidos deben de cumplir con los criterios de aceptación de las pruebas de exactitud y precisión establecidos en los puntos 4.4.3.2 y 4.4.3.3.1.



#### *4.4.8.2 Estabilidad de la Muestra a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)*

Para evaluar la estabilidad de las muestras a corto plazo, las muestras adicionadas a tres niveles de concentración (almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$ ) fueron descongeladas y colocadas en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, las muestras fueron procesadas y analizadas por triplicado. La respuesta obtenida fue cuantificada empleando una curva de calibración recién preparada.

#### **CÁLCULOS**

Para cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para las concentraciones interpoladas, así como también el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración cuantificada con respecto a la concentración nominal.

#### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que las muestras de Metoprolol en plasma son estables a temperatura ambiente durante 24 h, los resultados obtenidos deben de cumplir con los criterios de aceptación de las pruebas de exactitud y precisión establecidos en los puntos 4.4.3.2 y 4.4.3.3.1.

#### *4.4.8.3 Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección*

Para evaluar la estabilidad de las muestras después de ser procesadas, es decir, en el disolvente de inyección, las muestras adicionadas a tres niveles de concentración fueron procesadas por triplicado e inyectadas en el sistema cromatográfico, estas mismas muestras se mantuvieron en el automuestreador durante 48 h a temperatura ambiente y posteriormente fueron reinyectadas. La cuantificación de las muestras antes y después de las 48 h se realizó empleando una curva de calibración recién preparada.

#### **CÁLCULOS**

Para cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para las concentraciones interpoladas, así como también el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración cuantificada a las 48 h con respecto a la concentración cuantificada al tiempo cero.

#### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que las muestras de Metoprolol en plasma son estables durante 48 h después de haber sido procesadas se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

- El porcentaje de diferencia relativa entre la concentración cuantificada al tiempo cero con respecto al porcentaje de la concentración cuantificada después de transcurridas las 48 h, no debe ser mayor al  $\pm 15\%$ .
- Para cada nivel de concentración evaluado, el coeficiente de variación no debe de ser mayor al 15%.



#### *4.4.8.4 Estabilidad a Condiciones de Almacenamiento*

### **PARTE EXPERIMENTAL**

Con la finalidad de demostrar que las muestras de Metoprolol en plasma son estables a las condiciones en las cuales permanecieron almacenadas desde el momento de su obtención hasta el día de su análisis, se procesaron por triplicado las muestras adicionadas a tres niveles de concentración después de haber permanecido a -40°C durante 11 y 32 días. En ambos días de análisis, la cuantificación de las muestras se realizó empleando una curva de calibración recién preparada.

### **CÁLCULOS**

Para cada día de análisis y cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las concentraciones interpoladas, así como también el por ciento de diferencia relativa con respecto a la concentración nominal.

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que las muestras de Metoprolol en plasma son estables durante 11 y 32 días almacenadas a -40, los resultados obtenidos deben de cumplir con los criterios de aceptación de las pruebas de exactitud y precisión establecidos en los puntos 4.4.3.2 y 4.4.3.3.1.

#### **4.4.9 Tolerancia**

Se evaluó el grado de reproducibilidad del método analítico ante las variaciones a las cuales se contemplaba podría llegar a ser expuesto el método durante el análisis de muestras de un estudio de bioequivalencia. En base a esto, las pruebas realizadas para evaluar la Tolerancia del método analítico desarrollado fueron las que se describen a continuación.

##### *4.4.9.1 Tolerancia a Cambio de Analista.*

### **PARTE EXPERIMENTAL**

Para evaluar la Tolerancia al cambio de analista, el analista que realizó todos los experimentos de la validación proceso una curva de calibración en tanto que un segundo analista proceso las muestras adicionadas a los tres niveles de concentración por triplicado.

### **CÁLCULOS**

Las muestras procesadas por el segundo analista fueron cuantificadas empleando la curva de calibración preparada por el primer analista. Para cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las concentraciones interpoladas, así como también el porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración nominal.



### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método analítico desarrollado es tolerante al cambio de analista, los resultados obtenidos deben de cumplir con los criterios de aceptación de las pruebas de exactitud y precisión establecidos en los puntos 4.4.3.2 y 4.4.3.3.1.

#### *4.4.9.2 Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica.*

### **PARTE EXPERIMENTAL**

Para evaluar la tolerancia del método analítico al cambio de columna cromatográfica, se emplearon las mismas muestras con las que se evaluó la tolerancia al cambio de analista las cuales fueron inyectadas en una segunda columna.

### **CÁLCULOS**

Para cada nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las concentraciones interpoladas, así como también el porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración nominal.

### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Para considerar que el método analítico desarrollado es tolerante al cambio de columna cromatográfica, los resultados obtenidos deben de cumplir con los criterios de aceptación de las pruebas de exactitud y precisión establecidos en los puntos 4.4.3.2 y 4.4.3.3.1.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

En la Tabla 5.1 se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos para el Metoprolol a lo largo de la validación. Así mismo, en la Tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos para el Oxprenolol. Se observa que durante todos los días de la validación se obtuvieron coeficientes de variación de la respuesta de las cinco inyecciones sucesivas de la solución de Adecuación del Sistema (SA) menores al 2.0 %.

**TABLA 5.1. Adecuabilidad del Sistema  
Metoprolol**

DÍA DE ANÁLISIS	TIEMPO DE RETENCIÓN	K'	FACTOR DE COLEO	No. DE PLATOS TEÓRICOS (N)	C.V. DE LA RESPUESTA OBTENIDA
1	5.3	1.6	1.4	6730	0.5
2	5.6	1.6	1.4	6806	1.1
3	5.4	1.7	1.5	6375	0.3
4	5.3	1.7	1.5	4594	1.2
5	5.3	1.6	1.6	5670	1.3
6	5.3	1.7	1.7	6064	0.9
7	5.8	1.9	1.5	8846	0.6
8	5.8	1.9	1.4	11324	0.3
9	5.5	1.8	1.4	11224	0.8

**TABLA 5.2. Adecuabilidad del Sistema  
Oxprenolol**

DÍA DE ANÁLISIS	TIEMPO DE RETENCIÓN	K'	FACTOR DE COLEO	No. DE PLATOS TEÓRICOS (N)	C.V. DE LA RESPUESTA OBTENIDA
1	8.3	3.1	1.4	5672	0.6
2	8.9	3.1	1.4	5640	1.1
3	8.5	3.2	1.6	5716	0.5
4	8.4	3.2	1.4	3937	1.4
5	8.3	3.2	1.6	4799	1.6
6	8.4	3.2	1.7	4750	1.0
7	9.4	3.7	1.7	7024	0.6
8	9.3	3.7	1.6	8596	0.3
9	8.8	3.4	1.6	8951	0.6

En los días de análisis 8 y 9 se observan un incremento considerable en cuanto al número de platos teóricos, esto es debido a que en tales días de análisis se empleó una columna cromatográfica diferente a la empleada en los días 1 a 7.



## 5.2 SELECTIVIDAD

### 5.2.1 Selectividad a la Matriz Biológica

En la Figura 5.1 se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras blanco analizadas, provenientes de diferentes donadores. En los cromatogramas se observa que no existen interferencias a los tiempos de retención de los compuestos de interés.

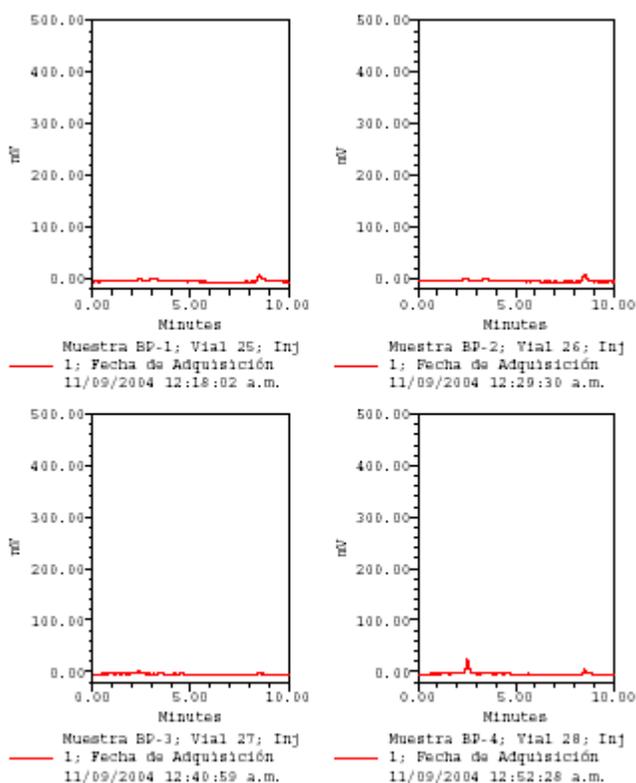
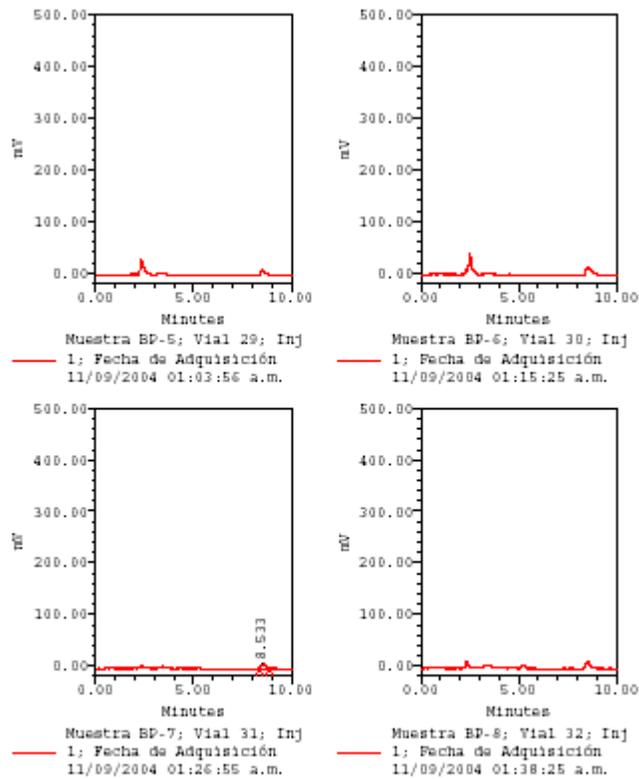


FIGURA 5.1. Selectividad a Muestras Blanco

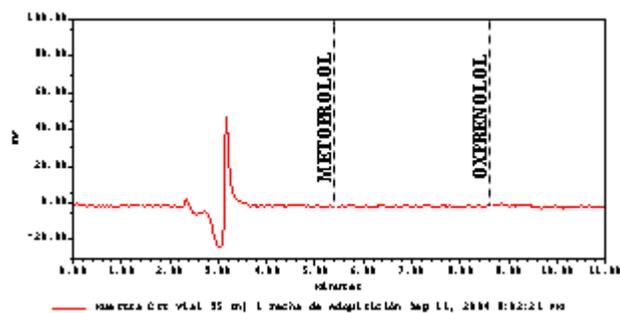




**FIGURA 5.1. Selectividad a Muestras Blanco (Continuación)**

### 5.2.2 Selectividad a Anticoagulantes

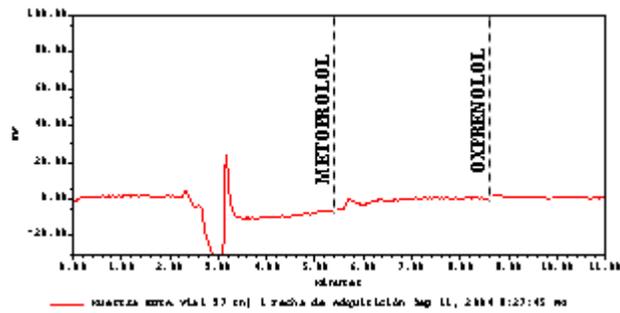
En la Figura 5.2 se muestran los cromatogramas correspondientes a las soluciones citrato de sodio, EDTA y heparina. En esta figura se puede apreciar que en los cromatogramas de los tres anticoagulantes analizados no existen interferencias a los tiempos de retención de los compuestos de interés.



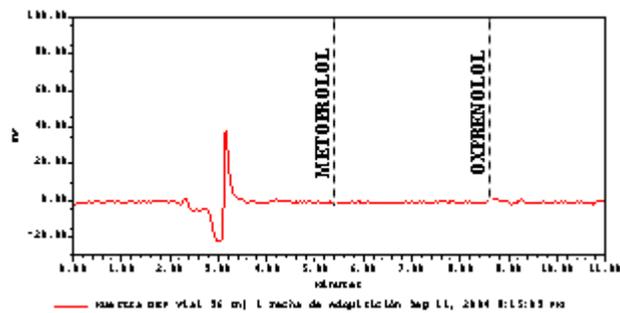
### 5.2.1. Citrato de Sodio

**FIGURA 5.2. Selectividad a Anticoagulantes**





### 5.2.2. EDTA

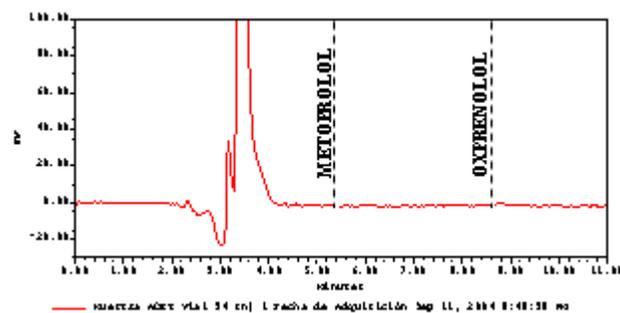


### 5.2.3. Heparina

FIGURA 5.2. Selectividad a Anticoagulantes (Continuación)

### 5.2.3 Selectividad a Fármacos de Uso Común

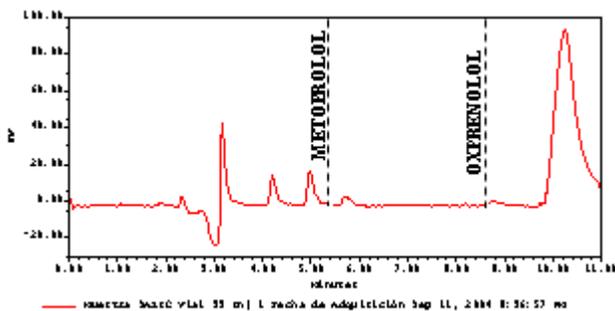
En la Figura 5.3 se muestran los cromatogramas correspondientes a las soluciones Acetaminofén, Ácido Salicílico y Cafeína. En esta figura se puede apreciar que para los casos de Acetaminofén y Cafeína no existen interferencias a los tiempos de retención de los compuestos de interés, sin embargo, en el cromatograma correspondiente a la solución de Ácido Salicílico se observan señales que podrían llegar a interferir con la cuantificación tanto del Metoprolol como del Oxprenolol por lo cual se recomienda excluir el uso de Ácido Acetilsalicílico antes y durante la toma de muestras.



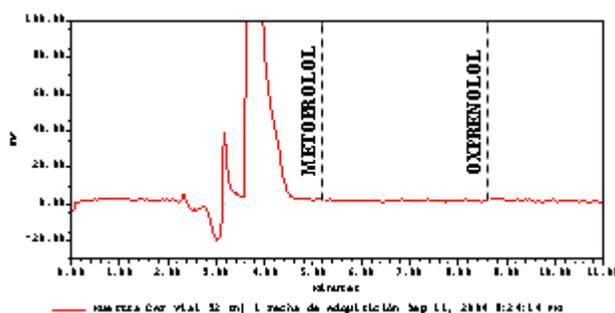
### 5.3.1. Acetaminofén

FIGURA 5.3. Selectividad a Fármacos de Uso Común





### 5.3.2. Ácido Salicílico



### 5.3.3. Cafeína

FIGURA 5.3. Selectividad a Fármacos de Uso Común (Continuación)

#### 5.3 LINEALIDAD

En la Tabla 5.3 se resumen los estadísticos de regresión de las curvas obtenidas durante tres días de análisis. En la Tabla 5.4 se muestra un resumen de los resultados de la linealidad del método.

En estas tablas se puede observar que durante los tres días de análisis, el coeficiente de determinación fue mayor a 0.98 y el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto a la concentración nominal fue menor al 20 % para el límite de cuantificación y menor al 15% para los demás puntos de la curva de calibración.

TABLA 5.3. Resumen de Estadísticos de Regresión

DÍA	PENDIENTE	ORDENADA AL ORIGEN	r <sup>2</sup>
1	1.1313	-2.2088	0.9997
2	1.0033	-1.9064	0.9994
3	1.0500	-2.0364	0.9994



TABLA 5.4. Linealidad del Método

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	DÍA	LOGARITMO DE LA CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL	RESPUESTA DE METOPROLOL	LOGARITMO DE LA RESPUESTA	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA (ng/mL)	% DE DIFERENCIA
5.0	1	0.6990	0.0357	-1.4473	4.7103	-5.8
	2		0.0597	-1.2240	4.7857	-4.3
	3		0.0514	-1.2890	5.1550	3.1
10.0	1	1.0000	0.0839	-1.0762	10.0276	0.3
	2		0.1258	-0.9003	10.0606	0.6
	3		0.0972	-1.0123	9.4468	-5.5
25.0	1	1.3979	0.2447	-0.6114	25.8163	3.3
	2		0.3509	-0.4548	27.9725	11.9
	3		0.2580	-0.5884	23.9403	-4.2
50.0	1	1.6990	0.5423	-0.2658	52.1718	4.3
	2		0.6201	-0.2075	49.3419	-1.3
	3		0.5620	-0.2503	50.2606	0.5
100.0	1	2.0000	1.1888	0.0751	104.4155	4.4
	2		1.1555	0.0628	91.7485	-8.3
	3		1.3058	0.1159	112.2065	12.2
250.0	1	2.3979	3.1942	0.5044	250.1424	0.1
	2		3.2082	0.5063	253.8819	1.6
	3		3.0952	0.4907	255.2780	2.1
500.0	1	2.6990	6.5227	0.8144	470.1792	-6.0
	2		6.3923	0.8057	504.7145	0.9
	3		5.8154	0.7646	465.4685	-6.9

#### 5.4 EXACTITUD Y PRECISIÓN

En la Tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos para los experimentos de exactitud y precisión del método.

Para el caso de la exactitud, se observó que durante los tres días de análisis, para cada uno de los tres niveles de concentración evaluados, el % de diferencia relativa del promedio no es mayor a 15 % respecto a la concentración nominal de Metoprolol.

Para el caso de la precisión se obtuvieron los siguientes resultados:

##### - Repetibilidad

Durante cada uno de los tres días de análisis, el coeficiente de variación de la concentración de Metoprolol de las cinco replicas analizadas, para cada nivel de concentración evaluado, no es mayor al 15%.

##### - Reproducibilidad Intralaboratorio

Durante los tres días de análisis consecutivos en los que fueron evaluadas la exactitud y precisión del método, el coeficiente de variación calculado de manera global para cada nivel de concentración no es mayor al 15%.



TABLA 5.5. Precisión y Exactitud del Método

DÍA DE ANÁLISIS	No DE REPLICAS	CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)		
		15.0	70.0	300.0
		CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)		
1	1	17.190	75.489	270.374
	2	17.964	73.017	267.704
	3	17.662	71.298	241.180
	4	15.579	76.408	272.765
	5	17.357	62.994	265.682
	n	5	5	5
	PROMEDIO	17.150	71.841	263.541
	D.E.	0.9	5.3	12.8
	C.V.	5.4	7.4	4.9
	% DIFERENCIA	14.3	2.6	12.2
2	1	12.908	61.820	272.900
	2	15.499	65.201	272.168
	3	13.965	61.545	354.097
	4	13.149	61.065	271.556
	5	14.065	61.369	295.674
	n	5	5	5
	PROMEDIO	13.917	62.200	293.279
	D.E.	1.0	1.7	35.5
	C.V.	7.3	2.7	12.1
	% DIFERENCIA	7.2	11.1	2.2
3	1	13.703	62.908	275.753
	2	16.596	65.381	273.765
	3	12.275	64.976	304.748
	4	12.696	57.015	264.798
	5	12.510	63.104	281.739
	n	5	5	5
	PROMEDIO	13.556	62.677	280.161
	D.E.	1.8	3.4	15.0
	C.V.	13.2	5.3	5.4
	% DIFERENCIA	9.6	10.5	6.6
RESULTADOS GLOBALES	n	15	15	15
	PROMEDIO	14.875	65.573	278.993
	D.E.	2.1	5.8	25.1
	C.V.	13.9	8.8	9.0
	% DIFERENCIA	0.8	6.3	7.0



### 5.5 RECUPERACIÓN ABSOLUTA

En la Tabla 5.6 se presentan los resultados del experimento de recuperación absoluta. En esta tabla se puede observar que el porcentaje de recuperación absoluta para el Metoprolol es de aproximadamente 75% y éste no varía  $\pm 15$  % del promedio en todos los niveles, también se puede apreciar que el C.V. del área para cada nivel de concentración evaluado no fue mayor al 15%.

**TABLA 5.6. Recuperación Absoluta de Metoprolol**  
**5.6.1. Soluciones Acuosas de Metoprolol**

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	No. DE REPLICA	ÁREA DE METOPROLOL EN SOLUCIONES ACUOSAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
15.0	1	375255.7	381518.5	6529.3	1.7
	2	388285.2			
	3	381014.6			
70.0	1	1789052.0	1803101.7	12179.3	0.7
	2	1809588.6			
	3	1810664.6			
300.0	1	7910365.0	7895231.6	18323.3	0.2
	2	7900470.3			
	3	7874859.5			

### 5.6.2. Muestras Adicionadas de Metoprolol

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	No. DE REPLICA	ÁREA DE METOPROLOL EN MUESTRAS ADICIONADAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
15.0	1	289170.5	276909.4	20791.8	7.5
	2	249393.0			
	3	264765.3			
	4	278384.7			
	5	302833.3			
70.0	1	1504798.2	1363270.6	96016.8	7.0
	2	1410192.1			
	3	1342882.4			
	4	1271916.7			
	5	1286563.5			
300.0	1	6365546.1	6030962.0	585194.1	9.7
	2	5770758.8			
	3	6538626.5			
	4	6357614.4			
	5	5122264.3			

### 5.6.3. Recuperación Absoluta

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	% DE RECUPERACIÓN ABSOLUTA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	%DIFERENCIA RESPECTO AL PROMEDIO
15.0	72.6	74.9	2.0	2.7	3.1
70.0	75.6				1.0
300.0	76.4				2.0



En la Tabla 5.7 se presentan los resultados del experimento de recuperación absoluta para el Oxprenolol. En esta tabla se puede observar que el porcentaje de recuperación absoluta para el Oxprenolol es de aproximadamente 78% y el C.V. del área para cada nivel no fue mayor al 15%.

**TABLA 5.7. Recuperación Absoluta de Oxprenolol**

**5.7.1. Soluciones Acuosas de Oxprenolol**

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	No. DE REPLICA	ÁREA DE OXPRENOLOL EN SOLUCIONES ACUOSAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
15.0	1	2240012.7	2256399.8	29052.0	1.3
	2	2239243.6			
	3	2289943.2			
70.0	1	2258295.3	2264520.0	11947.8	0.5
	2	2278294.9			
	3	2256969.9			
300.0	1	2302199.2	2296827.3	15654.3	0.7
	2	2279194.3			
	3	2309088.5			

**5.7.2. Muestras Adicionadas de Oxprenolol**

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE METOPROLOL (ng/mL)	No. DE REPLICA	ÁREA DE OXPRENOLOL EN MUESTRAS ADICIONADAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
15.0	1	1872499.5	1805246.2	199477.3	11.0
	2	1536414.6			
	3	1662687.0			
	4	2014950.4			
	5	1939679.7			
70.0	1	1827046.7	1756884.6	146497.6	8.3
	2	1777883.4			
	3	1739292.3			
	4	1523292.2			
	5	1916908.6			
300.0	1	1824992.0	1786800.3	233565.1	13.1
	2	1673145.2			
	3	2133299.3			
	4	1804649.5			
	5	1497915.6			

**5.7.3. Recuperación Absoluta**

PROMEDIO DEL ÁREA DE OXPRENOLOL EN SOLUCIONES ACUOSAS	PROMEDIO DEL ÁREA DE OXPRENOLOL EN MUESTRAS ADICIONADAS	% DE RECUPERACIÓN ABSOLUTA
2272582.4	1782977.1	78.5



### 5.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

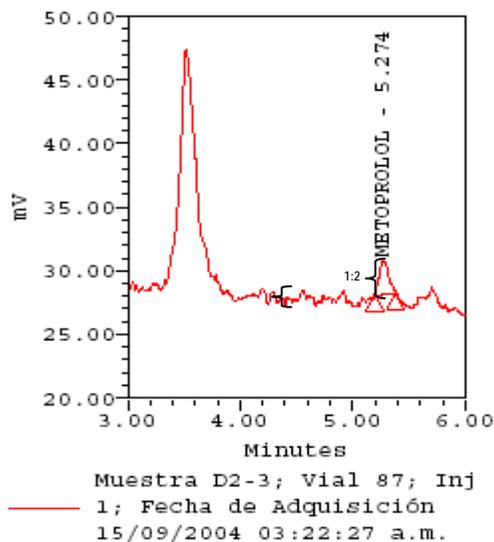
En la Tabla 5.8 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación del límite de cuantificación. En esta tabla se puede apreciar que el porcentaje de diferencia relativa del promedio de la concentración de Metoprolol cuantificada no difiere en más del 20 % respecto a la concentración nominal (5.0 ng/mL) y que el coeficiente de variación de las 6 réplicas analizadas no es mayor a 20%.

**TABLA 5.8. Límite de Cuantificación**

No. DE REPLICAS	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)
1	5.737
2	6.343
3	4.441
4	5.185
5	5.597
6	4.514
<b>n</b>	<b>6</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>5.303</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.7</b>
<b>C.V.</b>	<b>13.9</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	<b>6.1</b>

### 5.7 LÍMITE DE DETECCIÓN

En la Figura 5.4 se muestra el cromatograma de una solución de Metoprolol en plasma a una concentración de 1.25 ng/mL. En esta figura se logra apreciar que la señal de Metoprolol presenta una relación con respecto al ruido aproximadamente de 1:2 por lo que se considera a esta concentración como el límite de detección del método.



**FIGURA 5.4. Límite de Detección**



### 5.8 ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

#### 5.8.1 Estabilidad de la Muestras a Ciclos de Congelación-Descongelación

Los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras a tres ciclos de congelación-descongelación se muestran en la Tabla 5.9. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% para cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.9. Estabilidad a Ciclos de Congelación-Descongelación**

<b>CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)</b>			
<b>No DE REPLICA</b>	<b>NIVEL BAJO</b>	<b>NIVEL MEDIO</b>	<b>NIVEL ALTO</b>
1	13.242	73.535	312.157
2	15.665	77.817	277.027
3	15.833	75.674	285.626
<b>n</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>14.913</b>	<b>75.675</b>	<b>291.603</b>
<b>D.E.</b>	<b>1.4</b>	<b>2.1</b>	<b>18.3</b>
<b>C.V.</b>	<b>9.7</b>	<b>2.8</b>	<b>6.3</b>
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	<b>0.6</b>	<b>8.1</b>	<b>2.8</b>

#### 5.8.2 Estabilidad de la Muestras a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)

Los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras en la mesa de trabajo se muestran en la tabla 5.10. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% para cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.10. Estabilidad a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)**

<b>CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)</b>			
<b>No. DE REPLICA</b>	<b>NIVEL BAJO</b>	<b>NIVEL MEDIO</b>	<b>NIVEL ALTO</b>
1	13.314	65.298	277.770
2	13.018	66.436	276.902
3	13.490	64.679	229.132
<b>n</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>13.274</b>	<b>65.471</b>	<b>261.268</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.9</b>	<b>27.8</b>
<b>C.V.</b>	<b>1.8</b>	<b>1.4</b>	<b>10.7</b>
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	<b>11.5</b>	<b>6.5</b>	<b>12.9</b>



### 5.8.3 Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección

Los resultados de la estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección se muestran en la Tabla 5.11. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas después de transcurridas las 48 horas, no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración cuantificada al tiempo cero y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% para cada uno de los niveles probados

**TABLA 5.11. Estabilidad en el Disolvente de Inyección**  
**CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL**  
**(ng/mL)**

No DE REPLICA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
1	14.793	58.343	246.848
2	14.844	52.393	235.230
3	12.224	51.609	256.768
<b>n</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>13.954</b>	<b>54.115</b>	<b>246.282</b>
<b>D.E.</b>	<b>1.5</b>	<b>3.7</b>	<b>10.8</b>
<b>C.V.</b>	<b>10.7</b>	<b>6.8</b>	<b>4.4</b>
<b>CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA AL TIEMPO CERO (ng/mL)</b>	<b>13.556</b>	<b>62.677</b>	<b>280.161</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	<b>2.9</b>	<b>13.7</b>	<b>12.1</b>

### 5.8.4 Estabilidad de las Muestras durante el Almacenamiento a -40°C

En la Tabla 5.12 se muestran los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras almacenadas a -40°C durante 11 días. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% para cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.12. Estabilidad Durante 11 Días de Almacenamiento a -40°C**  
**CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL**  
**(ng/mL)**

No. DE REPLICA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
1	14.318	81.861	303.969
2	16.389	75.159	308.512
3	15.293	68.961	335.331
<b>n</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>15.333</b>	<b>75.327</b>	<b>315.937</b>
<b>D.E.</b>	<b>1.0</b>	<b>6.5</b>	<b>16.9</b>
<b>C.V.</b>	<b>6.8</b>	<b>8.6</b>	<b>5.4</b>
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	<b>2.2</b>	<b>7.6</b>	<b>5.3</b>



En la Tabla 5.13 se muestran los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 32 días. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% en cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.13. Estabilidad Durante 32 Días de Almacenamiento a  $-40^{\circ}\text{C}$**

<b>CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)</b>			
No. DE REPLICA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
1	17.047	60.227	290.350
2	13.542	63.154	284.402
3	14.721	61.468	276.850
<b>n</b>	3	3	3
<b>PROMEDIO</b>	15.103	61.616	283.867
<b>D.E.</b>	1.8	1.5	6.8
<b>C.V.</b>	11.8	2.4	2.4
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	0.7	12.0	5.4

## 5.9 TOLERANCIA

### 5.9.1 Tolerancia a Cambio de Analista

En la Tabla 5.14 se muestran los resultados de la evaluación de la tolerancia del método al cambio de analista.

En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% en cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.14. Tolerancia a Cambio de Analista**

<b>CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL (ng/mL)</b>			
No. DE REPLICA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
1	17.015	69.982	354.666
2	14.928	76.289	300.829
3	13.869	77.961	354.789
<b>n</b>	3	3	3
<b>PROMEDIO</b>	15.271	74.744	336.761
<b>D.E.</b>	1.6	4.2	31.1
<b>C.V.</b>	10.5	5.6	9.2
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	1.8	6.8	12.3



### 5.9.2 Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica

En la Tabla 5.15 se muestran los resultados de la evaluación de la tolerancia del método al cambio de columna cromatográfica. En esta tabla se puede apreciar que para cada nivel de concentración, el promedio de las concentraciones cuantificadas no difiere en  $\pm 15\%$  con respecto a la concentración nominal y que además, el coeficiente de variación de las cinco replicas no fue mayor al 15% en cada uno de los niveles probados.

**TABLA 5.15. Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica**  
**CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE METOPROLOL**  
**(ng/mL)**

No. DE REPLICA	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
1	17.298	76.191	351.400
2	15.974	78.244	301.889
3	16.056	79.126	362.014
<b>n</b>	3	3	3
<b>PROMEDIO</b>	16.443	77.854	338.434
<b>D.E.</b>	0.7	1.5	32.1
<b>C.V.</b>	4.5	1.9	9.5
<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>15.0</b>	<b>70.0</b>	<b>300.0</b>
<b>% DIFERENCIA</b>	9.6	11.2	12.8



### **5.10 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DURANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS**

Una vez que el método ha sido validado, es necesario que durante su aplicación se verifique regularmente la precisión y exactitud con la finalidad de asegurar que el método continúe funcionando satisfactoriamente. Para alcanzar este objetivo, la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (mayo 2001, págs. 14-16) recomienda tomar los siguientes cuidados durante cualquier análisis rutinario en dónde se aplique el método analítico validado:

- Evaluar la adecuabilidad del sistema al inicio de cada corrida cromatográfica.
- Evaluar la reproducibilidad del factor respuesta, ya que cambios del factor respuesta entre los resultados de la validación y los resultados de un análisis de rutina indican problemas potenciales.
- Por lo menos el 75% por ciento de los puntos que integran la curva de calibración deberán de presentar un porcentaje de diferencia entre las concentraciones interpoladas con respecto al valor teórico menor o igual al 15%. Los puntos de la curva de calibración que se encuentren fuera del criterio de aceptación, a excepción de los límites inferior y superior del rango, podrán ser descartados para realizar el análisis de regresión siempre que no sea modificado el modelo establecido.
- Emplear puntos control como criterios de aceptación para aceptar o rechazar el análisis. Los puntos control son muestras plasmáticas que contienen una concentración conocida del fármaco de interés, estos puntos control son tratados de la misma manera que las muestras por analizar y son cuantificados dentro de la misma corrida analítica. Se recomienda el uso puntos control a tres diferentes niveles de concentración, el primero deberá de contener aproximadamente el triple de la concentración del fármaco en el límite de cuantificación, el segundo deberá tener una concentración que sea de aproximadamente el valor medio del rango del método y el tercero deberá de estar cercano al nivel superior del rango del método. El número mínimo de puntos control evaluados dentro de un análisis de rutina deberá de ser del 5% del número total de muestras por analizar o un total de 6 puntos control (cualquiera que sea mayor), de los cuales un máximo del 33 % podrá diferir en un  $\pm 15\%$  del valor nominal siempre y cuando no sean de la misma concentración.

A continuación se detalla la manera en que se realizó la evaluación del método analítico validado durante su aplicación en un estudio de bioequivalencia así como los resultados obtenidos.

#### **5.10.1 Adecuabilidad del Sistema**

Durante todos los días de análisis se preparó una solución de adecuación y se realizaron 5 inyecciones sucesivas de ésta al inicio de cada corrida cromatográfica. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta cromatográfica (área) de Metoprolol. Para considerar que el sistema era adecuado, el criterio de aceptación establecido fue que el coeficiente de variación de la respuesta de Metoprolol no fuera mayor a 2.0%.

En las Tablas 5.16 y 5.17 se pueden observar los coeficientes de variación de cada análisis, en donde se aprecia que el sistema cromatográfico se comportó de manera reproducible a lo largo de todos los análisis realizados.



TABLA 5.16. Adecuabilidad del Sistema Durante el Análisis de Muestras. Metoprolol

DÍA DE ANÁLISIS	TIEMPO DE RETENCIÓN	K'	FACTOR DE COLEO	No. DE PLATOS TEÓRICOS (N)	C.V. DE LA RESPUESTA OBTENIDA
1	5.9	1.9	1.3	12050	0.9
2	5.9	2.0	1.3	12601	1.9
3	5.9	1.9	1.3	12534	0.5
4	5.7	1.8	1.4	10918	0.8
5	5.6	1.8	1.3	11555	0.5
6	5.9	1.9	1.3	12574	0.8
7	5.6	1.8	1.4	11777	1.1
8	5.8	1.9	1.3	12599	1.0
9	5.6	1.8	1.3	11700	1.1
10	5.8	1.9	1.3	12854	1.3
11	5.6	1.8	1.3	11315	1.0

TABLA 5.17. Adecuabilidad del Sistema Durante el Análisis de Muestras. Oxprenolol

DÍA DE ANÁLISIS	TIEMPO DE RETENCIÓN	K'	FACTOR DE COLEO	No. DE PLATOS TEÓRICOS (N)	C.V. DE LA RESPUESTA OBTENIDA
1	9.5	3.7	1.6	8940	1.0
2	9.5	3.7	1.6	9076	2.0
3	9.4	3.7	1.6	9305	0.8
4	9.1	3.5	1.7	7760	0.7
5	9.0	3.5	1.6	8798	0.7
6	9.4	3.7	1.6	9900	1.0
7	8.9	3.4	1.7	8620	1.6
8	9.3	3.7	1.6	9941	1.8
9	9.1	3.5	1.6	8890	1.3
10	9.3	3.6	1.6	9834	1.4
11	9.0	3.5	1.6	8768	0.9

### 5.10.2 Selectividad

Para evaluar la selectividad del método durante el análisis de las muestras biológicas del estudio de Bioequivalencia, se verificó que las muestras correspondientes al tiempo cero de la administración no presentaran señales en la región cromatográfica de los compuestos de interés (Metoprolol y Oxprenolol). En la Figura 3.13 se muestran cromatogramas tipo de muestras plasmáticas al tiempo cero de la administración para ambos periodos. Dado que para todas las muestras correspondientes al tiempo cero de la administración de todos los sujetos analizados con ambos tratamientos (medicamento de referencia y medicamento de prueba) no se observaron señales en las regiones cromatográficas del Metoprolol y el Oxprenolol, se concluye que el método fue selectivo.



### 5.10.3 Linealidad

En cada día de análisis se procesó una curva de calibración. En la Tabla 5.18 se muestran los porcentajes de diferencia del promedio de las concentraciones interpoladas con respecto a las concentraciones adicionadas mientras que en la Tabla 5.19 se muestran los estadísticos de regresión a lo largo de los análisis de muestras.

Los resultados anteriores indican que la cuantificación de Metoprolol en las muestras del Estudio de Bioequivalencia, se realizó utilizando curvas que cumplieron con los criterios de aceptación de linealidad del método, ya que el porcentaje de diferencia del promedio de las concentraciones interpoladas, para cada punto, con respecto al valor teórico fue menor al 20% para el nivel de 5 ng/mL y menor o igual a 15% para el resto de las concentraciones.

**TABLA 5.18. Linealidad del Método Durante el Análisis de Muestras**

DÍA DE ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE METOPROLOL (ng/mL)						
	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	250.0	500.0
	% DE DIFERENCIA						
1	5.2	2.1	4.3	*	12.3	4.5	6.2
2	5.9	4.0	0.8	6.9	6.8	9.5	7.1
3	15.7	*	14.5	6.2	4.4	2.4	10.0
4	0.1	3.2	10.5	11.2	1.9	*	0.7
5	7.2	4.5	7.7	9.6	8.7	2.3	7.4
6	8.2	6.5	14.0	13.6	6.3	5.8	10.0
7	3.0	2.6	3.6	3.0	1.8	2.7	1.4
8	1.4	9.0	3.8	4.4	14.9	10.9	14.3
9	1.3	5.7	7.9	2.5	*	*	0.5
10	9.2	4.2	6.0	8.3	2.9	3.9	1.3
11	9.2	10.6	2.8	0	5.1	5.7	0.5

\* Puntos de la curva de calibración eliminados para realizar la regresión debido a anomalía en los resultados.

**Tabla 5.19. Resumen de los Estadísticos de Regresión Durante el Análisis de Muestras**

DÍA DE ANÁLISIS	ORDENADA AL ORIGEN (A)	PENDIENTE (B)	R <sup>2</sup>
1	-1.9926	0.9828	0.9994
2	-2.1325	1.0890	0.9994
3	-1.9073	0.9423	0.9982
4	-1.9826	0.9945	0.9995
5	-1.9081	0.9765	0.9992
6	-2.0129	1.0164	0.9988
7	-1.9518	0.9934	0.9999
8	-1.9984	1.0536	0.9984
9	-1.8972	0.9807	0.9998
10	-1.9202	1.0020	0.9994
11	-1.8226	0.9699	0.9993
<b>PROMEDIO</b>	<b>-1.9569</b>	<b>1.0001</b>	<b>0.9992</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<b>C.V.</b>	<b>-4.1</b>	<b>4.1</b>	<b>0.1</b>



#### **5.10.4 Exactitud y Precisión**

La exactitud y la precisión del método fueron evaluadas por medio del análisis de puntos control a las concentraciones de 15, 70 y 300 ng/mL. En cada análisis se procesaron los tres niveles de concentración por triplicado y se inyectaron aproximadamente cada 10 muestras.

El criterio de aceptación que se estableció fue el siguiente:

Para cada análisis, no más de tres puntos control pueden estar fuera de  $\pm 15\%$  de la concentración nominal, y no deben ser de la misma concentración.

Las concentraciones interpoladas de los puntos control, obtenidas a lo largo del análisis de muestras del estudio de Bioequivalencia se muestran en la Tabla 5.20. En la Tabla 5.21 se muestran los porcentajes de diferencia relativa entre las concentraciones teóricas y las concentraciones cuantificadas para dichos puntos control. En las Tablas 5.20 y 5.21 se puede apreciar que para las tres concentraciones analizadas, el coeficiente de variación global y el porcentaje de diferencia del promedio de los valores obtenidos con respecto a la concentración teórica, son menores al 15%.

Los resultados anteriores indican que con el método analítico utilizado se obtuvieron resultados exactos y precisos a lo largo del análisis de las muestras del estudio de Bioequivalencia.



TABLA 5.20. Precisión del Método Durante el Análisis de Muestras

DÍA DE ANÁLISIS	RÉPLICA	Concentración teórica de Metoprolol (ng/mL)		
		15.0	70.0	300.0
		Concentración cuantificada (ng/mL)		
1	1	16.360	69.363	303.274
	2	13.258	72.590	320.038
	3	14.321	69.215	308.933
2	1	17.077	77.306	273.448
	2	15.691	64.295	237.934
3	1	14.951	85.484*	426.470*
	2	20.060*	69.662	337.342
	3	14.271	79.764	317.442
4	1	15.735	76.835	296.241
	2	15.622	70.168	299.236
	3	15.859	87.358*	296.596
5	1	14.935	74.886	347.973*
	2	15.200	72.121	288.458
	3	15.913	71.963	284.633
6	1	13.693	66.317	421.829*
	2	15.155	75.077	303.776
	3	22.514*	77.169	311.864
7	1	13.969	74.810	301.243
	2	21.136*	77.871	313.972
	3	14.113	75.018	295.569
8	1	14.230	70.037	268.125
	2	14.676	67.289	270.774
	3	14.764	62.899	266.939
9	1	14.312	73.749	308.689
	2	15.705	66.917	362.262
	3	16.190	96.943*	324.705
10	1	16.858	69.468	275.560
	2	13.207	69.342	281.273
	3	13.634	68.415	296.612
11	1	13.802	66.302	318.563
	2	11.763*	66.228	287.510
	3	14.738	74.197	289.663
<b>PROMEDIO</b>		<b>15.429</b>	<b>73.096</b>	<b>307.405</b>
<b>D.E.</b>		<b>2.2</b>	<b>7.1</b>	<b>39.4</b>
<b>C.V.</b>		<b>14.5</b>	<b>9.7</b>	<b>12.8</b>
<b>% DIFERENCIA</b>		<b>2.9</b>	<b>4.4</b>	<b>2.5</b>

\* Puntos control fuera de especificaciones.



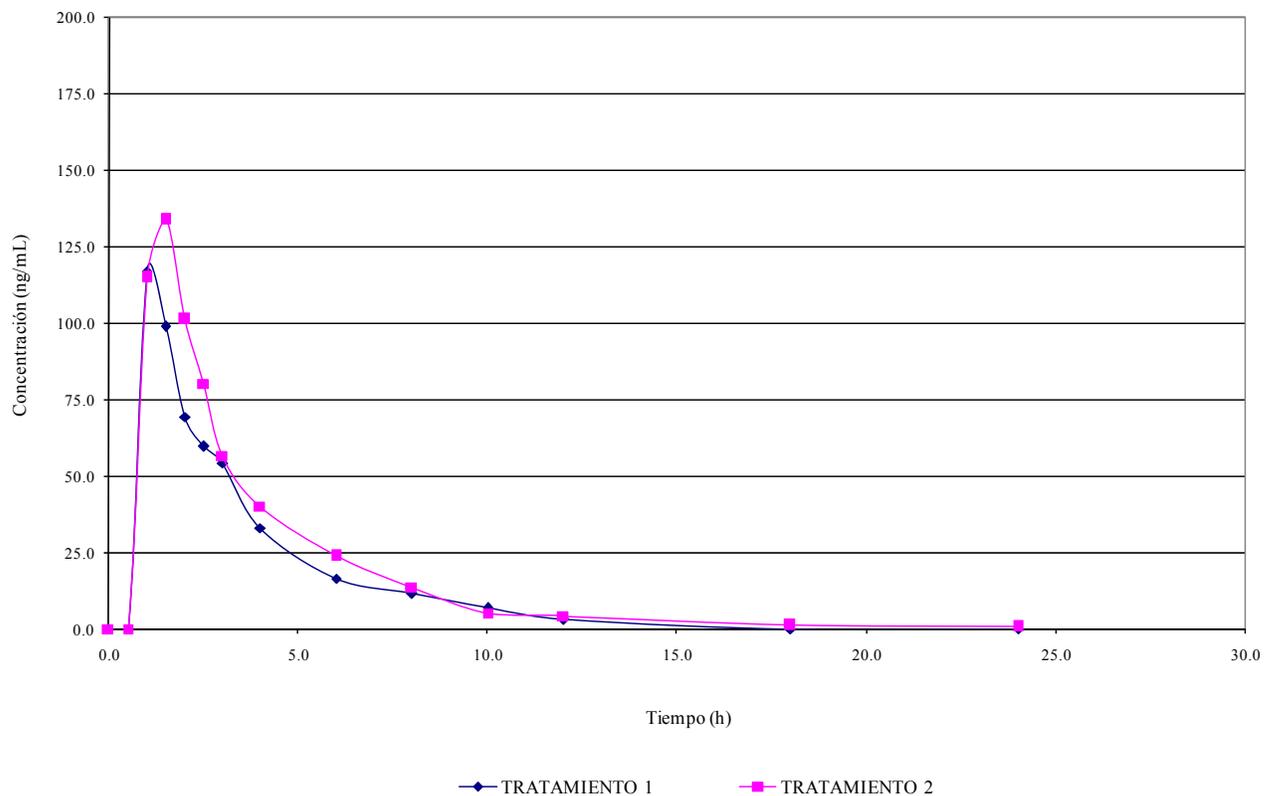
Tabla 5.21. Exactitud del Método Durante el Análisis de Muestras

DÍA DE ANÁLISIS	RÉPLICA	Concentración teórica de Metoprolol (ng/mL)		
		15.0	70.0	300.0
PORCENTAJE DE DIFERENCIA RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN TEÓRICA (%)				
1	1	9.1	0.9	1.1
	2	11.6	3.7	6.7
	3	4.5	1.1	3.0
2	1	13.9	10.4	8.9
	2	4.6	8.2	20.7
3	1	0.3	22.1*	42.2*
	2	33.7*	0.5	12.5
	3	4.9	14.0	5.8
4	1	4.9	9.8	1.3
	2	4.2	0.2	0.3
	3	5.7	24.8*	1.1
5	1	0.4	7.0	16.0*
	2	1.3	3.0	3.9
	3	6.1	2.8	5.1
6	1	8.7	5.3	40.6*
	2	1.0	7.3	1.3
	3	50.1*	10.2	4.0
7	1	6.9	6.9	0.4
	2	40.9*	11.2	4.7
	3	5.9	7.2	1.5
8	1	5.1	0.1	10.6
	2	2.2	3.9	9.7
	3	1.6	10.1	11.0
9	1	4.6	5.4	2.9
	2	4.7	4.4	20.8
	3	7.9	38.5*	8.2
10	1	12.4	0.8	8.2
	2	12.0	0.9	6.2
	3	9.1	2.3	1.1
11	1	8.0	5.3	6.2
	2	21.6*	5.4	4.2
	3	1.8	6.0	3.5

\* Puntos control fuera de especificaciones.

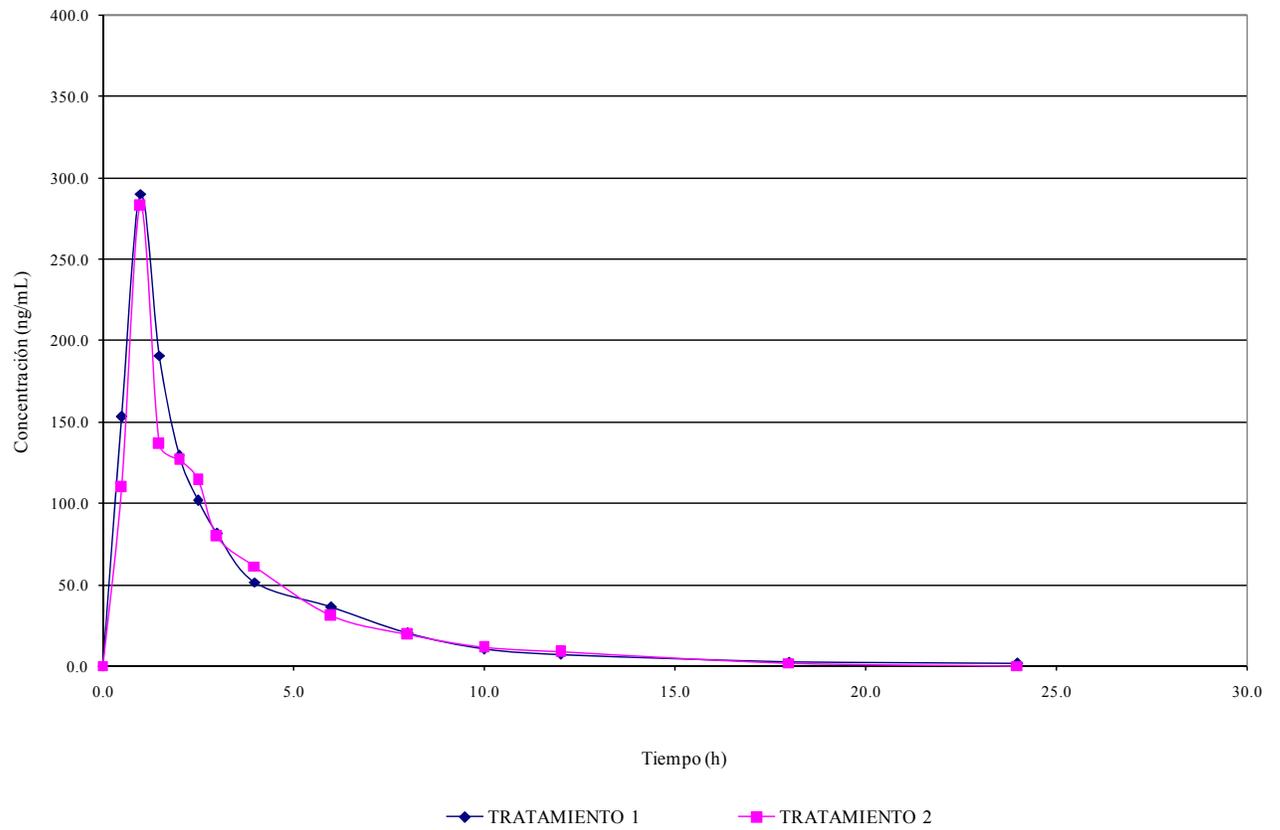


Por último, en la figuras 5.5 y 5.6 se presentan algunos ejemplos de los resultados obtenidos durante un estudio de bioequivalencia empleando el método analítico para cuantificar Metoprolol en plasma cuyo desarrollo y validación fueron el objetivo primordial del presente trabajo. En ambas figuras se demuestra que tanto la sensibilidad como el intervalo de trabajo establecidos permiten cuantificar por lo menos el 80% del área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas de Metoprolol lo que equivale a aproximadamente 4 vidas medias tal como lo estipula la NOM-177-SSA-1-1998 para el caso de muestras sanguíneas.



**FIGURA 5.5. Análisis de Muestras de Metoprolol en Plasma VOLUNTARIO 9**





**FIGURA 5.6. Análisis de Muestras de Metoprolol en Plasma VOLUNTARIO 14**



## 6. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar Metoprolol en plasma rápido, sencillo y económico el cual fue validado en base a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 “que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, así como los requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas”.

El método analítico validado presenta varias ventajas respecto a los métodos previamente reportados en la literatura (ver tabla 2.8) entre las cuales destacan las siguientes:

- El volumen de muestra requerido es menor.
- El procesamiento de las muestras involucra una extracción líquido-líquido sencilla.
- El procesamiento permite concentrar las muestras por lo que el método resulta ser lo suficientemente sensible.
- Se emplea una columna cromatográfica de fácil adquisición.

Una vez validado el método analítico propuesto, éste demostró funcionar adecuadamente durante su empleo en un estudio de bioequivalencia para Tabletas de Tartrato de Metoprolol de 100 mg. Los resultados obtenidos demuestran que el método posee la sensibilidad suficiente para lograr caracterizar el 80% de área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas de Metoprolol.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. ABAD, Francisco; Esther, MARTÍNEZ. “Estudios de Bioequivalencia: Análisis y Aspectos Metodológicos”. Serie Científica. España, 2001. p. 69-89.
2. American Society for Testing and Materials Standards. “Annual Book of: Standard Practice for Liquid Chromatography Terms and Relationships”. Vol 14.02, USA, 1996, p. 414-421.
3. ÁVILA, José; et al. “Química Orgánica. Experimentos con un enfoque ecológico”. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, 2001.
4. BRESSOLLE, Françoise; et. al. “*Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics*”. Journal of Chromatography B. Vol. 686, No. 1. 1996. p. 3-10.
5. BIDLINGMEYER, Brian. “Practical HPLC Methodology and Applications”. John Wiley & Sonns, Inc. USA, 1992.
6. Center for Drug Evaluation and Research. “Guideline for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation”. FDA. August, 2000. Consultado en <http://www.fda.gov/cber/gdlns/methval.pdf>
7. Center for Drug Evaluation and Research. “Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*”. FDA. May, 2001. Consultado en <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>
8. Center for Drug Evaluation and Research. “Guidance for Industry. Metoprolol Tartrate Tablets in vivo Bioequivalence and in vitro Dissolution”. 1992. Consultado en <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
9. Center for Drug Evaluation and Research. “Reviewer Guidance: *Validation of Chromatographic Methods*”. FDA. November, 1994, CMC 3. Consultado en <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>
10. CHAMBERLAIN, Joseph. “Analysis of Drugs in Biological Fluids”. CRC Press, Inc. USA, 1987.
11. CHIU, F.C.K.; et al. “Efficient high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of metoprolol and two main metabolites in human urine by solid-phase extraction and fluorescence detection”. Journal of Chromatography Biomedical Applications. Vol. 696, 1997. p. 69-74.
12. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. “Guía de Validación de Métodos Analíticos”. CNQFB’s México, 2002.
13. Comisión de Autorización Sanitaria. “Relación de medicamentos de Referencia”. Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. Abril, 2008.  
Consultada en <http://www.cofepris.gob.mx/pyp/gi/pdf/Innovadores%20GJ.pdf>
14. Comisión Permanente FEUM. “Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)”. Secretaría de Salud. 8ª ed. Vol. 1. México, 2004.
15. “Diccionario de Especialidades Farmacéuticas”. PLM Thomson. 51a ed. México, 2005.
16. GARCÍA J.A.; J.C, DÍEZ. “Retention Parameters in Chromatography: IUPAC Recommendations 2001”. Pure Applied Chemistry. Vol. 73, No. 6, 2001. p. 969-992.



17. GENGO, F.M; et al. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Metoprolol and  $\alpha$ -Hidroxy metoprolol Concentrations in Human Serum, Urine, and Cerebrospinal Fluid". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 73, No. 7, 1984. p. 961-963.
18. International Conference on Harmonization. "Guideline for Industry. *Text on Validation of Analytical Procedures*". ICH-Q2A. FDA. March, 1995.
19. International Conference on Harmonization. "Guidance for Industry. *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*". ICH-Q2B. FDA. November, 1996.
20. JOHNSTON, G.D.; A.S., NIES; J. GAL. "Determination of metoprolol in human blood plasma using high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. Vol. 278, 1983. p. 204-208.
21. KARNES, Thomas; et al. "*Validation of Bioanalytical Methods*". *Pharmaceutical Research*. Vol. 8, No. 4. 1991. p. 421-426.
22. KIUPEC, T; et al. . "High Performance Liquid Chromatography" en *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3a ed. Pharmaceutical Press. Vol. 1. Great Britain, 2004. p. 500-534.
23. LECAILLON, Jean-Baptiste; et al. "Determination of metoprolol and its  $\alpha$ -hydroxylated metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. Vol. 305, 1984. p. 411-417.
24. LENNARD, M.S.; J.H., SILAS. "Rapid determination of metoprolol and  $\alpha$ -hydroxy metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. Vol. 272, 1983. p. 205-209.
25. LUCH, James. "Metoprolol Tartrate" en *Analytical Profiles Drug Substances*. Vol. 12. Academic Press, INC. USA, 1983. p. 325-356.
26. MÁRQUEZ, Laura. "Manejo de fármacos en fluidos biológicos y su cuantificación por CLAR". [Tesis de licenciatura] UNAM FES Cuautitlán. México, 1996.
27. MAJORS, Ronald; et al. "Practical Guidelines for HPLC-Integrated Sample Preparation Using Column Switching" *LC-GC*. Vol. 14, No. 7, 1996. p. 554-560.
28. MOFFAT, A.C; et al. "Clarke's: Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material". Vol. 2. Third edition. Pharmaceutical Press. Great Britain, 2004.
29. NELSON, David; Michael, COX. "LEHNINGER. Principles of Biochemistry". Fourth edition. W.H. Freeman and Company. USA, 2005.
30. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Consultado en <http://www.salud.gob.mx/bv/mj/noms/177ssa1.pdf>
31. Proyecto Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004, 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. Consultado en. <http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtest/7597.66.59.4.177%2Dcomparativo.doc>



32. QUATTROCHI, Oscar; et al. "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica". Artes Gráficas Farro. Argentina, 1992.
33. SHAH, Vinod; et. al. "*Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress*". Pharmaceutical Research. Vol. 17. No. 12. 2000. p. 1551-1556
34. SKOOG, Douglas; James LEARY. "Análisis Instrumental". 4a ed. McGraw-Hill. México, 2001.
35. SHELLY, Dennis; Isiah, WARNER. "Fluorescence Detectors in High-Performance Liquid Chromatography" en Liquid Chromatography Detectors Marcel Dekker, Inc. Chromatographic Science Series. Vol. 23. USA, 1983. p. 87-123.
36. SNYDER, Lloyd; et al. "Introduction to Modern Liquid Chromatography". Second edition. Wiley & Sons. USA, 1979.
37. SNYDER, Lloyd; et al. "Practical HPLC Method Development". Wiley & Sons. USA, 1979.
38. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. "United States Pharmacopeia (USP) 29". USA, 2006.
39. WILLARD, Hobart; et al. "Métodos Instrumentales de Análisis". 7ª ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México, 1991.
40. VOET, Donald; Judith G. VOET. "Bioquímica". Omega. España, 1992.
41. YOST, R.W.; L.S., ETTRE; R.D., CONLON. "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica". Perkin-Elmer. USA, 1981.
42. YUEN, K.H.; et al. "Pharmacokinetics and Comparative Bioavailability of Two Metoprolol Tablet Preparations". Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol. 22, No. 4, 1996. p. 329-333.
43. YUEN, K.H.; et al. "Pharmacokinetics and Bioequivalent Study of a Generic Metoprolol Tablet Preparations". Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol. 24, No.10, 1998. p. 955-959.



## ANEXO 1 DEFINICIONES

<b>Alternativa farmacéutica:</b>	Productos que contienen idéntico principio activo o su precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma farmacéutica, o la misma sal o éster. Cada preparación cumple con sus especificaciones farmacopeicas particulares.
<b>Biodisponibilidad:</b>	Proporción del fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.
<b>Bioequivalencia:</b>	Relación entre dos equivalentes farmacéuticos cuando al ser administrados bajo condiciones similares producen biodisponibilidades comparables.
<b>Corrida analítica:</b>	Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.
<b>Curva de calibración:</b>	Conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.
<b>Denominación genérica:</b>	Es la denominación común internacional con la que se conoce un principio o sustancia activa, lo que se refiere a la porción fundamental de un medicamento que es la responsable de la acción terapéutica.
<b>Efecto del primer paso:</b>	Eliminación de una parte de la cantidad administrada de principio activo antes de llegar a la circulación sistémica.
<b>Equivalente farmacéuticos:</b>	Medicamentos que contienen la misma cantidad de la misma sustancia o sustancias activas, en la misma forma farmacéutica, que cumplen con las especificaciones de la FEUM. Cuando en ésta no aparezca la información, puede recurrirse a farmacopeas de otros países cuyos procedimientos de análisis se realicen conforme a especificaciones de organismos especializados u otra bibliografía científica reconocida internacionalmente.
<b>Estabilidad de la muestra:</b>	Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.



<b>Exactitud:</b>	Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
<b>Farmacocinética:</b>	Evolución temporal de un fármaco en el organismo que contempla las etapas de Administración, Disolución, Metabolismo y Excreción.
<b>Límite de detección:</b>	Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.
<b>Límite de cuantificación:</b>	Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
<b>Linealidad:</b>	Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.
<b>Matriz biológica:</b>	Material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés.
<b>Medicamento genérico intercambiable:</b>	Especialidad farmacéutica con el mismo fármaco o sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y con especificaciones farmacopeicas iguales o comparables, que después de cumplir con las pruebas reglamentarias requeridas, ha comprobado que sus perfiles de disolución o su biodisponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a las del medicamento innovador o producto de referencia, y que se encuentra registrado en el Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables, y se identifica con su denominación genérica.
<b>Medicamento innovador:</b>	Medicamento que cuenta con la patente original a nivel mundial.
<b>Medicamento de prueba:</b>	Al medicamento proveniente de un lote fabricado a escala industrial o de un tamaño menor, siempre y cuando el equipo, el método de manufactura, la calidad y los perfiles de disolución se conserven, que cumple los estándares de calidad oficiales establecidos en la FEUM y se fabrica conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993.
<b>Medicamento de referencia:</b>	Medicamento indicado por la Secretaría de Salud como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, se encuentra disponible comercialmente y es seleccionado conforme a los siguientes criterios:



1. Medicamento innovador. En caso de no existir, cualquiera de los siguientes en el orden en que aparecen:

1.1. Producto cuya bioequivalencia esté determinada.

1.2. Producto que cuente con el registro más antiguo ante la autoridad sanitaria y que haya demostrado su eficacia y seguridad.

1.3. Producto con una correlación *in vitro* - *in vivo* establecida.

**Muestras control:** Muestras de concentración alta, media y baja conocidas, que están dentro del intervalo de la curva de calibración y que se cuantifican durante cada corrida analítica para corroborar la validez del método, éstos constituyen los puntos de control de calidad.

**Perfil de disolución:** Determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica.

**Precisión:** Al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

**Productos equivalentes:** Equivalentes farmacéuticos 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 experimentales similares.

**Rango:** Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

**Recuperación absoluta:** Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

**Repetibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.



- Reproducibilidad intralaboratorio:** Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.
- Selectividad:** Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.
- Sustancia de referencia:** La sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación.
- Tolerancia:** Capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.
- Validación:** Evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.



## ANEXO 2

### SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\pm$	Más, menos
%	Por ciento
ABC	Área Bajo la Curva
ACN	Acetonitrilo
ACS	American Chemical Society (Specification of reagents according to ACS)
ASTM	American Society for Testing and Materials
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C <sub>máx</sub>	Concentración plasmática máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
COSUFAR	Comité Mexicano de Sustancias Farmacéuticas de Referencia
C.V.	Coficiente de Variación
D.E.	Desviación Estándar
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference Harmonization
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
L	Litros
M	Molar
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
n	Número de datos
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
R	Coficiente de regresión
RA	Reactivo Analítico
t <sub>1/2</sub>	Vida media de eliminación
t <sub>máx</sub>	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
USP	United States Pharmacopoeia



### ANEXO 3

## LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1	Clasificación de los Métodos Cromatográficos en Columna
TABLA 2.2	Tipos de Relleno de Fase Enlazada y Aplicaciones
TABLA 2.3	Técnicas Empleadas para la Precipitación de Proteínas
TABLA 2.4	Longitudes de Onda de Máxima Absorción UV y Absortividades Molares del Tartrato de Metoprolol
TABLA 2.5	Asignación Espectral de las Principales Bandas de Absorción del Tartrato de Metoprolol
TABLA 2.6	Constantes de Disociación del Tartrato de Metoprolol
TABLA 2.7	Solubilidad del Tartrato de Metoprolol
TABLA 2.8	Métodos Analíticos Reportados en la Literatura para Cuantificar Metoprolol en Fluidos Biológicos Mediante CLAR
TABLA 3.1	Establecimiento de las Condiciones de Detección
TABLA 3.2	Establecimiento de los Parámetros de Detección
TABLA 3.3	Métodos Analíticos Evaluados para Cuantificar Metoprolol en Plasma Mediante CLAR
TABLA 3.4	Preparación de la Curva de Calibración
TABLA 3.5	Preparación de Puntos Control
TABLA 4.1	Reactivos Empleados en la Validación del Método
TABLA 4.2	Equipo Cromatográfico Empleado en la Validación del Método
TABLA 4.3	Equipos Adicionales Empleados en la Validación del Método
TABLA 4.4	Instrumentos Empleados en la Validación del Método
TABLA 4.5	Consumibles Empleados en la Validación del Método
TABLA 5.1	Adecuabilidad del Sistema. Metoprolol
TABLA 5.2	Adecuabilidad del Sistema. Oxprenolol
TABLA 5.3	Resumen de Estadísticos de Regresión
TABLA 5.4	Linealidad del Método
TABLA 5.5	Precisión y Exactitud del Método
TABLA 5.6	Recuperación Absoluta de Metoprolol
TABLA 5.6.1	Soluciones Acuosas de Metoprolol
TABLA 5.6.2	Muestras Adicionadas de Metoprolol
TABLA 5.6.3	Recuperación Absoluta
TABLA 5.7	Recuperación Absoluta de Oxprenolol
TABLA 5.7.1	Soluciones Acuosas de Oxprenolol
TABLA 5.7.2	Muestras Adicionadas de Oxprenolol



TABLA 5.7.3	Recuperación Absoluta
TABLA 5.8	Límite de Cuantificación
TABLA 5.9	Estabilidad a Ciclos de Congelación-Descongelación
TABLA 5.10	Estabilidad a Corto Plazo (Temperatura Ambiente)
TABLA 5.11	Estabilidad en el Disolvente de Inyección
TABLA 5.12	Estabilidad Durante 11 Días de Almacenamiento a -40°C
TABLA 5.13	Estabilidad Durante 32 Días de Almacenamiento a -40°C
TABLA 5.14	Tolerancia a Cambio de Analista
TABLA 5.15	Tolerancia a Cambio de Columna Cromatográfica
TABLA 5.16	Adecuabilidad del Sistema Durante el Análisis de Muestras. Metoprolol
TABLA 5.17	Adecuabilidad del Sistema Durante el Análisis de Muestras. Oxprenolol
TABLA 5.18	Linealidad del Método Durante el Análisis de Muestras
TABLA 5.19	Resumen de los Estadísticos de Regresión Durante el Análisis de Muestras
TABLA 5.20	Precisión del Método Durante el Análisis de Muestras
TABLA 5.21	Exactitud del Método Durante el Análisis de Muestras



## ANEXO 4

### LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Evaluación de una Banda de Solutos para Determinar la Eficiencia de una Columna Cromatográfica
FIGURA 2.2	Separación Cromatográfica de Dos Sustancias
FIGURA 2.3	Pico Cromatográfico Asimétrico
FIGURA 2.4	Instrumentación Empleada en CLAR
FIGURA 2.5	Componentes de la Sangre y Plasma Humanos
FIGURA 2.6	Estructura Molecular del Tartrato de Metoprolol
FIGURA 2.7	Espectro de Absorción UV del Tartrato de Metoprolol en HCl 0.1N
FIGURA 2.8	Espectro de Absorción Infrarrojo del Tartrato de Metoprolol
FIGURA 2.9	Espectro de Fluorescencia del Tartrato de Metoprolol
FIGURA 2.10	Selección de Técnicas Cromatográficas
FIGURA 3.1	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Acetonitrilo (Blanco Plasma)
FIGURA 3.2	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Acetonitrilo (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.3	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Etanol (Blanco Plasma)
FIGURA 3.4	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Etanol (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.5	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Metanol (Blanco Plasma)
FIGURA 3.6	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Metanol (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.7	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Ácido Perclórico (Blanco Plasma)
FIGURA 3.8	Columna Spherisorb CN. Precipitación con Ácido Perclórico (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.9	Columna Spherisorb CN. Ultrafiltración (Blanco Plasma)
FIGURA 3.10	Columna Spherisorb CN. Ultrafiltración (Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.11	Columna YMC CN. Precipitación con Ácido Perclórico (Blanco Plasma y Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.12	Columna YMC CN. Ultrafiltración (Blanco Plasma y Metoprolol en Plasma 100 ng/mL)
FIGURA 3.13	Columna Zorbax SB-C18. Extracción Líquido-Líquido. Cromatogramas tipo de Blancos de Plasma
FIGURA 3.14	Columna Zorbax SB-C18. Extracción Líquido-Líquido. Cromatograma tipo de Metoprolol en Plasma
FIGURA 5.1	Selectividad a Muestras Blanco



FIGURA 5.2	Selectividad a Anticoagulantes
FIGURA 5.2.1	Citrato de Sodio
FIGURA 5.2.2	EDTA
FIGURA 5.2.3	Heparina
FIGURA 5.3	Selectividad a Fármacos de Uso Común
FIGURA 5.3.1	Acetaminofén
FIGURA 5.3.2	Ácido Salicílico
FIGURA 5.3.3	Cafeína
FIGURA 5.4	Límite de Detección
FIGURA 5.5	Análisis de Muestras de Metoprolol en Plasma. Voluntario 9
FIGURA 5.6	Análisis de muestras de Metoprolol en Plasma. Voluntario 14

