



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC PARA
DETERMINAR SIMULTÁNEAMENTE MELOXICAM Y
KETOROLACO EN PLASMA HUMANO Y EN GEL DE
USO TÓPICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CECILIA ROSAS TOXTLE



MÉXICO, D.F.

2013



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: M. EN C. MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ

VOCAL: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

SECRETARIO: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

1er. SUPLENTE: M. EN C. KENNETH RUBIO CARRASCO

2° SUPLENTE: Q.F.B. CAROLINA FLORES ÁVILA

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN
FARMACOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**

ASESORA: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. ARIADNA NATALIA CERVANTES NEVÁREZ

SUSTENTANTE: CECILIA ROSAS TOXTLE

Índice

Abreviaturas	VI
Resumen	VIII
Capítulos	
1. ANTECEDENTES	9
1.1 Aspectos generales de cromatografía	9
1.1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	9
1.1.2 Instrumentación	10
1.2 Vías de administración.....	12
1.3 Farmacocinética.....	13
1.3.1 Liberación	13
1.3.2 Absorción	14
1.3.3 Distribución	15
1.3.4 Biodisponibilidad.....	16
1.3.5 Metabolismo de fármacos.....	18
1.3.6 Excreción	19
1.4 Antiinflamatorios no esteroidales (AINES).....	20
1.4.1 Ketorolaco trometamina.....	21
1.4.1.1 Propiedades farmacológicas.....	21
1.4.1.2 Vía de administración y dosis	22
1.4.1.3 Farmacocinética.....	22
1.4.2 Meloxicam.....	23
1.4.2.1 Propiedades farmacológicas.....	24
1.4.2.2 Vía de administración y dosis	24
1.4.2.3 Farmacocinética.....	24
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. OBJETIVO GENERAL.....	25
3.1 Objetivos particulares	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS	26
4.1 Reactivos y estándares de referencia	26
4.2 Matriz biológica	26
4.3 Forma farmacéutica	26
4.4 Equipos e Instrumentos	27
4.5 Material	27

4.6 Preparación de soluciones	27
4.6.1 Soluciones estándares para la validación del método analítico en plasma	29
4.6.2 Soluciones estándares para la validación del método analítico de una formulación en gel	31
4.7 Métodos de extracción de KET y MEL	34
4.7.1 Condiciones cromatográficas	35
4.7.2 Validación y criterios de aceptación del método analítico para cuantificar KET y MEL en plasma	35
4.7.3 Validación y criterios de aceptación del método analítico para cuantificar KET y MEL en una formulación de gel	41
4.8 Método de procesamiento de datos	43
5.1 Validación del método analítico para cuantificar KET y MEL en plasma	44
5.1.1 Selectividad	44
5.1.3 Recuperación absoluta	55
5.1.4 Precisión y Exactitud	56
5.1.4.1 Repetibilidad	56
5.1.4.2 Reproducibilidad	57
5.1.5 Límite de cuantificación	58
5.1.6 Límite de detección	58
5.1.7 Estabilidad	59
5.1.8 Tolerancia	62
5.1.9 Efecto de dilución (1:2)	63
5.2 Métodos analíticos reportados para cuantificar KET y MEL presente en plasma humano	64
5.3 Validación del método analítico para cuantificar KET y MEL en formulación de gel	66
5.3.1 Selectividad	66
5.3.2 Linealidad sistema de KET	66
5.3.2.1 Identidad de la recta de KET	67
5.3.3 Linealidad del sistema de MEL	68
5.3.3.1 Identidad de la recta de MEL	69
5.3.4 Recuperación absoluta	70
5.3.5 Precisión y Exactitud	71

5.3.5.1 Repetibilidad	71
5.3.5.2 Reproducibilidad interdía	71
5.3.6 Límite de cuantificación (LC)	71
5.3.7 Límite de detección (LD)	72
5.3.8 Estabilidades	73
5.3.8.1 Estabilidad de muestra procesada.....	73
5.3.8.2 Estabilidad en solución	73
5.3.9 Tolerancia al cambio de proporción en la fase móvil	74
6. Conclusiones	76
7. Bibliografía	77

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
bco.	Blanco
CA	Control alto
CB	Control bajo
CC	Curva de calibración
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CM	Control medio
Cmáx.	Concentración máxima alcanzada
C.V.	Coefficiente de variación
CL	Cromatografía líquida
COX	Ciclooxigenasa
E.E.	Error estándar
EI	Estándar interno
GI	Gastrointestinales
°C	Grados Celsius
g/mol	Gramo por mol
HPLC	High performance liquid chromatography
h	Hora
KET	Ketorolaco
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
M	Molar
MEL	Meloxicam
MeOH	Metanol
min	Minuto
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
mL	Mililitro

mm	Milímetro
µg/mL	Microgramo por mililitro
µm	Micrómetro
µV	Microvolt
ng/mL	Nanogramo por mililitro
pH	Potencial de hidrógeno
Sol. de ref.	Solución de referencia
v/v	Volumen-volumen

Resumen

El propósito del presente estudio fue desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de Ketorolaco y Meloxicam en plasma humano en base a la norma NOM-177-SSA1-1998 y en una formulación de gel tópico como control de calidad de la forma farmacéutica.

El Ketorolaco es un analgésico no esteroideo el cual puede ser administrado vía intravenosa, intramuscular u oral como sal de trometamina soluble en agua. Para tratar dolor moderado o en combinación con dosis reducidas de opioides para dolores severos. El Meloxicam es un agente anti-inflamatorio no esteroideo que se utiliza para aliviar los síntomas de la artritis, dismenorrea primaria o fiebre si se presenta con un cuadro inflamatorio. El mecanismo de acción de ambos está relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandina e inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2).

Mediante un método por HPLC sencillo se validó el método analítico para la determinación simultánea de Ketorolaco (KET) y Meloxicam (MEL) en plasma de acuerdo a los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-1998. Se realizó para ello, una extracción con una mezcla de metil-terbutil-éter y éter dietílico, los extractos se inyectaron a un sistema cromatográfico. La detección se llevó a cabo por absorción a 313 y 360 nm para KET y MEL, respectivamente. El método analítico demostró ser lineal, preciso, exacto y confiable en un rango de concentraciones de 14.29 a 715.71 ng/mL y de 35.71 a 1082.86 ng/mL, el recobro fue del 91.9% y de 97.3% para KET y MEL, respectivamente, por lo tanto se concluye que el método es confiable para la realización de estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad, de monitoreo y de seguridad.

Para la determinación en una formulación de gel de ambos analitos, se emplearon las mismas condiciones cromatográficas que en el plasma, se extrajeron con metanol e hidróxido de sodio y se inyectaron al cromatógrafo. La linealidad del sistema se obtuvo en un rango de concentración de 0.36 a 9.03 µg/mL y de 1.09 a 27.17 µg/mL, con un recobro de 100.7% y 100.9% para KET y MEL, respectivamente. El método empleado para evaluar la forma farmacéutica fue reproducible, preciso y exacto.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos generales de cromatografía

La cromatografía es un procedimiento de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en una técnica analítica de primera elección para identificar y cuantificar los compuestos de una fase homogénea líquida o gaseosa. El principio básico se fundamenta en equilibrios de concentración de los compuestos presentes en dos fases no miscibles; una llamada estacionaria que se encuentra inmovilizada en una columna o fija sobre un soporte y la otra llamada móvil la cual se desplaza al contacto con la primera. La mezcla a ser separada es introducida en la fase móvil que es inducida a moverse a través de la fase estacionaria. Los componentes de la mezcla se separan debido a su diferente afinidad por la fase estacionaria, lo cual provoca que se transporten a diferentes velocidades en la fase móvil. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicación y por ello ocupa una posición dominante. ^[1]

1.1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o bien high-performance liquid chromatography (HPLC por sus siglas en inglés), es una técnica que se emplea para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. Consta de una fase móvil líquida interactiva en adición a una fase estacionaria activa, en donde la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como mezcla de solutos. Los tipos de CLAR suelen clasificarse según el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria, pudiendo ser ambas fases líquidas (Cromatografía Líquido/Líquido-CLL) en la cual el proceso de separación es mediante un proceso de partición. La fase móvil eluyente (es un líquido) y la fase estacionaria (es un sólido) (Cromatografía Líquido/Sólido-CLS), en la cual el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción, intercambio iónico ó exclusión por tamaño.

1.1.2 Instrumentación

La estructura básica de la CLAR consiste de un sistema de bombeo para la fase móvil, inyector, columna, detector, sistema de registro y manejo de datos (Figura 1).

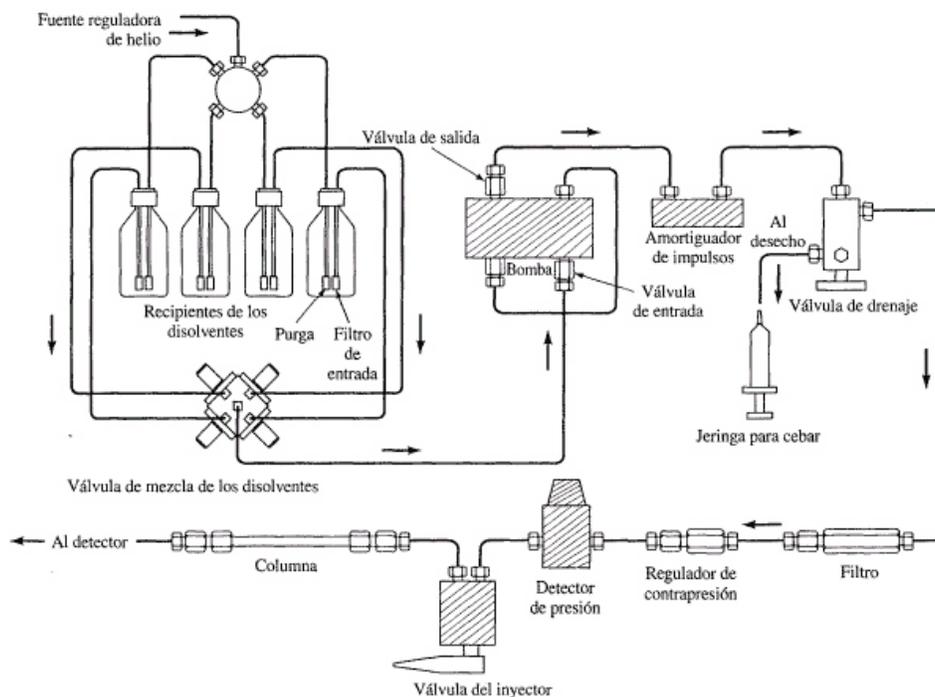


Figura 1. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un aparato de CLAR típico. [3]

Las bombas conforman el sistema de bombeo que provee una alta presión para empujar la fase móvil a través de la columna cromatográfica con capacidad para llevar a cabo un cambio gradual de los componentes de la fase móvil con el tiempo. Tiene una salida libre de pulsos que alcanza velocidades de flujo de 0.1-10 mL/min; posee una reproducibilidad relativa de los flujos de 0.5% o mejor y es resistente a la corrosión por diversos solventes.

El inyector tiene como función introducir la muestra dentro de la línea de alta presión donde se encuentra la corriente del disolvente que llega a la columna de acero inoxidable, en la cual se encuentra empacada la fase estacionaria para poder llevar a cabo la separación. Una vez separados los componentes de

la muestra, pasan al detector el cual debe ser sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, dar una respuesta lineal (señal proporcional a la concentración del analito) en un amplio intervalo de concentraciones, y no generar ensanchamiento de los picos de elución; asimismo no debe detectar los cambios de temperatura y de composición del solvente. ^[2]

Dependiendo de la selectividad y sensibilidad que se requiera se pueden emplear varios tipos de detectores, entre los más comunes se encuentran:

- *Detector de UV-Visible.* El más usado en CL, su respuesta se fundamenta en la absorbancia que presentan la mayoría de los compuestos orgánicos a una longitud de onda determinada, son satisfactorios para la elución en gradiente con solventes que no absorben. Se utiliza para todas aquellas sustancias que tienen uno o más dobles enlaces conjugados y los compuestos con electrones no enlazados y no compartidos.
- *Detector de Índice de Refracción.* Mide la refracción del disolvente a causa de las moléculas del analito, es general, no selectivo, y responde a la presencia de todos los solutos, siendo utilizado para analizar sustancias que no absorben en el UV como carbohidratos, lípidos y polímeros, entre otros. Su desventaja es que posee una sensibilidad hasta cierto punto limitada,^[3] ya que es de unas mil veces menor a un detector UV y no es útil para la elución en gradiente.
- *Detector electroquímico.* Es bastante selectivo, porque solo ciertos analitos se oxidan o se reducen con facilidad.^[2] Estos detectores son simples y se basan en medidas potenciométricas, conductométricas y voltamétricas. Entre los compuestos típicos que se analizan se incluyen las aminas aromáticas y sus derivados.^[3]
- *Detectores de fluorescencia.* Son especialmente sensibles, pero responden solo a la muy limitada gama de analitos que fluorescen.

Para incrementar la aplicación de los detectores electroquímicos y de fluorescencia, es posible unir a los analitos deseados grupos químicos que sean electro activos o fluorescentes.^[2]

- Detector selectivo de masas. Provee información estructural que ayuda a la identificación del analito de interés.

1.2 Vías de administración

Un fármaco puede introducirse al organismo en forma de gas, solución, suspensión, o en estado sólido. En estos dos últimos, la rapidez con la cual el fármaco se disuelve en los líquidos biológicos o es extraído de los mismos, es un factor importante en la velocidad de absorción.

La rapidez de absorción depende de diferentes factores como pueden ser:

- La velocidad de disolución de la matriz, en el caso de los fármacos sólidos.
- La vascularización del sitio de administración y el área de la superficie absorbente.

Las vías de administración de fármacos utilizadas para lograr sus efectos sistémicos pueden dividirse en dos grupos:

- Entérica (usa el tubo gastrointestinal)
- Parenteral (se inyecta el producto o se inhala)

Cuando un fármaco se absorbe desde el estómago o los intestinos, antes de entrar a la circulación general pasa por el sistema porta hepático. El hígado es el sitio principal de metabolismo de los fármacos, por lo que metaboliza una gran cantidad de los mismos.

Un fármaco administrado por vía parenteral, se puede introducir directamente en la circulación a través de una arteria o vena, en sitios subcutáneos o intramusculares. La administración intravenosa tiene la ventaja de la rapidez, precisión y disposición completa del fármaco; sin embargo, puede producir efectos cardiovasculares adversos. La absorción de los fármacos de los sitios subcutáneos e intramusculares depende de la vascularización local del tejido y de la capacidad del fármaco para penetrar en la membrana de los capilares, la cual suele ser rápida.^[7]

Aplicación local (tópica en piel). Se recurre a esta vía cuando se busca un efecto local en la piel. No obstante, puede producirse una absorción apreciable y dar lugar a efectos sistémicos. Pocos medicamentos penetran fácilmente por la piel intacta: su absorción es proporcional al área de superficie en que se aplican y también a su liposolubilidad, ya que la epidermis se comporta como una barrera para los lípidos. Sin embargo, la dermis es muy permeable a muchos solutos; como consecuencia, la absorción sistémica de fármacos se produce con mucha mayor facilidad por abrasiones, quemaduras o zonas cruentas de la piel. La inflamación y otros cuadros que intensifican el flujo de sangre por la piel también incrementan la absorción. La piel hidratada es más permeable que la seca y por ello se puede modificar una presentación medicamentosa o utilizar un apósito oclusivo para facilitar la absorción.

1.3 Farmacocinética

Durante la última década, la aplicación de los datos farmacocinéticos en el desarrollo de formas farmacéuticas se ha incrementado gradualmente. Hoy en día es bien reconocido que los programas de desarrollo de fármacos incluyen los datos farmacocinéticos de apoyo. La farmacocinética sirve como una herramienta útil en el proceso de desarrollo de fármacos, tanto en términos de la terapéutica y en la definición de las características de disposición de medicamentos.^[4]

La farmacocinética se puede explicar a través de los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos, los cuales determinan la rapidez y el tiempo en el que el medicamento se presenta en el órgano blanco, en donde debe alcanzar una concentración (la cual también está en función de la dosis administrada) adecuada para producir sus efectos característicos.^[5]

1.3.1 Liberación

Constituye la “salida” del fármaco de la forma farmacéutica que lo contiene. Por lo general, implica la disolución del fármaco en algún medio corporal. Mediante la aplicación de procesos farmacotécnicos adecuados se puede conseguir

modular la velocidad de liberación, pudiéndose liberar rápidamente o de forma alternativa efectuarse de modo lento.

Entre los factores que influyen en la velocidad de liberación pueden citarse los siguientes:

- Tamaño de partícula del fármaco
- Solubilidad del fármaco
- Formulación del medicamento
- Tecnología farmacéutica
- Tipo de forma farmacéutica

La velocidad de liberación de las diferentes formas galénicas o farmacéuticas mantiene el siguiente orden de mayor a menor: soluciones acuosas, emulsiones, soluciones oleosas, emulsiones acuosas/oleosas, suspensiones acuosas y suspensiones oleosas para las formas líquidas.

En el caso de las formas sólidas: polvos y granulados, cápsulas de gelatina duras, comprimidos y grageas.

1.3.2 Absorción

Por lo regular los fármacos se introducen en un organismo en sitios alejados de su lugar de acción y salvo que se administren por vía intravenosa, deben pasar al sistema circulatorio. El proceso completo se denomina absorción.

El desplazamiento activo de un fármaco por todo el organismo depende de su polaridad y sus características iónicas. Existen diversos factores que influyen en la absorción de un fármaco como pueden ser:^[5]

- La vía de administración
- Propiedades fisicoquímicas del fármaco.
- pH en el sitio de absorción

Capacidad para atravesar membranas (difusión pasiva, transporte mediado por acarreador, difusión facilitada, transporte activo, pinocitosis).

1.3.3 Distribución

Una vez que el fármaco está en la circulación se distribuye por todos los órganos y tejidos corporales, incluyendo aquellos que no son importantes para su acción farmacológica o terapéutica.

Volumen aparente de distribución (Vd)

El Vd es un parámetro definido como la cantidad de fluido en la que aparentemente se disuelve el fármaco después de su administración. En el caso del abordaje no compartimental, este parámetro se calcula por el método del área bajo la curva de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Vd = \frac{D}{ABC \cdot k_e}$$

Factores que influyen en la distribución:

- Edad, sexo, enfermedades y composición corporal del individuo
- Flujo sanguíneo en los tejidos
- Unión a proteínas plasmáticas (la fracción de fármaco libre es la que se va a difundir)
- Velocidad de difusión del fármaco en los tejidos
- Características fisicoquímicas del fármaco (liposolubilidad, peso molecular, grado de ionización)

Después de su detección en el plasma, el fármaco entra o sale en forma reversible de los compartimentos corporales. Los dos procesos unidireccionales comprenden el metabolismo, en el cual el medicamento es transformado en otro compuesto y la excreción es el mecanismo por el cual es expulsado el fármaco del cuerpo, (ver figura 2).^[6]

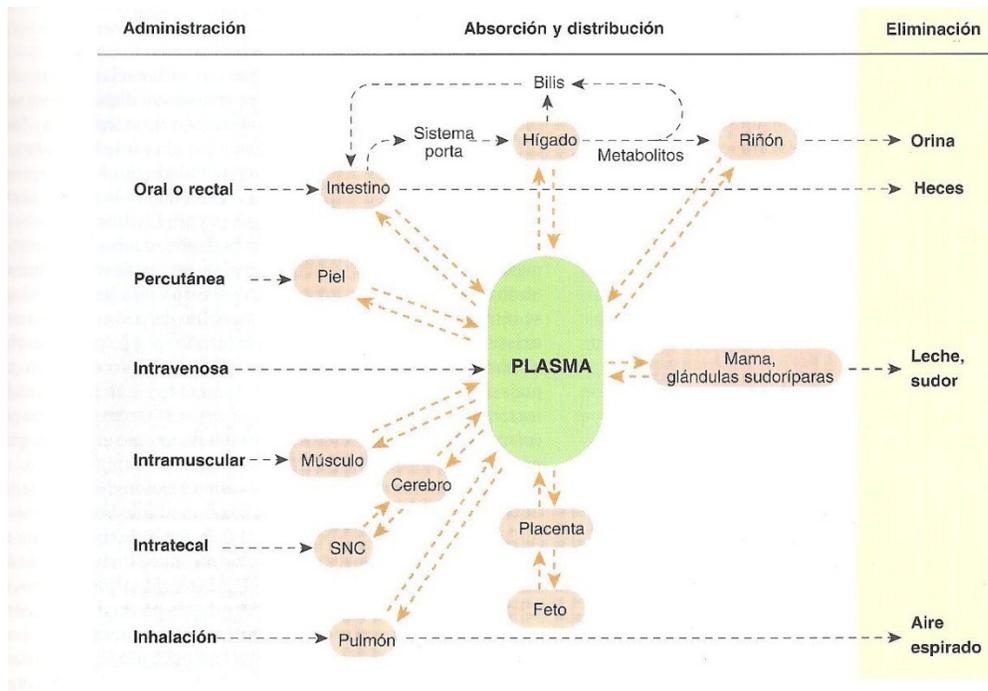


Figura 2. Vías que siguen los fármacos al desplazarse por el cuerpo.^[6]

La importancia de las fases de distribución y eliminación en el control de la eficacia de un fármaco en régimen de dosis múltiples sirve para mantener su nivel farmacéutico dentro de los márgenes terapéuticos obteniendo un nivel plasmático constante del fármaco para que no sea tóxico.^[7]

1.3.4 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se define como la fracción de fármaco inalterado y velocidad con la que llega a la circulación sistémica y está disponible para producir un efecto después de su administración por cualquier vía. En la tabla 1 se muestran las diferentes vías de administración de fármacos con sus respectivos grados de biodisponibilidad.^[8]

Tabla 1. Vías de administración, biodisponibilidad y características generales.^[8]

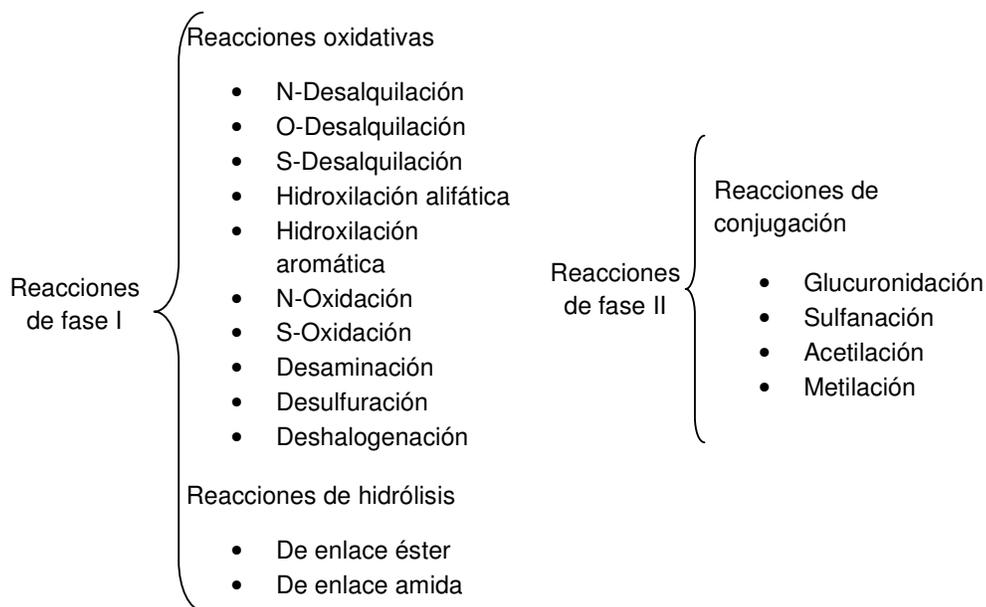
Vía	Biodisponibilidad (%)	Características
Intravenosa (IV)	100 (por definición)	De inicio más rápido
Intramuscular (IM)	75 a \leq 100	Son posibles volúmenes grandes; puede ser dolorosa
Subcutánea (SC)	75 a \geq 100	Volúmenes menores que en la IM; puede ser dolorosa
Oral (VO)	5 a $<$ 100	La más conveniente; el efecto de primer paso puede ser significativo
Rectal	30 a $<$ 100	Menos efecto de primer paso que en la oral
Inhalación	5 a $<$ 100	A menudo de inicio muy rápido
Transdérmica	80 a \leq 100	Por lo general, absorción muy lenta; usada por carecer de efecto de primer paso; tiempo de acción prolongado
Tópica	0	El efecto es de tipo local

Área bajo la curva de niveles plasmáticos (ABC): la mayoría de los estudios farmacocinéticos se llevan a cabo utilizando curvas de niveles plasmáticos contra tiempo. El ABC, representa la cantidad de fármaco que llega a la circulación sistémica, este parámetro y la cantidad total de fármaco absorbido está en función del tiempo de muestreo de las concentraciones plasmáticas que comprenda al menos tres vidas medias de eliminación. El cálculo mediante integración numérica, se basa en calcular el área entre dos puntos experimentales consecutivos de la curva de niveles plasmáticos (método de los trapecoides). El cálculo del valor del área al primer trapecio (de tiempo cero a la primera toma de muestras) presenta la dificultad de que se desconoce el valor de la concentración plasmática a tiempo cero y se calcula por extrapolación.

1.3.5 Metabolismo de fármacos

El “metabolismo de fármacos” denota el proceso por el cual los fármacos administrados son modificados por el organismo. Los metabolitos que resultan son químicamente distintos del fármaco original y suelen ser más polares, disminuyendo así su transporte a través de las membranas celulares con menor facilidad que el fármaco original, estas sustancias permanecen menor tiempo en el organismo debido a que su reabsorción tubular renal disminuye y la eliminación aumenta. La distribución limitada y la excreción mayor restringirán la actividad farmacológica, de tal forma que el metabolismo suele convertir un fármaco en un metabolito menos activo generalmente, esto no ocurre siempre así, ya que se conocen metabolitos farmacológicamente activos o tóxicos. De este modo, el metabolismo de los fármacos y las enzimas encargadas de estos procesos son factores importantes en la evaluación de la acción de los fármacos.

Las reacciones de biotransformación de los fármacos se clasifican en reacciones de funcionalización (fase I) y de biosíntesis o conjugación (fase II). El metabolismo de los fármacos puede comprender una serie de reacciones interdependientes en las que el producto de una reacción se convierte en el sustrato de otra. El metabolismo farmacológico tiene lugar fundamentalmente en el hígado, aunque algunos fármacos son metabolizados en el plasma, el pulmón o el intestino. Los sistemas enzimáticos que intervienen en las reacciones de fase I están situados en el retículo endoplásmico (incluido el citocromo P450), en tanto que los de enzimas que participan en la conjugación (fase II) son más bien citosólicos. En el siguiente esquema se citan las reacciones que se llevan a cabo en la fase I y II del metabolismo de fármacos.



Esquema 1. Principales reacciones involucradas en el metabolismo de fármacos.

1.3.6 Excreción

Los fármacos son eliminados del organismo inalterados (moléculas de la fracción libre) o modificados como metabolitos activos o inactivos. La más importante vía de eliminación de fármacos es el riñón.

Eliminación por la bilis

El hígado secreta de 0.5 a 1.0 litros de bilis diariamente. Están presentes en este líquido niveles considerables de compuestos orgánicos. Muchas de las sustancias en la bilis se reabsorben desde el intestino delgado, pero algunos compuestos altamente polares no lo hacen y se excretan por las heces.

Otras vías de excreción de menor importancia, incluyen el aire expirado, la saliva, el sudor y la leche materna. La excreción de fármacos por los líquidos corporales depende en gran medida de la difusión pasiva y en lo que respecta a los electrolitos débiles, de la diferencia de pH entre el plasma y el líquido secretado. La excreción de fármacos en la leche materna es de considerable importancia en las madres que amamantan, ya que el niño alimentado puede recibir los fármacos ingeridos por la madre.^[7]

La depuración es el concepto más importante a considerar cuando se plantea un régimen racional para administrar un fármaco durante largo tiempo, con el objetivo de conservar concentraciones de equilibrio dinámico del fármaco dentro de límites terapéuticos predeterminados. [6]

El ABC al momento estadístico cero de un perfil de concentración plasmática de fármaco es directamente proporcional a la dosis aplicada e inversamente proporcional a la Cl del principio activo, por lo que para una administración i.v. la Cl puede ser representada por la siguiente ecuación:

$$Cl = \frac{Di.v.}{ABC_0^\infty}$$

Esta ecuación indica que la Cl puede ser considerada como el inverso de la cantidad circulante del fármaco respecto a la dosis administrada (D). La Cl no debe ser calculada a partir de administraciones extravasculares tales como la oral o la intramuscular, a menos que sea comprobado experimentalmente que la dosis completa del fármaco administrado haya llegado intacta a la circulación sistémica, de lo contrario el valor de la Cl calculado será erróneo.

La farmacodinamia se refiere a “lo que el fármaco hace al organismo”, es decir, los acontecimientos derivados de la interacción entre el fármaco y su receptor u otro lugar primario de acción. Comprende el estudio de los mecanismos de acción de fármacos y de los efectos bioquímicos, fisiológicos o directamente farmacológicos que desarrollan los fármacos.

1.4 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Son una clase creciente de medicamentos que se prescriben ampliamente por sus efectos analgésicos y antiinflamatorios; algunos miembros de esta clase tienen efecto antipirético.

El principal mecanismo de acción de los AINES es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y la actividad metabolizadora de la ciclooxigenasa.

Las reacciones adversas asociadas a estos fármacos afectan principalmente vías gastrointestinales, en particular producen la erosión de la mucosa gástrica. Puede aparecer cefalea, mareo y somnolencia. No deben usarse los AINES en pacientes con insuficiencia renal.^[9]

Entre los AINES se encuentran clasificados KET trometamina y MEL.

1.4.1 Ketorolaco trometamina

Nombre químico: (±)-5-benzoil-1,2-dihidro-3*H*-pirrolo[1,2- α]pirrol-1-ácido carboxílico 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol.^[10]

Fórmula condensada: C₁₉H₂₄N₂O₆

Es un polvo cristalino blanco o casi blanco. Fácilmente soluble en agua y en metanol; poco soluble en alcohol, alcohol deshidratado y tetrahidrofurano; prácticamente insoluble en acetona, acetonitrilo, alcohol butílico, diclorometano, dioxano, acetato de etilo, hexano y tolueno. El pH de la solución acuosa oscila entre 5.7 y 6.7. Se debe conservar en envases herméticos y proteger de la luz.

Estructura molecular

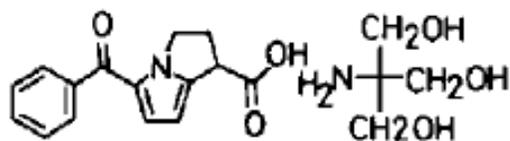


Figura 3. Estructura de Ketorolaco trometamina ^[10]

Peso molecular 376.4 g/mol

1.4.1.1 Propiedades farmacológicas

KET es un AINE con eficacia analgésica^[11] derivado del ácido pirrolizín-carboxílico^[12] estructuralmente relacionado con la indometacina y con el tolmetín.^[13] Tiene un átomo de carbono quiral situado dentro del anillo de pirrolidona y se comercializa para uso clínico como un racemato, con su actividad atribuida principalmente al S-enantiómero.^[14] Inhibe la actividad de la COX (que sintetiza prostaglandinas) y en consecuencia, impide la formación de

prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico, sus efectos terapéuticos y tóxicos están estrechamente relacionados con su capacidad para disminuir las concentraciones tisulares de prostaglandinas. En este producto destacan sus propiedades analgésicas. KET inhibe la agregación plaquetaria siendo este un efecto transitorio, recuperándose dicha función de uno a dos días después de suspender su administración.^[13] En condiciones de uso habitual presenta una CE₅₀ (concentración efectiva media) de 0.37 µg/mL.^[10]

KET es eficaz en el tratamiento del dolor después del parto y postoperatorio, por cáncer y por extracción dental. Este analgésico es no narcótico, de acción rápida y no adictivo.^[10] Las ventajas de KET incluyen la falta de efectos secundarios asociados con los opioides, tales como depresión respiratoria, prurito, sedación y náuseas. Las desventajas incluyen el deterioro de la función plaquetaria, el potencial de hemorragia gastrointestinal, la excreción renal retardada y el potencial para la insuficiencia renal aguda en pacientes con enfermedad renal preexistente.^[15]

1.4.1.2 Vía de administración y dosis

Se usa por vía intramuscular, intravenosa u oral como sal de trometamina en el tratamiento a corto plazo del dolor postoperatorio moderado y en conjunto con la reducción de las dosis de opioides para el dolor severo.^[11] Debe considerarse, que dada la elevada incidencia de efectos secundarios, su dosificación y la duración máxima del tratamiento están restringidas.^[12]

Para dolor postoperatorio se emplean 30 mg por vía intramuscular (im) de KET.^[16]

1.4.1.3 Farmacocinética

- *Absorción:* KET se absorbe completamente tras su administración intramuscular u oral.
- *Distribución:* Los valores plasmáticos máximos medios ocurren a los 30 minutos de administrar una dosis por vía oral de 10 mg y son de 0.8 a

0.9 µg/mL. El medicamento se enlaza en más de un 99% con las proteínas plasmáticas.

- *Metabolismo*: Principalmente hepático (glucuronoconjugación); se han identificado un para-hidroximetabolito y otros metabolitos conjugados siendo estos inactivos; menos del 50% de la dosis se metaboliza. Las afecciones hepáticas no afectan sustancialmente la eliminación del medicamento.
- *Excreción*: Principalmente se efectúa a través de la orina (más del 90%); y el resto se excreta por las heces. La vida media terminal plasmática es en promedio de 4.5 horas.^[13]

1.4.2 Meloxicam

Nombre químico: 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolilo)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido.^[17]

Fórmula condensada: C₁₄H₁₃N₃O₄S₂

Estructura molecular

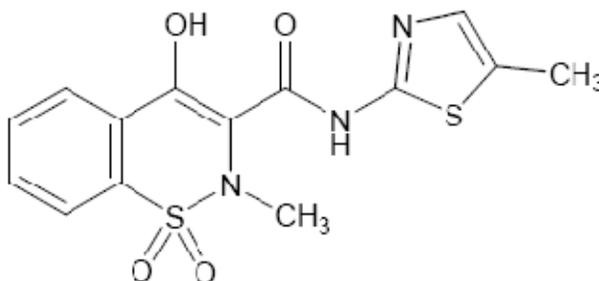


Figura 4. Estructura de MEL ^[18]

Peso molecular 351.4 g/mol

Es un polvo amarillo pálido, prácticamente insoluble en agua; muy poco soluble en alcohol y en metanol; poco soluble en acetona; soluble en dimetilformamida.^[12]

Se debe proteger del aire y almacenar de 2 a 8°C. Puede resultar irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.^[17]

1.4.2.1 Propiedades farmacológicas

Es un AINE derivado oxicam, que inhibe preferentemente la ciclooxigenasa 2 (COX-2), impartiendo efectos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios. Se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide, en el tratamiento sintomático a corto plazo de las exacerbaciones agudas de la osteoartritis y en el tratamiento sintomático de la espondilitis anquilosante.^[12]

1.4.2.2 Vía de administración y dosis

La dosis usual de MEL se administra por vía oral en tableta de 7.5 mg una vez al día, que puede duplicarse a 15 mg por día en afecciones dolorosas agudas con dolor intenso como la artritis reumatoide.^[18]

1.4.2.3 Farmacocinética

Es lineal sobre el rango de dosis de 7.5-30 mg y permanecen sin cambios de una sola a la dosificación múltiple.^[19]

- *Absorción:* Tras su administración oral puede ser casi completamente absorbido con una biodisponibilidad absoluta del 89%.^[20]
- *Distribución:* Se une fuertemente a la albúmina >99% y las concentraciones máximas plasmáticas fluctúan entre 1.5 a 1.7 µg/mL entre 4 y 5 horas después de la administración de 15 mg por vía oral.^[20] El volumen de distribución aumenta en la insuficiencia renal grave.^[12]
- *Metabolismo:* Se metaboliza extensamente en el hígado por oxidación, principalmente por el citocromo P450 (CYP2C9 y CYP 3A4), en cuatro metabolitos farmacológicamente inactivos que son excretados en cantidades similares en la orina y las heces.^[21]
- *Excreción:* El aclaramiento oral aparente (CL/F) varía desde 0.42 hasta 0.7 L/h.^[20] La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) está dentro del rango de 13 a 20 horas y es adecuado para una sola dosis diaria. Menos del 3% de la dosis se excreta inalterada.^[21]

2. JUSTIFICACIÓN

Se han reportado una gran variedad de métodos analíticos para la cuantificación de KET y MEL con detección UV por HPLC de manera individual en plasma humano, sin embargo, para la elaboración de nuevas formas farmacéuticas, hoy en día es necesaria la aplicación de nuevos métodos que reduzcan costos y optimicen tiempos de análisis. Es por esto que se cree indispensable establecer las condiciones analíticas para detectar y cuantificar KET y MEL de manera simultánea y así contar con un método confiable para su determinación.

3. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de Ketorolaco y Meloxicam en plasma humano en base a la norma NOM-177-SSA1-1998 y en una formulación de gel tópico como control de calidad de la forma farmacéutica.

3.1 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones analíticas de detección y extracción de KET y MEL en plasma y gel.
- Validar los métodos analíticos de KET y MEL en plasma y gel.
- Cuantificar las concentraciones de KET y MEL en una formulación en gel para uso tópico como control de calidad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y estándares de referencia

Fosfato monobásico de sodio monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker) USA.

Acetonitrilo CH_3CN grado cromatográfico (J.T. Baker) USA.

Metanol CH_3OH grado cromatográfico (J.T. Baker) USA.

Éter etílico $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (J.T. Baker) USA.

Metil terbutil éter $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$ (J.T. Baker) USA.

Hidróxido de sodio NaOH (J.T. Baker) USA.

Cloruro de calcio CaCl_2 (J.T. Baker) USA.

KET trometamina estándar secundario (Química sintética). Pureza 100.60% Base seca.

MEL estándar secundario (Cipla). Pureza 100.26% Base seca.

4.2 Matriz biológica

La matriz biológica empleada para la validación del método analítico se obtuvo de 6 donadores voluntarios sanos del banco de sangre del INER, se incluyó la documentación que amparaba su bioseguridad.

4.3 Forma farmacéutica

Gel tópico: MEL 1.8% y KET trometamol 0.6%

Descripción: preparación de consistencia viscosa, color amarillo pálido, aspecto uniforme, libre de partículas extrañas y puntos oscuros, ligero olor a alcohol, envasado en un tubo metálico colapsable con 40 g.

4.4 Equipos e Instrumentos

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con módulo Alliance 2695, detector UV-VISIBLE 2489, Waters.

Balanza analítica Scientech SA80

Centrífuga refrigerada SORVALL Leyend MACH 1.6/R

Potenciómetro Conductronic pH 120

Vortex-Genie 2

Equipo Milli-Q (Continental Waters System)

Micropipetas de 20, 200, y 1000 μ L y repetidora Eppendorf volumen variable

4.5 Material

Matraz volumétrico de 10, 100 y 1000 mL	Combitips de varios volúmenes
Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL	Vasos de precipitados varios volúmenes
Equipo millipore	Frascos reservorios
Frascos de polipropileno	Tubos de vidrio con rosca de 15 mL
Viales de alto recobro	Para utilizar en el inyector Waters

4.6 Preparación de soluciones

- Solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05M pH 3.5 (1L)

Se pesaron 6.90 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se transfirieron a un vaso de precipitados de 1L, se adicionaron 900 mL de agua desionizada, se ajustó pH a 3.5 con ácido ortofosfórico concentrado, la solución se transfirió a un matraz volumétrico de 1L, se llevó al aforo con agua desionizada, se filtró a través de membrana con poro de 0.45 μ m de diámetro y se colocó en frasco reservorio.

- Solución de metanol y agua 50 : 50 v/v (500 mL)

Se midieron 250 mL de metanol a los que se le adicionaron 250 mL de agua desionizada, esta mezcla se filtró a través de una membrana de 0.45 μm de diámetro y se almacenó en frasco reservorio.

- Solución de fase móvil buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05M, pH 3.5 y ACN 100% 60 : 40 v/v (500 mL)

Se midieron 350 mL de solución amortiguadora de fosfatos, se adicionó un volumen de 150 mL de acetonitrilo al 100%, la solución se filtró a través de membrana con poro de 0.45 μm de diámetro y se traspasó a un frasco reservorio.

- Solvente para extracción, mezcla de metil-terbutil-éter y éter etílico 50 : 50 v/v (2 L)

Se mezcló 1 L éter etílico y un volumen igual de metil-terbutil-éter y se almacenó en un frasco reservorio en refrigeración.

- Solución de hidróxido de sodio 0.1 M (250 mL)

Se pesó en un vaso de precipitados de 100 mL 1.0 g de NaOH, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 mL, se disolvió y aforó con agua desionizada.

- Solución de cloruro de calcio al 1.0% p/v

Se pesó 1.0 g de CaCl_2 , el cual se disolvió con 99 mL de agua desionizada y se transfirió a un frasco reservorio.

- Solución A. Metanol y NaOH 0.1 M (50 : 03 v/v)

Se mezcló en un frasco reservorio de 1 L, 1000 mL de metanol grado cromatográfico y 60 mL de solución de NaOH 0.1 M.

- Solución B. Metanol y agua (20 : 80 v/v) 500 mL

Se mezcló en un frasco reservorio de 500 mL, 100 mL de metanol grado cromatográfico y 400 mL de agua desionizada.

4.6.1 Soluciones estándares para la validación del método analítico en plasma

- Solución estándar A de MEL 101 µg/mL

$$\text{Ajuste de pureza } 10 \text{ mg} * \frac{100\%}{100.26\%} = 9.97 \text{ mg de MEL}$$

Se pesaron 10.1 mg de estándar de MEL en matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 60 mL de metanol y se sonicó por 5 minutos, se llevó al aforo con metanol.

- Solución estándar B de MEL 10.1 µg/mL

De la solución estándar A de MEL se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al aforo con solución de MeOH:H₂O 50:50 v/v.

- Soluciones estándares para la curva de calibración de MEL.

A partir de las soluciones estándares A y B de MEL se tomaron alícuotas para preparar las soluciones de la curva de calibración y los puntos control, en base a la siguiente tabla.

Tabla 2. Preparación de las soluciones de MEL utilizadas durante la validación del método analítico en plasma.

Punto en la curva	Concentración de MEL en solución (µg/mL)	Concentración de la solución utilizada (µg/mL)	Alícuota tomada (mL)	Diluyente	Volumen total preparado (mL)
LD	0.13	10.1	0.125	Fase móvil	10
1	0.25		0.25		
2	0.76		0.75		
3	1.52	101	0.15		
4	2.53		0.25		
5	3.79		0.375		
6	6.06		0.60		
7	6.82		0.675		
8	7.58		0.75		
Puntos control					
CB	0.51	10.1	0.5	Fase móvil	10
CM	3.03	101	0.3		
CA	7.07		0.7		

- Solución estándar A de KET 100.2 µg/mL

Debido a que se requirió una solución con una concentración de 100 µg/mL de KET base y se tenía en presentación de sal como KET trometamina, se realizó un ajuste por peso:

KET trometamina: 376.4 g/mol.

KET base: 255 g/mol.

$$\% \text{KET base} = \frac{255 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{376.4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 100 = 67.74\%$$

$$\text{mg KET sal} = \frac{10 \text{ mg KET base}}{67.74 \text{ mg KET base}} * 100 \text{ mg KET sal} = 14.76 \text{ mg de sal}$$

$$\text{Ajuste de pureza } 14.76 \text{ mg} * \frac{100\%}{100.6\%} = 14.67 \text{ mg de sal}$$

Se pesaron 14.7 mg de KET trometamina en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionó 60 mL de solución MeOH y H₂O 50:50 v/v para disolver y se aforó con la misma.

- Solución estándar B de KET 10.02 µg/mL

De la solución estándar A de KET se tomó una alícuota de 10 mL, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con solución de MeOH:H₂O 50:50 v/v.

- Soluciones estándares para la curva de calibración de KET.

De las soluciones estándares A y B de KET se tomaron las alícuotas para preparar los ocho puntos de la curva de calibración y los tres puntos control, todas las soluciones se prepararon conforme a la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de las soluciones de KET utilizadas durante la validación del método analítico en plasma.

Punto en la curva	Concentración de KET en solución (µg/mL)	Concentración de la solución utilizada (µg/mL)	Alícuota tomada (mL)	Diluyente	Volumen de aforo (mL)
LD	0.05	10.02	0.05	Fase móvil	10
1	0.10		0.1		
2	0.25		0.25		
3	0.50		0.5		
4	1.25	100.2	0.125		
5	2.51		0.25		
6	3.26		0.325		
7	4.01		0.4		
8	5.01		0.5		
Puntos control					
CB	0.20	10.02	0.2	Fase móvil	10
CM	2.76	100.2	0.275		
CA	4.51		0.45		

- Solución de Adecuabilidad del sistema (KET 1.002 µg/mL y MEL 1.212 µg/mL).

Se adicionaron a un matraz volumétrico de 10 mL, 0.1 mL de la sol. A de KET (100.2 µg/mL) y 0.12 mL de sol. A de MEL (101 µg/mL), se llevó al aforo con fase móvil.

4.6.2 Soluciones estándares para la validación del método analítico de una formulación en gel

- Solución de referencia de KET 180.6 µg/mL (sol. 1)

Se realizó un ajuste por peso debido a su presentación en sal de trometamina:

Ketorolaco trometamina: 376.4 g/mol.

Ketorolaco puro: 255 g/mol.

$$\% \text{ KET puro} = \frac{255 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{376.4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 100 = 67.74\%$$

$$\text{mg KET sal} = \frac{18 \text{ mg KET puro}}{67.74 \text{ mg KET puro}} * 100 \text{ mg KET sal} = 26.57 \text{ mg de sal}$$

$$\text{Ajuste de pureza } 26.57 \text{ mg} * \frac{100\%}{100.6\%} = 26.41 \text{ mg de sal}$$

Se pesaron 26.5 mg de sustancia de referencia de KET trometamina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 80 mL de agua desionizada, se disolvió y aforó con el mismo disolvente.

- Solución de referencia de MEL 543.4 µg/mL

$$50 \text{ mL} * \frac{0.54 \text{ mg}}{\text{mL}} * \frac{100\%}{100.26\%} = 26.93 \text{ mg MEL}$$

Se pesaron 27.1 mg de sustancia de referencia de MEL, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 30 mL de la sol. A, se sonicó por 10 minutos, se dejó a temperatura ambiente alrededor de 10 min y se llevó al aforo con la misma solución.

- Soluciones para la curva de calibración y puntos control de KET y MEL

A partir de las soluciones de referencia de KET y MEL se tomaron las alícuotas para preparar las soluciones de la curva de calibración que están en un rango de 0.36 – 9.03 µg/mL de KET y 1.09 – 27.17 µg/mL de MEL, así como las soluciones para los tres niveles de control. Todas las soluciones fueron realizadas en base a la tabla 4, llevando cada alícuota a un aforo de 10 mL con solución B.

Tabla 4. Preparación de las soluciones de KET y MEL utilizadas durante la validación del método analítico en gel.

Punto en la curva	CC KET/MEL (µg/mL)	Concentración del stock KET/MEL (µg/mL)	Alícuota del Stock KET/MEL (µL)	Diluyente	Volumen de aforo (mL)
LD	0.018/0.055	0.36/1.09	500/500	Solución B. metanol : agua (20 : 80 v/v)	10
1	0.36/1.09	180.6/543.4	20/20		
2	1.81/5.43		100/100		
3	3.61/10.87		200/200		
4	5.42/16.30		300/300		
5	6.32/19.02		350/350		
6	7.22/21.74		400/400		
7	9.03/27.17		500/500		
CB	0.90/2.72		50/50		
CM	4.52/13.59		250/250		
CA	8.13/24.45		450/450		

CC. curva de calibración, CB. Control bajo, CM. Control medio, CA. Control alto.

- Solución de Adecuabilidad del sistema (KET 4.52 µg/mL y MEL 13.59 µg/mL)

Se adicionaron a un matraz volumétrico de 10 mL, 0.25 mL de la solución de referencia de KET (180.6 µg/mL) y 0.25 mL de solución de referencia de MEL (543.4 µg/mL), se llevó al aforo con la solución B.

- Solución de referencia para evaluar el gel (KET 7.22 µg/mL y MEL 21.74 µg/mL)

En un matraz volumétrico de 50 mL se agregaron 2 mL de solución de referencia de KET y 2 mL de la solución de referencia de MEL, las alícuotas se llevaron al aforo con solución B.

4.7 Métodos de extracción de KET y MEL

En función de las características fisicoquímicas de los compuestos de interés así como de los métodos descritos por Carrasco-Portugal^[22] y Patiño-Camacho^[23] respectivamente, se logró la determinación de los niveles plasmáticos de KET y MEL por un método de HPLC con detección ultravioleta. Se realizó siguiendo la metodología citada en el diagrama 1.

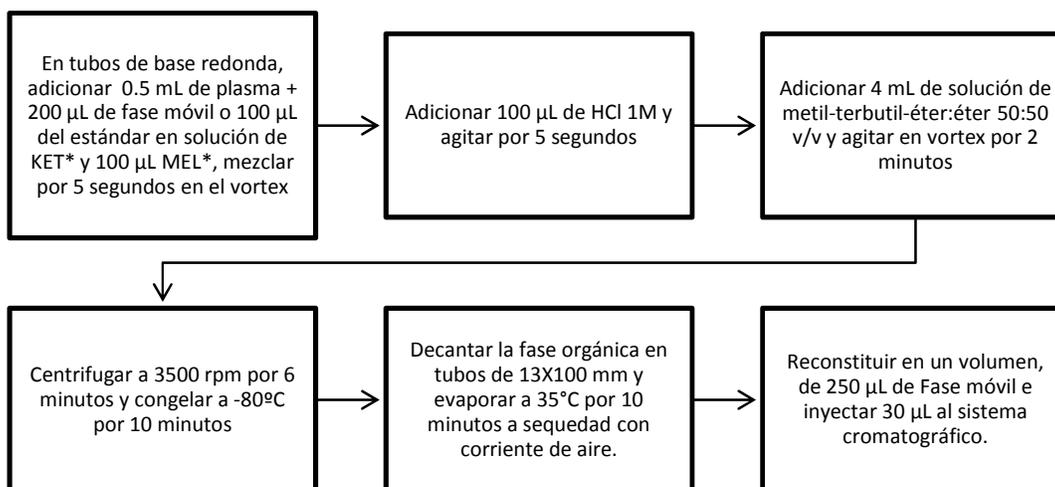


Diagrama 1. Proceso de extracción de KET y MEL en muestras plasmáticas.
(* Ver tablas 2 y 3)

Para la determinación de KET y MEL en gel se utilizó el método de extracción citado en el diagrama 2.

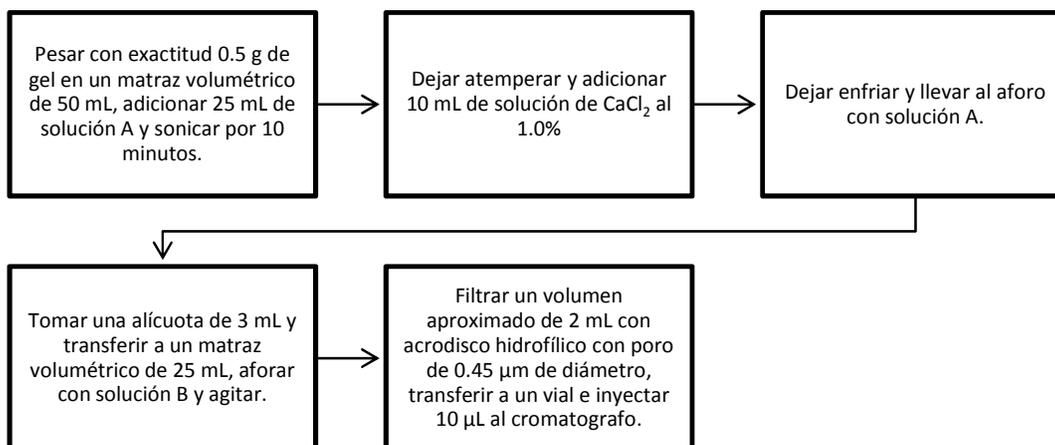


Diagrama 2. Proceso de extracción de KET y MEL en gel de aplicación tópica

4.7.1 Condiciones cromatográficas

En la tabla 5 se muestran las condiciones analíticas establecidas para determinar simultáneamente KET y MEL por HPLC.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas empleadas en la validación del método analítico en plasma y gel.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con módulo Alliance e2695, Waters y detector UV-VIS 2489.	
Columna	Princeton SPHER-100 C ₈ , 3.9X150 mm, Tamaño de partícula 5 µm.
Longitud de onda	313 nm para KET, evento a los 4.7 minutos cambiar a 360 nm para MEL.
Fase móvil	NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 3.5 : ACN(60:40 v/v)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección (plasma) Volumen de inyección (gel)	30 µL 10 µL
Temperatura de columna	35 °C
Tiempo de retención para KET	3.5 - 4.5 minutos
Tiempo de retención para el MEL	5.0 – 6.0 minutos

4.7.2 Validación y criterios de aceptación del método analítico para cuantificar KET y MEL en plasma

Una vez establecidas las condiciones, el método analítico fue evaluado en base a los criterios de validación de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Siguiendo los apartados citados en su sección 9.1 y que a continuación se señalan.

Acarreo: se inyectó de forma secuencial el blanco de reactivos (fase móvil), el punto más alto de la curva de calibración de KET y MEL y finalmente el blanco de reactivos, antes de iniciar la corrida analítica de un día de trabajo.

Selectividad: se refiere a la 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.^[24]

Se evaluó el método contra posibles interferencias que se pudiesen presentar como hemoglobina, lípidos, heparina, acetaminofén y cafeína.

En el caso de acetaminofén y cafeína se emplearon soluciones estándares de dichos fármacos cuya concentración fue de 1 mg/mL para cada uno, se realizaron por duplicado blancos de plasma cargados con 25 μ L de solución estándar de cafeína y otro juego con 10 μ L de solución estándar de acetaminofén, para tener una concentración final de 47.62 μ g/mL de cafeína y 19.61 μ g/mL de acetaminofén que son los valores de $C_{m\acute{a}x}$ de cada uno respectivamente, las muestras fueron procesadas según el método de extracción.

- **Selectividad en cada día de trabajo:** se comparó la respuesta de la fase móvil y el blanco de plasma con el punto más bajo de la curva y la solución utilizada en la adecuabilidad.

El criterio de aceptación fue que no deben existir interferencias en la cuantificación de los compuestos por analizar.

Linealidad: es la 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.^[24]

Linealidad de sistema: Se analizaron seis curvas de calibración de los estándares en solución, se adicionaron en ocho viales de alto recobro 100 μ L de cada solución estándar de la curva de calibración de KET y MEL para cada punto (tabla 2 y 3), posteriormente se adicionaron 50 μ L de fase móvil para así tener un volumen final de 250 μ L, con una concentración al doble de la solución inicial para cada punto de la curva; se cumple con este parámetro sí la curva de calibración cuenta con al menos 5 de las concentraciones que conforman el intervalo con un

coeficiente de variación menor al 3% respecto a su valor teórico y el coeficiente de correlación lineal igual o mayor a 0.990.

- **Linealidad de método:** se analizaron seis curvas de calibración de los estándares en la matriz biológica después de aplicar el método de extracción, quedando una curva de calibración con el rango de concentraciones citado en la siguiente tabla:

Tabla 6. Concentraciones de KET y MEL durante las diferentes etapas del método analítico.

Punto de la curva	En plasma KET/MEL (ng/mL)	Al inicio del método analítico KET/MEL (ng/mL)
LD	10/26	7.14/18.57
1	20/50	14.29/35.71
2	50/152	35.71/107.14
3	100/304	71.43/214.29
4	250/506	178.57/357.14
5	502/758	358.57/535.71
6	652/1212	465.71/857.14
7	802/1364	572.86/964.29
8	1002/1516	715.71/1071.43
Puntos control		
CB	40/102	28.57/72.86
CM	552/606	394.29/432.86
CA	902/1414	644.29/1010

- Criterios de aceptación: Curva de calibración con al menos 5 de las concentraciones que conforman el intervalo, coeficiente de correlación lineal igual o mayor a 0.990, el primer punto o LC con un valor promedio dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que el 20%, los puntos subsecuentes con un valor promedio dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal y con un coeficiente de variación no mayor que 15%.

Recuperación absoluta: se entiende como la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica, o la capacidad de recuperar el o los compuestos después de haberse realizado el proceso de extracción o purificación de la muestra en el fluido biológico.^[24]

Se realizó la extracción por sextuplicado de los tres niveles de concentración de los controles y se analizaron junto con un sextuplicado de los analitos en solución, la respuesta de estos últimos fueron tomadas como el 100% al momento del cálculo.

Criterios de aceptación: Al comparar los resultados de las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta razón no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango y se aceptan variaciones hasta del 15%.

Exactitud y precisión: la exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, mientras que la precisión se refiere 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.^[24]

Se analizaron por sextuplicado los tres niveles de concentración de los controles en la matriz biológica.

Reproducibilidad: se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes días.^[24]

Se analizaron por triplicado durante tres días consecutivos los tres niveles de concentración de los controles en la matriz biológica.

Criterios de aceptación: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ con respecto al valor nominal de la concentración.

Límite de cuantificación: es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.^[24]

Se analizó por sextuplicado el punto inferior de la curva de calibración en extracción.

Criterios de aceptación: se acepta si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

Límite de detección: la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.^[24]

Se prepararon por sextuplicado, muestras con una concentración de 7.14 ng/mL de KET y 18.57 ng/mL de MEL en extracción, se emplearon soluciones con concentración de 50 ng/mL y 130 ng/mL de KET y MEL respectivamente.

Criterios de aceptación: la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

Estabilidad de la muestra: se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.^[24]

- **Estabilidad a corto plazo:** se analizaron por triplicado los tres niveles de concentración control en la matriz biológica, estas muestras fueron expuestas previamente a temperatura ambiente durante el máximo tiempo requerido para su preparación (9 horas) y se compararon contra muestras las cuales fueron procesadas en condiciones normales de trabajo.
- **Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación:** se analizaron por triplicado los niveles control en la matriz biológica y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación (a $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, posteriormente expuestos a temperatura ambiente para su

descongelación), junto con estas se preparó una serie igual de muestras las cuales no fueron sometidas a dicha condición para su posterior comparación.

- **Estabilidad de la muestra procesada:** se analizaron por triplicado las tres concentraciones de los niveles control en la matriz biológica, las cuales fueron colocadas en el automuestreador y analizadas a las 5 y 10 horas posteriores a su elaboración.

Para cada análisis se prepararon curva de calibración con su respectiva muestra blanco y muestras de controles en las mismas cantidades que las preparadas para la estabilidad y éstas no fueron sometidas a ese proceso para así poderlas comparar entre ellas.

- **Estabilidad en solución:** se analizaron por triplicado las soluciones de los tres niveles control las cuales fueron conservadas en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 33 días y se compararon contra las concentraciones de soluciones preparadas el día que se realizó la prueba siguiendo la metodología citada en la tablas 2 y 3.

Criterios de aceptación: el coeficiente de variación de las determinaciones en cada nivel de concentración de las muestras controles sometidas a estabilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ con respecto al valor obtenido de concentración de las muestras control no sometidas a dicha estabilidad para considerar que el compuesto es estable bajo esas condiciones.

Tolerancia: es la 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.^[24]

- **Tolerancia a cambio de equipo:** se evaluó por triplicado las tres concentraciones de los niveles control en la matriz biológica, siendo sometido el método a un cambio de equipo, empleando las mismas condiciones cromatográficas, se emplearon muestras evaluadas en el equipo uno para compararse con otro.

- **Tolerancia ante el efecto de dilución de la muestra:** en un tubo se mezclaron 120 μL de solución estándar de KET 10.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 220 μL de solución estándar de MEL 10.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 660 μL de plasma; de esta mezcla se colocaron 250 μL en un tubo (se realizó por triplicado); se añadió 250 μL de plasma libre de fármacos para finalmente tener una dilución 1:2 con una concentración de 857.14 ng/mL de KET y 1571.43 ng/mL de MEL; a estas muestras se les aplicó el método de extracción en plasma.

Criterios de aceptación: el coeficiente de variación de las determinaciones en cada nivel de concentración de las muestras controles sometidas a la tolerancia deben estar dentro del $\pm 15\%$ con respecto al valor obtenido de concentración de las muestras control no sometidas a dicha tolerancia.

4.7.3 Validación y criterios de aceptación del método analítico para cuantificar KET y MEL en una formulación de gel

Acarreo: se inyectó de forma secuencial fase móvil, el punto más alto de la curva de calibración de KET y MEL y fase móvil, al inicio de la corrida analítica por cada día de trabajo.

Linealidad de sistema: se analizaron seis curvas de calibración de los estándares de KET y MEL en solución. El criterio de aceptación de esta prueba fue obtener un coeficiente de correlación lineal de cada curva de calibración y en la curva promedio ≥ 0.990 y el coeficiente de variación menor al 3% con respecto a la concentración teórica.

Recuperación absoluta: se aplicó la extracción a 6 muestras de gel (como se indica en el diagrama 2), las cuales fueron comparadas contra las concentraciones de 6 inyecciones de la solución de referencia para valorar el gel.

Criterios de aceptación: Al comparar las respuestas de la solución de referencia contra las obtenidas en la extracción de la forma farmacéutica, el porcentaje de esta razón no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible.

Repetibilidad: se realizó la extracción a 6 muestras de gel.

Reproducibilidad: se realizó por triplicado durante tres días consecutivos aplicando la extracción a 3 muestras de gel.

Criterios de aceptación: para cada nivel de las muestras controles se debe obtener una concentración con exactitud promedio de 90 – 110% respecto a su valor teórico y una precisión igual o menor a 10%.

Límite de cuantificación: se analizó por sextuplicado el punto inferior de la curva de calibración en solución.

Criterios de aceptación: se acepta si su valor promedio cae dentro del $\pm 10\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 10%.

Límite de detección: se analizó por sextuplicado una dilución del límite inferior de la curva de calibración en solución para ambos analitos, se uso una solución cuya concentración fue de 0.018 / 0.055 $\mu\text{g/mL}$ de KET y MEL respectivamente.

Criterios de aceptación: la señal del compuesto por analizar en la forma farmacéutica puede distinguirse de los niveles de ruido.

Estabilidad de la muestra procesada: se prepararon por triplicado muestras de gel a las cuales se les aplicó el método de extracción, fueron colocadas en el automuestreador y analizadas a las 24 horas posteriores a su elaboración, junto con una serie de muestras las cuales no fueron sometidas a condiciones de estabilidad.

Criterios de aceptación: el coeficiente de variación de las determinaciones en cada nivel de concentración de las muestras controles sometidas a estabilidad deben estar dentro del $\pm 10\%$ con respecto al valor obtenido de concentración de las muestras control no sometidas a dicha estabilidad.

Tolerancia al cambio de proporción en fase móvil en un $\pm 2\%$: se evaluaron las soluciones de la curva de calibración y por triplicado las tres concentraciones de los niveles control modificando las proporciones de solventes en $\pm 2\%$ de solvente orgánico así como del acuoso.

Criterios de aceptación: el coeficiente de variación de las determinaciones en cada nivel de concentración de las muestras controles sometidas a la tolerancia deben estar dentro del $\pm 10\%$ con respecto al valor obtenido de concentración de las muestras control no sometidas a dicha tolerancia.

4.8 Método de procesamiento de datos

Se empleó el integrador computacional Empower® de Waters®, para determinar las alturas de KET y MEL, las alturas (y) fueron ajustadas a la concentración de los analitos correspondiente (x), con un análisis de regresión $y = mx + b$, en donde b es la ordenada al origen y m la pendiente de la curva de calibración, con una ponderación de $1/x^2$. La concentración experimental recuperada fue obtenida introduciendo la respuesta (altura) de los analitos en la ecuación de la línea recta generada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Validación del método analítico para cuantificar KET y MEL en plasma.

5.1.1 Selectividad

Se evaluó el método ante posibles interferencias en los tiempos de retención del KET y MEL, para esto se analizó el plasma de seis voluntarios sanos por separado aplicando el método de extracción en ausencia de los estándares, para corroborar que no existieran interferencias con los analitos. En la figura 5 se muestran los cromatogramas representativos de los analitos en solución (solución de adecuabilidad), blanco de plasma y de reactivos, así como la extracción del LC a partir del plasma; como se puede apreciar se obtuvo una cuantificación de KET y MEL libre de interferencias.

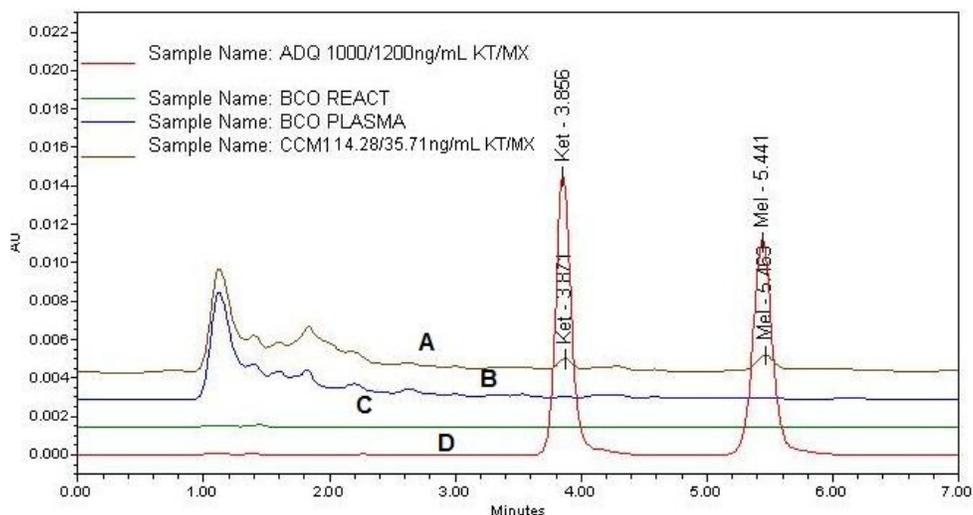


Figura 5. Cromatogramas representativos; A) LC de KET y MEL; B) blanco de plasma; C) blanco de reactivos (fase móvil); D) estándares de KET y MEL en solución.

Además se analizó la posibilidad de interferencias de sustancias endógenas como la hemoglobina y lípidos (tabla 7) y de fármacos de uso común como cafeína y acetaminofén, así como la de un anticoagulante como la heparina, en la figura 6 se hace una comparación del LC de KET y MEL contra blancos los

cuales contienen las sustancias antes mencionadas; se observa que no hay interferencia con los analitos de interés KET y MEL.

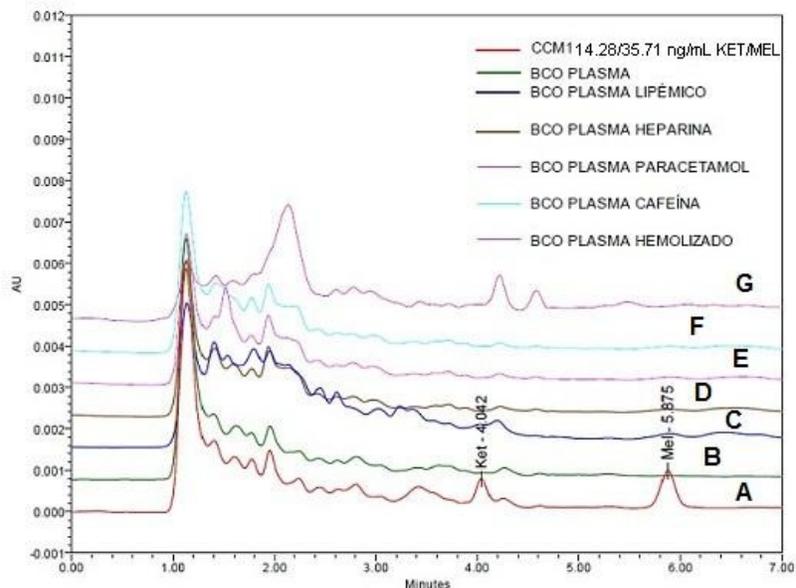


Figura 6. Cromatogramas representativos; A) LC de KET y MEL; B) blanco de plasma; C) blanco de plasma lipémico; D) blanco de plasma cargado con heparina; E) blanco de plasma cargado con acetaminofén; F) blanco de plasma cargado con cafeína; G) blanco de plasma hemolizado.

Tabla 7. Selectividad del método analítico.

Plasma	Sustancia	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración Promedio (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud
Hemolizado	KET	394.29	379.53	7.87	2.07	96.26
	MEL	432.86	410.48	10.56	2.57	94.83
Lipémico	KET	394.29	424.42	5.13	1.21	107.64
	MEL	432.86	447.38	5.22	1.17	103.35

El método es capaz de cuantificar exacta y específicamente KET y MEL en presencia de otros compuestos presentes en la muestra, por lo que es selectivo.

5.1.2 Linealidad

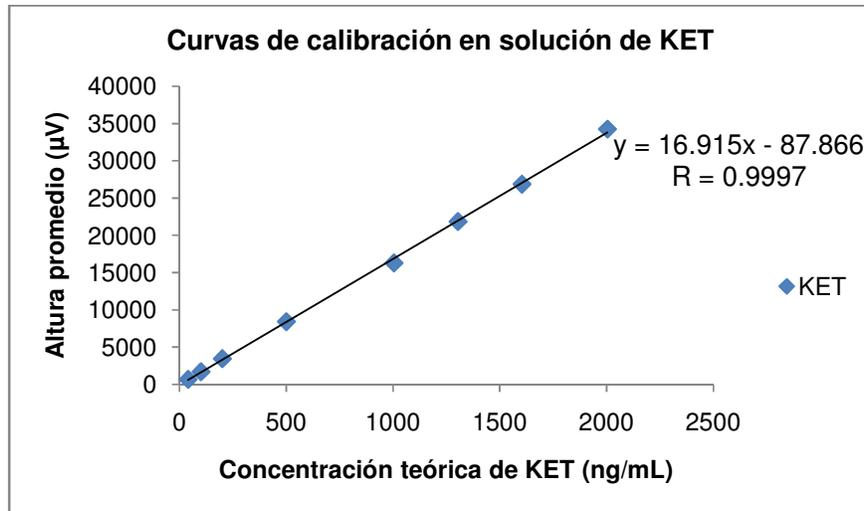
Linealidad del sistema de KET

Se determinó la linealidad del sistema de KET evaluando seis curvas de calibración en solución en un rango de 40 – 2004 ng/mL de KET en un mismo día, la respuesta se cuantificó midiendo la altura de los picos, se graficó dicha respuesta versus la concentración de KET en el intervalo mencionado, se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m), y la ordenada al origen (b) para cada curva de calibración.

Al graficar el promedio de las alturas de KET, se observó un comportamiento el cual fue descrito por la ecuación $y = 16.915X - 87.866$ con un coeficiente de correlación lineal de 0.9997, con dichos resultados el sistema de KET cumple con el parámetro de linealidad. En la gráfica 1 se observa el promedio de la respuesta de KET obtenida de las curvas de calibración en solución en un rango de concentraciones de 40 – 2004 ng/mL, a su vez en la tabla 8 se muestran los resultados con un coeficiente de variación menor al 3% respecto al valor promedio calculado.

Tabla 8. Linealidad en sistema de KET.

Concentración teórica de KET (ng/mL)	Altura promedio Calculada \pm D.E. (μ V)	C.V. (%)	E.E.
40	682.092 \pm 8.734	1.280	3.566
100	1696.560 \pm 21.126	1.245	8.625
200	3450.767 \pm 63.299	1.834	25.842
500	8430.724 \pm 86.554	1.027	35.336
1004	16304.443 \pm 219.610	1.347	89.656
1304	21864.254 \pm 194.331	0.889	79.335
1604	26870.210 \pm 196.298	0.731	80.138
2004	34275.105 \pm 429.051	1.252	175.159



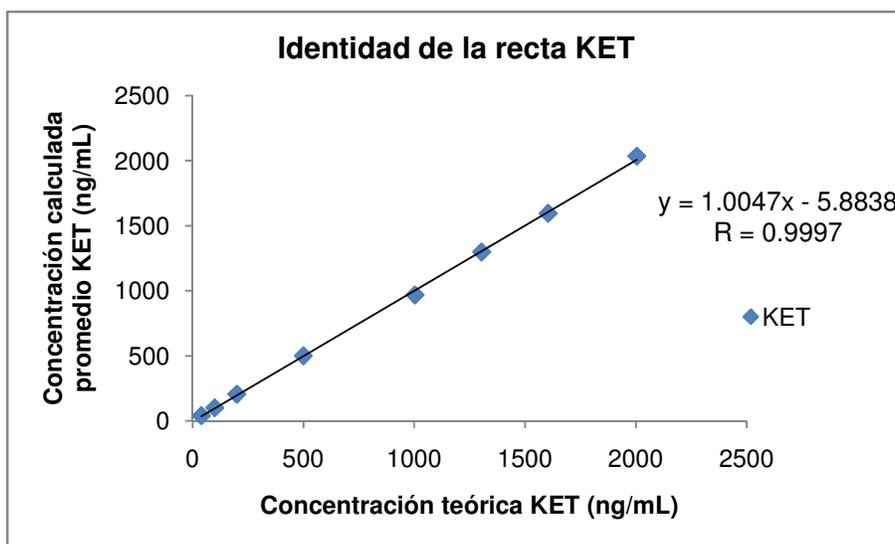
Gráfica 1. Curva de calibración del sistema de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

Identidad de la recta de KET

En la tabla 9 se muestra el promedio de las concentraciones de KET calculadas a partir de las seis curvas de calibración en solución, cuyos coeficientes de variación para cada uno de los puntos es menor al 3%, en la gráfica 2 se hizo una relación del promedio de la concentración calculada versus la concentración teórica con la que se obtuvo una pendiente de 1.0047, lo que indica una relación proporcional entre los valores calculados y los teóricos, presentando una ordenada al origen de -5.8838 y un coeficiente de correlación lineal de 0.9997.

Tabla 9. Identidad de la recta de KET.

Concentración teórica de KET (ng/mL)	Concentración promedio calculada \pm D.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
40	39.853 \pm 0.073	0.183	99.63
100	100.109 \pm 0.374	0.374	100.11
200	204.290 \pm 1.413	0.691	102.15
500	500.101 \pm 0.884	0.177	100.02
1004	967.749 \pm 2.696	0.279	96.39
1304	1298.032 \pm 3.757	0.289	99.54
1604	1595.423 \pm 11.712	0.734	99.47
2004	2035.143 \pm 3.956	0.194	101.55
m	16.915		
b	-87.866		
r	0.9997		
r ²	0.9996		



Gráfica 2. Identidad de la recta de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

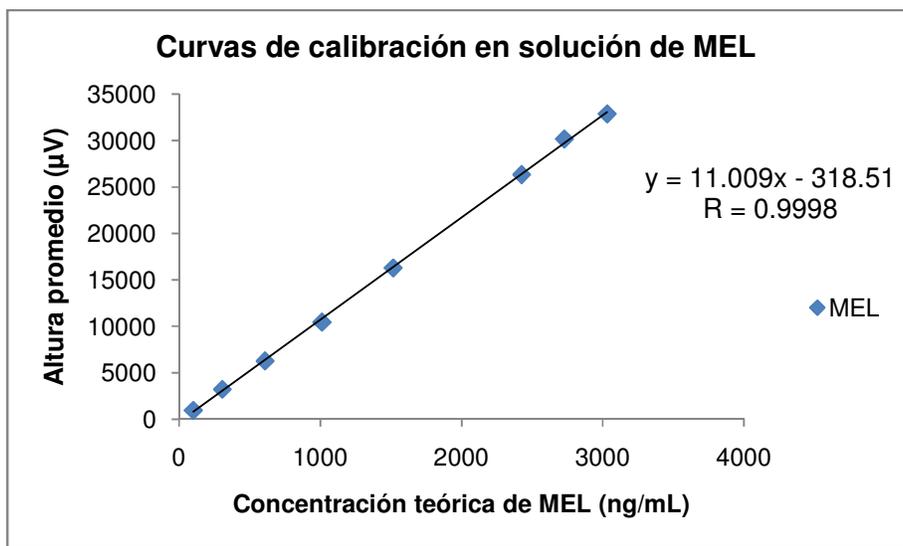
Linealidad del sistema de MEL

Se graficó el promedio de las alturas obtenidas de MEL en solución, observándose un comportamiento lineal el cual fue descrito por la ecuación $y = 11.009X - 318.51$ con un coeficiente de correlación lineal de 0.9998, con lo anterior el sistema de MEL cumple con el parámetro de linealidad. En la gráfica

3 se observa la curva de calibración en solución de MEL en un rango de concentraciones de 100 – 3032 ng/mL, en la tabla 10 se muestran el promedio de la respuesta obtenido de las seis curvas de calibración en solución de MEL, cada punto posee un coeficiente de variación menor al 3% respecto al valor promedio calculado.

Tabla 10. Linealidad en sistema de MEL.

Concentración teórica de MEL (ng/mL)	Altura promedio Calculada \pm D.E. (μ V)	C.V. (%)	E.E.
100	967.010 \pm 7.746	0.801	3.162
304	3212.284 \pm 28.600	0.890	11.676
608	6263.830 \pm 107.460	1.716	43.870
1012	10446.079 \pm 89.553	0.857	36.560
1516	16292.211 \pm 180.661	1.109	73.755
2424	26323.382 \pm 227.188	0.863	92.749
2728	30157.919 \pm 457.786	1.518	186.890
3032	32861.314 \pm 399.555	1.216	163.117



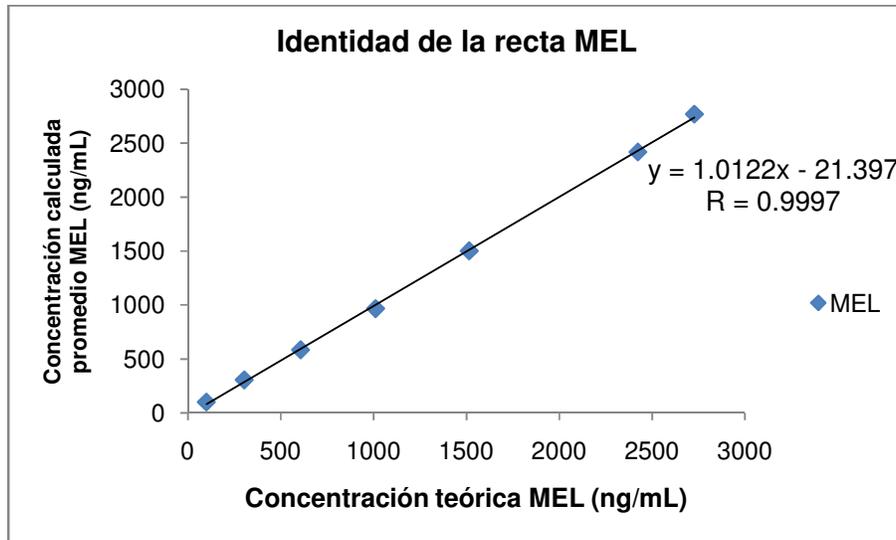
Gráfica 3. Curva de calibración del sistema de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

Identidad de la recta de MEL

Se relacionó el promedio de las concentraciones calculadas (tabla 11) contra la concentración teórica en la gráfica 4, la cual arrojó una pendiente de 1.0122 lo que indicó la proporcionalidad de los datos, una ordenada al origen de -21.397 y un coeficiente de correlación lineal de 0.9997.

Tabla 11. Identidad de la recta de MEL.

Concentración teórica de MEL (ng/mL)	Concentración promedio calculada \pm D.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
100	100.008 \pm 0.045	0.045	100.01
304	305.377 \pm 0.661	0.217	100.45
608	584.452 \pm 3.576	0.612	96.13
1012	967.049 \pm 3.697	0.382	95.56
1516	1501.753 \pm 4.143	0.276	99.06
2424	2419.326 \pm 8.034	0.332	99.81
2728	2769.920 \pm 18.410	0.665	101.54
3032	3017.240 \pm 5.146	0.171	99.51
m	11.009		
b	-318.51		
r	0.9997		
r ²	0.9995		



Gráfica 4. Identidad de la recta de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

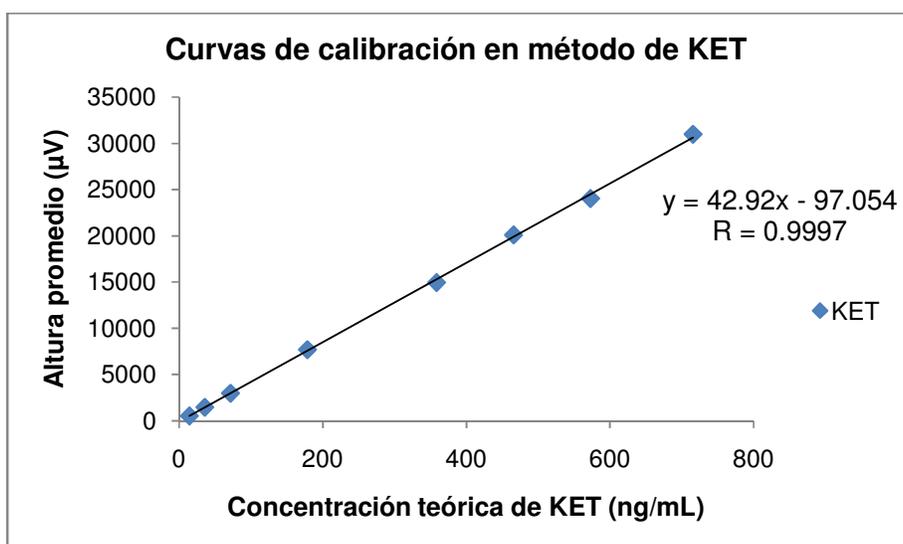
Linealidad del método

Linealidad del método de KET

Esta se determinó evaluando seis curvas de calibración en la matriz biológica en un rango de concentración de 14.29 – 715.71 ng/mL de KET, se graficó el promedio de las alturas de KET (ver tabla 12) versus la concentración teórica de KET y se observó un comportamiento el cual fue descrito por la ecuación $y = 42.92X - 97.054$ con un coeficiente de correlación lineal de 0.9997, con dichos resultados el método de KET cumple con el parámetro de linealidad. En la gráfica 5 se observa la curva de calibración una vez aplicado el método de extracción de KET en un rango de concentraciones antes mencionado, datos mostrados en la tabla 12.

Tabla 12. Linealidad del método de KET.

Concentración teórica de KET (ng/mL)	Altura promedio calculada \pm D.E. (μ V)	C.V. (%)	E.E.
14.29	537.35 \pm 76.01	14.15	31.03
35.71	1479.24 \pm 43.37	2.93	17.71
71.43	2992.77 \pm 88.00	2.94	35.93
178.57	7705.54 \pm 251.58	3.26	102.71
358.57	14950.52 \pm 542.57	3.63	221.50
465.71	20101.38 \pm 823.74	4.10	336.29
572.86	24038.74 \pm 716.16	2.98	292.37
715.71	30978.01 \pm 876.40	2.83	357.79



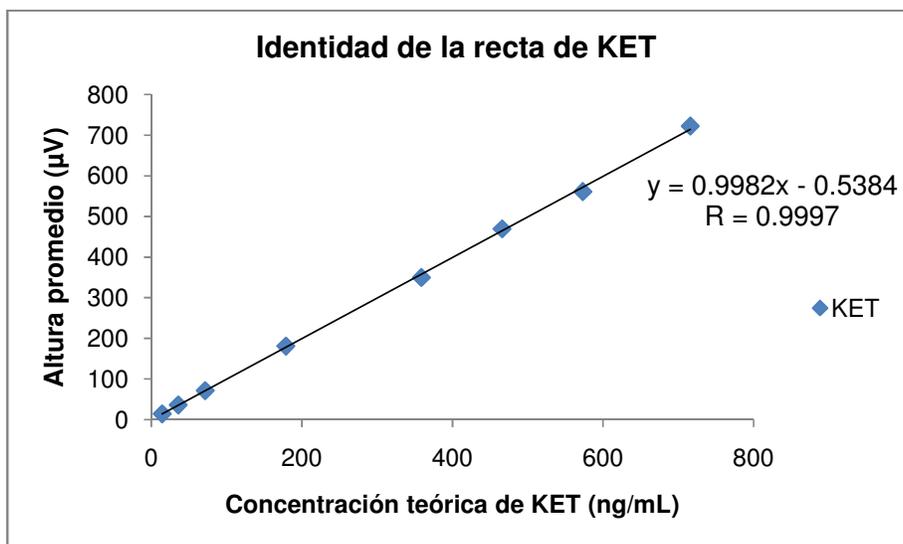
Gráfica 5. Curva de calibración de método de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

Identidad de la recta de KET

Se graficó el promedio de la concentración calculada de seis curvas de calibración versus la concentración teórica (gráfica 6) donde se obtuvo una pendiente de 0.9982, una ordenada al origen de -0.5384 y un coeficiente de correlación lineal de 0.9997, lo que nos indica que hay proporcionalidad de los datos (tabla 13).

Tabla 13. Identidad de la recta de KET.

Concentración teórica de KET (ng/mL)	Promedio de concentración calculada \pm D.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
14.29	14.21 \pm 0.45	3.17	99.44
35.71	36.12 \pm 2.22	6.15	101.15
71.43	71.33 \pm 3.97	5.57	99.86
178.57	180.91 \pm 6.78	3.75	101.31
358.57	349.49 \pm 19.00	5.44	97.47
465.71	469.12 \pm 21.43	4.57	100.73
572.86	560.81 \pm 22.54	4.02	97.90
715.71	722.17 \pm 26.64	3.69	100.90
m	42.92		
b	-97.054		
r	0.9997		
r ²	0.9994		



Gráfica 6 Identidad de la recta de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

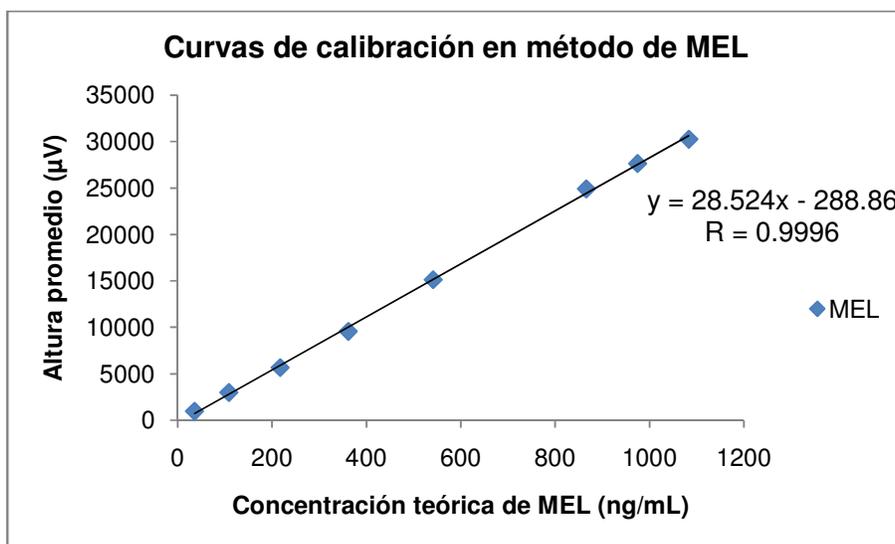
Linealidad del método de MEL

Se graficó el promedio de las alturas calculadas de MEL en seis determinaciones independientes de la curva de calibración (tabla 14) y se observó un comportamiento el cual fue descrito por la ecuación $y = 28.524X - 288.86$ con un coeficiente de correlación lineal de 0.9996, con lo

anterior el sistema de MEL cumple con el parámetro de linealidad. En la gráfica 7 se observa el promedio de la respuesta de las curvas de calibración en método de MEL en un rango de concentraciones de 35.71 – 1082.86 ng/mL.

Tabla 14. Linealidad del método de MEL.

Concentración teórica de MEL (ng/mL)	Altura promedio calculada \pm D.E. (μ V)	C.V. (%)	E.E.
35.71	968.47 \pm 62.76	6.48	25.62
108.57	2984.99 \pm 131.47	4.40	53.67
217.14	5669.85 \pm 84.93	1.50	34.67
361.43	9563.63 \pm 219.08	2.29	89.44
541.43	15126.84 \pm 509.96	3.37	208.19
865.71	24916.32 \pm 907.25	3.64	370.39
974.29	27641.43 \pm 378.42	1.37	154.49
1082.86	30253.26 \pm 508.37	1.68	207.54



Gráfica 7 Curva de calibración de método de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

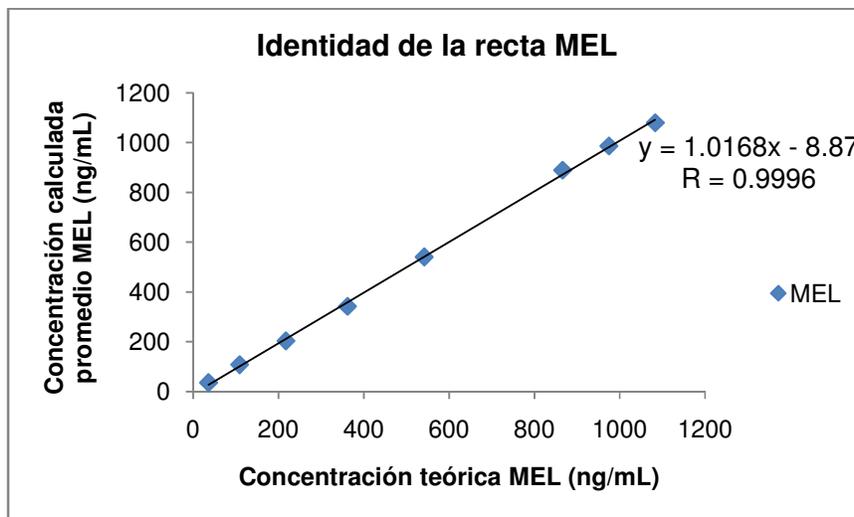
Identidad de la recta de MEL

En la gráfica 8 se relacionó el promedio de las concentraciones de MEL obtenidas de las seis curvas de calibración en método versus la concentración teórica, obteniéndose una pendiente de 1.0168, una ordenada al origen de

-8.87 y un coeficiente de correlación lineal de 0.9996, por lo que hay proporcionalidad entre los datos (tabla 15).

Tabla 15. Identidad de la recta del método de MEL.

Concentración teórica de MEL (ng/mL)	Concentración promedio calculada \pm D.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
35.71	35.96 \pm 0.43	1.19	100.70
108.57	107.84 \pm 3.42	3.17	100.65
217.14	203.55 \pm 1.34	0.66	94.99
361.43	342.32 \pm 6.41	1.87	95.85
541.43	540.62 \pm 21.04	3.89	100.92
865.71	889.46 \pm 40.18	4.52	103.77
974.29	986.74 \pm 21.41	2.17	102.33
1082.86	1079.91 \pm 33.65	3.12	100.79
m	28.524		
b	-288.86		
r	0.9996		
r ²	0.9992		



Gráfica 8 Identidad de la recta de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

5.1.3 Recuperación absoluta

Para el cálculo de recobro, se comparó la respuesta obtenida en el método contra la obtenida por el sistema ya que esta última fue empleada como el 100%, el recobro absoluto obtenido para los analitos se muestra en la tabla 16,

siendo en promedio de 91.9% para KET y de 92.3% para MEL, los resultados en los tres niveles de concentración control fueron consistentes para ambos analitos.

Tabla 16. Recobro absoluto del método analítico.

Sustancia	Nivel	Altura promedio en sistema (μV)	Altura promedio en método (μV)	% Recobro	C.V.
KET	Bajo	1420.3	1280.2	90.13	4.41
	Medio	19130.2	17423.5	91.08	1.57
	Alto	30300.7	28717	94.77	2.44
	Recobro promedio global			91.99	
MEL	Bajo	2056	2037.8	99.12	2.97
	Medio	13159.2	12508.5	95.05	1.12
	Alto	30723.7	30005.8	97.66	3.74
	Reobro promedio global			97.28	

5.1.4 Precisión y Exactitud

5.1.4.1 Repetibilidad

Se analizaron por sextuplicado, muestras en plasma de los tres niveles de concentración control a las cuales se les aplico el método de extracción antes descrito, para ambos analitos se obtuvo un coeficiente de variación menor al 15% respecto al valor nominal. (Datos mostrados en la tabla 17).

Tabla 17. Repetibilidad del método analítico.

Analito	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración medida \pm E.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
KET	28.57	30.19 \pm 0.52	1.72	105.67
	394.29	405.85 \pm 3.77	0.93	102.93
	644.29	668.35 \pm 9.92	1.48	103.73
MEL	72.86	71.08 \pm 1.24	1.74	97.56
	432.86	436.82 \pm 2.69	0.62	100.91
	1010	1052.01 \pm 22.39	2.13	104.16

5.1.4.2 Reproducibilidad

Se realizaron determinaciones de las muestras control en tres días distintos preparando una curva de calibración y tres muestras de cada nivel mencionado por día, aplicando el método de extracción, el promedio de las concentraciones calculadas obtuvieron un coeficiente de variación menor al 15% respecto a su concentración nominal de KET y MEL, con lo que el método fue reproducible, los datos se citan en la tabla 18.

Tabla 18. Reproducibilidad interdía.

Analito	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración medida \pm E.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
KET	28.57	29.65 \pm 0.59	1.99	103.78
	394.29	395.53 \pm 9.83	2.49	100.31
	644.29	652.34 \pm 10.92	1.67	101.25
MEL	72.86	71.35 \pm 0.74	1.04	97.93
	432.86	431.73 \pm 6.46	1.49	99.74
	1010	1029.64 \pm 14.49	1.41	101.94

De acuerdo con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad interdía, el método analítico cumple con el parámetro de exactitud ya que los resultados se encuentran dentro del rango de 85 - 115% de exactitud.

5.1.5 Límite de cuantificación

Las concentraciones promedio de 6 determinaciones independientes de KET y MEL para el cálculo del LC se muestran a continuación en la tabla 19, ambas tuvieron un coeficiente de variación no mayor al 20% y un % de exactitud dentro del rango 80-120%, siendo así el método analítico capaz de cuantificar de manera precisa y exacta la concentración mínima cuantificable.

Tabla 19. Límite de cuantificación de KET y MEL.

Analito	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración promedio (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud	Altura bco (μ V)	Altura promedio muestra (μ V)	Relación señal/ruido
KET	14.29	15.39	0.51	3.31	107.70	13	479.6	36.9
MEL	35.71	37.50	1.39	3.71	105.01	-3	758.8	252.9

5.1.6 Límite de detección

Los resultados de las concentraciones promedio de 6 determinaciones independientes de KET y MEL para el cálculo del LD aparecen en la tabla 20, en la que se aprecia una relación de picos de 21.8 veces mayor por parte de KET contra la emitida por el ruido, y 146.9 veces mayor por parte de MEL en comparación con la que emite el ruido, cumpliendo así con una relación señal-ruido del límite de detección al menos tres veces mayor que la señal del ruido, a su vez, esta determinación no pudo ser cuantificada para ambos analitos de manera exacta pero si precisa ya que las respuestas cromatográficas deben tener una precisión $\leq 20\%$ para establecer dicho límite. Cabe señalar que este parámetro es solo un dato de tipo informativo.

Tabla 20. Límite de detección de KET y MEL.

Analito	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración promedio (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud	Altura bco	Altura promedio muestra	Relación señal/ruido
KET	7.14	9.50	0.10	1.05	133.05	13	283	21.8
MEL	18.57	23.21	0.25	1.08	124.99	-3	440.8	146.9

5.1.7 Estabilidad

Para determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que los compuestos de interés (KET y MEL) conservan sus características en la matriz biológica y en solución, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, se sometieron a diferentes condiciones las muestras.

Se sometieron a estabilidad de 9 horas a temperatura ambiente los tres niveles de concentración control preparándose por triplicado muestras plasmáticas las cuales contenían ambos analitos para cada nivel control, posteriormente estos fueron evaluados junto con un grupo igual de puntos control no sometidos a estabilidad, a su vez, se preparó una curva de calibración para la cuantificación de las muestras mencionadas, las concentraciones calculadas tuvieron un coeficiente de variación menor al 15% respecto a las concentraciones obtenidas de los puntos control no sometidos a estabilidad, con lo anterior tanto KET como MEL conservan sus características durante un periodo de nueve horas a temperatura ambiente, resultados mostrados en la tabla 21.

Tabla 21. Estabilidad a corto plazo (9 horas a temperatura ambiente).

Sustancia	Nivel control (ng/mL)	Concentración calculada frescos (ng/mL)	Concentración calculada sometidos a estabilidad (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exac.
KET	Bajo 28.57	29.09	28.90	0.39	1.35	99.35
	Medio 394.29	409.71	382.58	15.83	4.14	93.38
	Alto 644.29	652.63	643.40	10.22	1.59	98.59
MEL	Bajo 72.86	72.57	69.41	0.69	0.99	95.65
	Medio 432.86	443.37	409.51	16.46	4.02	92.36
	Alto 1010	1030.84	1008.60	14.38	1.43	97.84

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

Se analizaron muestras expuestas por un periodo de 15 días a -80° C, para determinar la estabilidad de KET y MEL contenidos en muestras plasmáticas, una vez transcurrido dicho tiempo se procesaron conforme al método analítico, los resultados cumplieron con la especificación de un coeficiente de variación menor al 15% respecto a las concentraciones obtenidas de las muestras no sometidas a estabilidad (datos no mostrados), por lo que se prolongó el tiempo de dicha condición hasta los 35 días, al analizarlas se corroboró que conservan sus propiedades debido a que las concentraciones de KET y MEL presentaron un coeficiente de variación menor al 15% respecto a la concentración obtenida por los controles no sometidos a estabilidad (tabla 22).

Tabla 22. Estabilidad a largo plazo (35 días a -80° C).

Sustancia	Nivel Control (ng/mL)	Concentración calculada frescos (ng/mL)	Concentración calculada sometidos a estabilidad (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud
KET	Bajo 28.57	28.26	30.33	0.64	2.11	107.32
	Medio 394.29	406.65	397.59	38.69	9.73	97.77
	Alto 644.29	654.04	670.54	32.18	4.79	102.52
MEL	Bajo 72.86	70.83	74.58	1.40	1.88	105.29
	Medio 432.86	432.59	430.31	36.90	8.57	99.47
	Alto 1010	1005.33	1034.58	53.50	5.17	102.91

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

A su vez muestras analizadas fueron estables a los ciclos de congelación-descongelación (sometidas a -80°C por 15 min, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente por 3 ciclos) tabla 23, en la prueba de estabilidad de muestra procesada conservada en el automuestreador a temperatura ambiente se encontró que las muestras son estables por un periodo de hasta 10 horas (tabla 24), los datos mostrados en la tabla 25 corresponden a la estabilidad en solución (33 días en refrigeración) las cuales fueron estables. En todos los casos citados se preparó una curva de calibración

que sirvió para la cuantificación de las muestras controles, para todas las pruebas realizadas se obtuvieron resultados que cumplen con un coeficiente de variación menor al 15% con respecto a la concentración obtenida por los controles no sometidos a estabilidad con lo anterior se demuestra que KET y MEL fueron estables en plasma durante las diferentes condiciones a las que fueron expuestos.

Tabla 23. Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación.

Sustancia	Nivel Control (ng/mL)	Concentración calculada frescos (ng/mL)	Concentración calculada promedio (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud
KET	Bajo 28.57	29.09	29.65	1.14	3.84	101.93
	Medio 394.29	409.71	406.21	15.44	3.80	99.15
	Alto 644.29	652.63	674.96	12.32	1.82	103.42
MEL	Bajo 72.86	72.57	71.16	2.99	4.20	98.06
	Medio 432.86	443.37	437.78	13.86	3.17	98.74
	Alto 1010	1030.84	1031.15	9.29	0.90	100.03

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

Tabla 24. Estabilidad de muestra procesada (10 h en automuestreador no refrigerado).

Sustancia	Nivel Control (ng/mL)	Concentración calculada frescos (ng/mL)	Concentración calculada sometidos a estabilidad (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud
KET	Bajo 28.57	30.09	28.64	2.91	10.16	95.18
	Medio 394.29	425.86	393.25	16.41	4.17	92.34
	Alto 644.29	666.63	647.66	10.35	1.59	97.15
MEL	Bajo 72.86	73.72	71.71	5.84	8.14	97.27
	Medio 432.86	457.66	443.00	2.27	0.51	96.80
	Alto 1010	1034.79	1031.65	12.62	1.22	99.70

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

Tabla 25. Estabilidad en solución de KET y MEL (33 días en solución).

Sustancia	Nivel (ng/mL)	Altura promedio frescos (μV)	Altura promedio sometido a estabilidad (μV)	D.E.	C.V. (%)
KET	Bajo 28.57	1074	1123	57.16	5.09
	Medio 394.29	15362	17220	386.01	2.24
	Alto 644.29	26371	27322	197.14	0.72
MEL	Bajo 72.86	1900	1831	38.28	2.09
	Medio 432.86	11959	11905	299.75	2.52
	Alto 1010	27382	28186	306.00	1.09

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

5.1.8 Tolerancia

Se evaluó la tolerancia del método analítico a pequeñas pero deliberadas modificaciones. Estas consistieron en el cambio de equipo cromatográfico y la tolerancia de la muestra cuando se diluye, esta última consistió en preparar muestras al doble de la concentración del nivel medio de las muestras control.

El método resulto ser tolerante al cambio de equipo (tabla 26), ya que los coeficientes de variación calculados a partir de los triplicados de controles valorados no rebasan el 15% respecto al valor teórico, asimismo, la desviación absoluta no supera el 15% respecto a los controles inyectados en condiciones normales de trabajo. Esta prueba es de de tipo informativo, con esta información se conoce que el método es capaz de responder ante un cambio, es de importancia ya que sirven en dado caso de presentarse alguna contingencia.

Tabla 26. Tolerancia del método analítico ante un cambio de equipo.

Sustancia	Nivel Control (ng/mL)	Concentración calculada equipo UIF-UACL-03 (ng/mL)	Concentración calculada equipo UIF-UACL-01 (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	% Exactitud
KET	Bajo 28.57	30.02	29.71	1.49	5.01	98.97
	Medio 394.29	414.64	393.81	10.75	2.73	94.98
	Alto 644.29	666.72	648.53	11.23	1.73	97.27
MEL	Bajo 72.86	74.19	72.69	4.56	6.27	97.98
	Medio 432.86	446.37	419.27	16.93	4.04	93.93
	Alto 1010	1031.97	987.97	16.31	1.65	95.74

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

5.1.9 Efecto de dilución (1:2)

En la tabla 27 se muestran los resultados del efecto de dilución, las concentraciones obtenidas para KET y MEL poseen un coeficiente de variación menor al 15% respecto a la concentración teórica, con ello el método es capaz de cuantificar muestras que se encuentren concentradas y posteriormente se les realice una dilución en este caso (1:2).

Tabla 27. Efecto de dilución (1:2).

Analito	Concentración teórica (ng/mL)	Concentración promedio \pm D.E. (ng/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
KET	857.14	887.36 \pm 18.76	2.11	103.53
MEL	1571.43	1529.19 \pm 24.30	1.59	97.31

5.2 Métodos analíticos reportados para cuantificar KET y MEL presente en plasma humano.

De acuerdo a lo reportado por Carrasco-Portugal, 2008^[22] para la determinación de MEL presente en plasma, el método descrito fue, adicionar en tubos cónicos de 15 mL, 0.5 mL de plasma (al que se le añadieron concentraciones conocidas de MEL) y se le adicionaron 50 µL de piroxicam con una concentración de 15 µg/mL como EI. Posteriormente se agregaron 50 µL de ácido perclórico al 70% y se agitó por 1 min. Consecutivamente se adicionaron 50 µL de acetonitrilo, se agitó por 1min, se centrifugó por 10 min a 4500 rpm y del sobrenadante se inyectaron 50 µL al sistema cromatográfico, para la separación de los compuestos se empleó una columna Symmetry C₁₈ de 150 X 3.9 mm de longitud y diámetro interno respectivamente, con tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil consistió en una mezcla de solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 0.1 M con acetonitrilo 70:30 (v/v) a una velocidad de flujo constante de 1.5 mL/min, se reportó un tiempo de retención de 5 minutos para piroxicam (EI) y 9.6 minutos para MEL. La detección de los analitos se llevó a cabo por absorbencia a una longitud de onda de 360 nm. El rango de concentraciones empleadas para la calibración fue de 50 – 1500 ng/mL.

Por otra parte, para la determinación de KET en plasma, Patiño-Camacho, 2008^[23] reportó el siguiente método, a 1 mL de plasma presente en un tubo cónico se le adicionaron 50 µL de tolmetin (EI, 10 µg/mL) más 100 µL del estándar de KET, más un volumen de 200 µL de acetato de sodio 0.1 M posteriormente se adicionó un volumen de 6 mL de éter y se agitó por 1 minuto, centrifugó a 3500 rpm por 10 min, congeló la muestra, decantó la fase orgánica en un tubo de boca ancha y evaporó a 35°C bajo flujo de nitrógeno hasta sequedad, el residuo fue reconstituido con 600 µL de agua desionizada de los cuales se tomaron 200 µL para ser inyectados al cromatografo. Se empleó una columna Symmetry C₁₈ de 150 X 3.9 mm, con tamaño de partícula de 5 µm. La solución de fase móvil estuvo constituida de un buffer de Na₂PO₄ 0.01M pH = 3 y acetonitrilo 60:40 % v/v a un flujo de 1 mL/min, se obtuvo un

tiempo de retención aproximado de 7.7 min para KET y 10.5 min para tolmetin (EI). La detección de los analitos se llevó a cabo por UV a una longitud de onda de 313 nm y el rango de concentraciones manejadas fue de 5 a 1000 ng/mL.

Otro método descrito por Velpandian Thirumurthy, 2000 ^[17] consistió en adicionar 10 µL de las soluciones estándar de MEL y 5 µL de solución EI (9.19 µg/mL piroxicam) a 100 µL de plasma, seguido de 100 µL de HCl 1 M. El plasma desproteínizado se extrajo con 2 mL de cloroformo, los contenidos fueron agitados por 3 min y 1 mL de la fase orgánica se colocó en un tubo de vidrio. El cloroformo fue evaporado a 60°C bajo un flujo constante de nitrógeno, el residuo fue reconstituido con 100 µL de fase móvil, de los cuales se inyectaron 10 µL al sistema cromatográfico. La fase móvil consistió de una solución acuosa de hidrogenoortofosfato de diamonio (50 mM), metanol y acetonitrilo en una relación de (5:4:1 v/v). La columna empleada fue Lichrocart (125x34 mm, 5 µm de tamaño de partícula) RP-18 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se utiliza para la separación analítica y Lichrocart (4x4 mm, 5 µm de tamaño de partícula) RP-18 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) que se utiliza como una columna de seguridad., la cual se manejó a una temperatura ambiente 30.3 ±1.1°C, la velocidad de flujo fue de 1 mL/min, la detección UV se logró a una longitud de onda de 364 nm, el tiempo de retención para los analitos fue de 2.7 min para MEL y de 1.9 min para piroxicam. El rango de concentraciones empleado para la cuantificación de MEL va de 0.052 a 52 µg/mL.

En comparación con los métodos antes citados, el método analítico validado fue capaz de cuantificar KET y MEL de manera simultánea, mediante un proceso de extracción simple. Con respecto a lo reportado por Carrasco-Portugal ^[22] se disminuyó el tiempo de retención de MEL de 9.6 a 5.4 minutos, y la velocidad de flujo de 1.5 a 1.0 mL/min lo que logró un ahorro en los reactivos empleados para la fase móvil. En el caso de KET se logró disminuir la cantidad de plasma de 1 a 0.5 mL y el volumen de solvente empleado de 6 a 4 mL en la extracción así como el tiempo de retención del analito (KET) de 7.7 a 3.8 minutos citado por Patiño-Camacho ^[23].

5.3 Validación del método analítico para cuantificar KET y MEL en formulación de gel.

5.3.1 Selectividad

Al analizar las muestras de gel no se observaron interferencias por componentes presentes en él, lográndose satisfactoriamente la cuantificación de KET y MEL, la fase móvil empleada en el análisis tampoco presentó interferencia con los analitos.

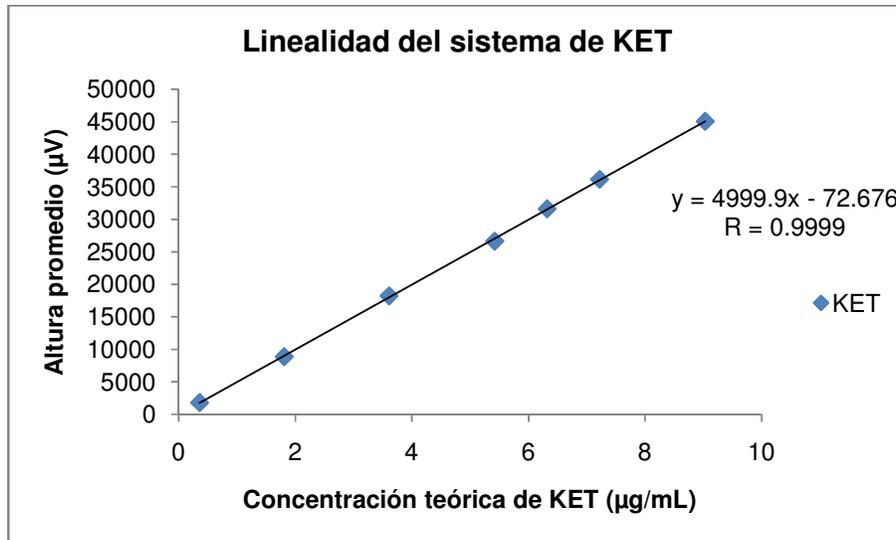
5.3.2 Linealidad sistema de KET

En la tabla 28 se muestran las alturas promedio obtenidas conforme a cada concentración, para todos los puntos de la curva se obtuvo un coeficiente de variación menor al 3% respecto a su valor promedio calculado.

Tabla 28. Linealidad en sistema de KET.

Concentración teórica de KET ($\mu\text{g/mL}$)	Altura promedio calculada \pm D.E. (μV)	C.V. (%)	E.E.
0.36	1788.281 \pm 5.631	0.315	2.299
1.81	8858.879 \pm 26.503	0.299	10.820
3.61	18208.051 \pm 38.719	0.213	15.807
5.42	26645.883 \pm 96.870	0.364	39.547
6.32	31609.011 \pm 112.544	0.356	45.946
7.22	36151.746 \pm 142.418	0.394	58.142
9.03	45076.828 \pm 145.838	0.324	59.538

En la gráfica 9 se observa el promedio de las 6 curvas de calibración en solución, las cuales plantearon la linealidad del sistema de KET que se encuentra descrita por la ecuación $y = 4999.9x - 72.676$, con un coeficiente de correlación lineal de 0.9999, con los resultados anteriores se cumple con el parámetro de linealidad del sistema de KET.



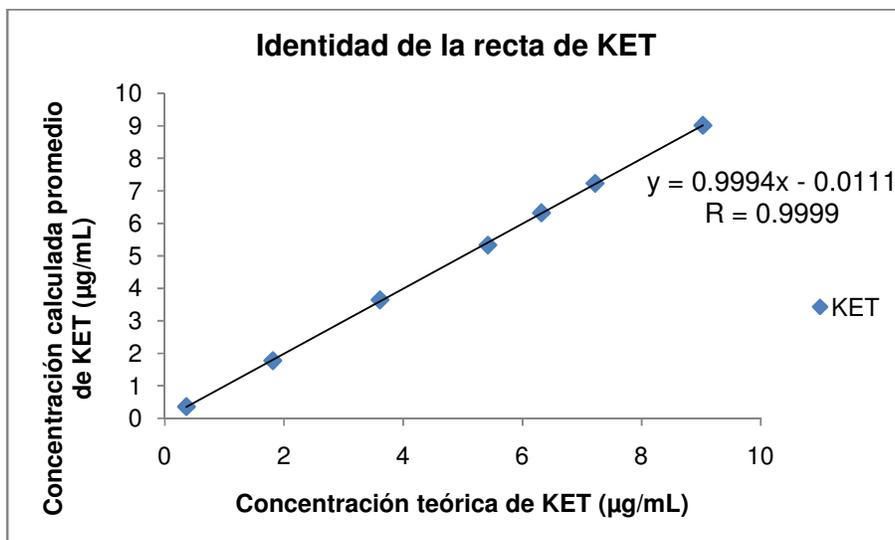
Grafica 9. Curva de calibración del sistema de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

5.3.2.1 Identidad de la recta de KET

Se comparó el promedio de las concentraciones calculadas contra la concentración teórica de estas en la gráfica 10, se obtuvo una pendiente de 0.9994 la cual nos indicó que el valor de concentraciones calculadas es cercano al teórico, una ordenada al origen de -0.0111 y un coeficiente de correlación lineal de 0.9999. Los valores promedio de las concentraciones de las curvas de calibración obtuvieron un coeficiente de variación menor al 3% (datos mostrados en la tabla 29).

Tabla 29. Identidad de la recta de KET.

Concentración teórica de KET (µg/mL)	Concentración promedio calculada \pm D.E. (µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
0.36	0.361 \pm 0	0	100.28
1.81	1.774 \pm 0.006	0.319	98.01
3.61	3.643 \pm 0.012	0.341	100.91
5.42	5.330 \pm 0.014	0.270	98.34
6.32	6.322 \pm 0.008	0.124	100.03
7.22	7.229 \pm 0.023	0.319	100.12
9.03	9.014 \pm 0.014	0.157	99.82
m	4999.9		
b	-72.676		
r	0.9999		
r ²	0.9998		



Gráfica 10. Identidad de la recta de KET. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

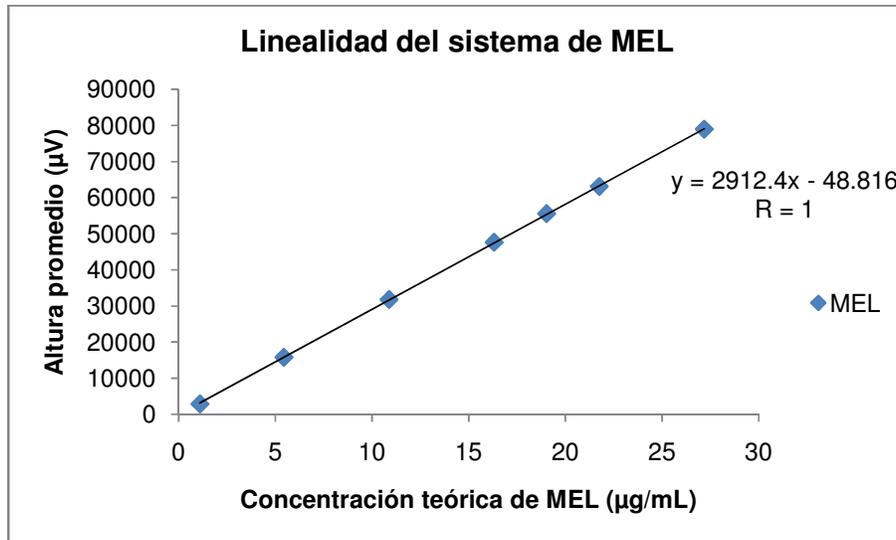
5.3.3 Linealidad del sistema de MEL

En la tabla 30 se tiene la respuesta promedio obtenida para cada concentración a partir de las seis curvas de calibración en solución, las cuales poseen un coeficiente de variación menor al 3% respecto a él valor promedio calculado.

Tabla 30. Linealidad en sistema de MEL.

Concentración teórica de MEL ($\mu\text{g/mL}$)	Altura promedio calculada \pm D.E. (μV)	C.V. (%)	E.E.
1.09	2916.206 \pm 10.224	0.351	4.174
5.43	15778.854 \pm 57.448	0.364	23.453
10.87	31769.805 \pm 79.320	0.250	32.382
16.30	47609.115 \pm 218.296	0.459	89.119
19.02	55530.494 \pm 220.945	0.398	90.200
21.74	63081.845 \pm 286.518	0.454	116.970
27.17	78926.790 \pm 290.604	0.368	118.638

En la gráfica 11 se muestra la linealidad del sistema de MEL el cual quedo descrito por la ecuación $y = 2912.4x - 48.816$ y posee un coeficiente de correlación lineal de 1, con ello se cumple con el parámetro de linealidad del sistema de MEL.



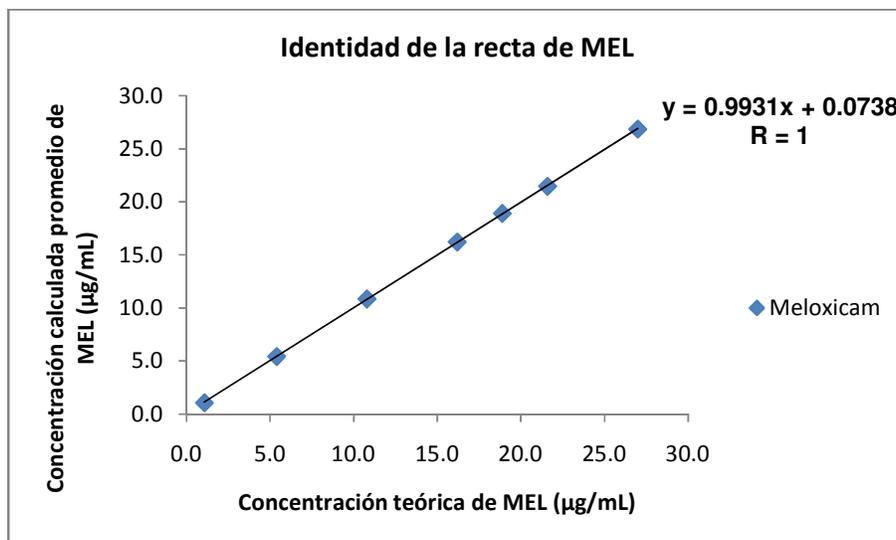
Grafica 11. Curva de calibración del sistema de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

5.3.3.1 Identidad de la recta de MEL

Las concentraciones calculadas promedio tuvieron un coeficiente de variación menor al 3% (tabla 31), al graficar estos valores versus la concentración teórica se obtuvo una pendiente de 0.9931, la cual indicó que las concentraciones calculadas son proporcionales a las teóricas, una ordenada al origen de 0.0738, y un coeficiente de correlación lineal de 1 (ver gráfica 12).

Tabla 31. Identidad de la recta de MEL.

concentración teórica de MEL (µg/mL)	Concentración promedio calculada \pm D.E.(µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
1.09	1.078 \pm 0.001	0.048	98.90
5.43	5.437 \pm 0.012	0.222	100.13
10.87	10.856 \pm 0.020	0.180	99.87
16.30	16.223 \pm 0.026	0.160	99.53
19.02	18.907 \pm 0.051	0.267	99.41
21.74	21.466 \pm 0.038	0.178	98.74
27.17	26.835 \pm 0.049	0.183	98.77
m	2912.4		
b	-48.816		
r	1		
r ²	1		



Gráfica 12. Identidad de la recta de MEL. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de seis determinaciones para cada nivel de concentración.

5.3.4 Recuperación absoluta

Se comparó la respuesta de KET y MEL obtenida en el método contra la obtenida por el sistema. Ésta última fue empleada como el 100%. Para el cálculo de recobro absoluto de KET se hizo un ajuste de altura obtenida en el sistema de una concentración de 7.22 µg/mL, a un valor de 4.88 µg/mL de KET. Esto se realizó porque el analito se cuantifica como KET base y no en forma de sal. Los resultados obtenidos para los analitos se muestran en la tabla 32 (101.06 % para KET y 100.91% para MEL).

Tabla 32. Recobro absoluto de KET y MEL.

Analito	Concentración teórica (µg/mL)	Altura promedio en sistema (µV)	Altura equivalente a 4.88 µg/mL de KET en sistema (µV)	Altura promedio en método (µV)	% Recobro	% Recobro real	C.V. (%)
KET	7.22	35764.333	24173.12	24429.5	67.59	101.06	1.590
MEL	21.74	63170.167	---	63745.833	100.91	---	1.745

5.3.5 Precisión y Exactitud

5.3.5.1 Repetibilidad

Los resultados de las 6 determinaciones independientes para evaluar la repetibilidad del método se muestran en la tabla 33, el promedio de las concentraciones de KET y MEL presentaron un coeficiente de variación menor al 10% y un % de exactitud que está dentro del rango de 90-110%, respecto a su valor teórico, en base a lo anterior el método analítico resultó ser preciso y exacto.

Tabla 33. Repetibilidad del método de KET y MEL.

Analito	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración promedio ± E.E. (µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
KET	4.88	4.936 ± 0.039	1.935	101.15
MEL	21.74	21.718 ± 0.181	2.041	99.89

5.3.5.2 Reproducibilidad interdía

Se analizaron por triplicado muestras de gel durante 3 días, las concentraciones promedio se muestran en la tabla 34 donde se aprecia un coeficiente de variación menor al 10% y un % de exactitud dentro del rango de 90-110% con esto el método cumple con el parámetro de reproducibilidad.

Tabla 34. Reproducibilidad interdía del método analítico para cuantificar KET y MEL.

Analito	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración promedio ± E.E. (µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud
KET	4.88	4.916 ± 0.025	1.511	100.74
MEL	21.74	21.422 ± 0.249	3.480	98.54

5.3.6 Límite de cuantificación (LC)

A partir de seis determinaciones independientes se obtuvo el promedio de las concentraciones para el cálculo del LC, el cual resultó ser preciso y exacto, ya que presentó un coeficiente de variación menor al 10% y un % de exactitud que

se encuentra dentro del rango de 90-110% tanto para KET como para MEL, los resultados se observan en la siguiente tabla.

Tabla 35. Límite de cuantificación de KET y MEL.

Analito	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. promedio ± E.E. (µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud	Altura bco	Altura muestra	Relación señal/ruido
KET	0.36	0.367 ± 0.000	0.214	102.0	1	1724	1724
MEL	1.09	1.096 ± 0.001	0.120	100.6	-1	2876.7	2876.7

5.3.7 Límite de detección (LD)

En la tabla 36 se describen el promedio de los valores de seis determinaciones independientes para el LD de KET y MEL, las concentraciones calculadas resultaron ser precisas pero no exactas ya que no son cercanas al valor teórico, se sabe que el método es preciso y exacto en un rango de concentraciones de 0.36-9.03 µg/mL de KET y 1.09-27.17 µg/mL de MEL por lo que a concentraciones más bajas se desconoce su comportamiento, se presentó una relación de 83.8 veces mayor la señal de KET en relación a la emitida por el ruido presente que emitió la fase móvil, y de 135 veces mayor la señal de MEL, con lo anterior el LD cumple con una señal 3 veces mayor a la emitida por el ruido para ambos analitos y una respuesta cromatográfica con precisión ≤10% para establecer dicho límite. Cabe señalar que este parámetro es solo un dato de tipo informativo.

Tabla 36. Límite de detección de KET y MEL.

Analito	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. Promedio ± E.E. (µg/mL)	C.V. (%)	% Exactitud	Altura bco	Altura muestra	Relación señal/ruido
KET	0.018	0.0236 ± 0.000	1.48	131.30	1	83.8	83.8
MEL	0.055	0.1494 ± 0.001	0.94	271.64	-1	135	135

5.3.8 Estabilidades

5.3.8.1 Estabilidad de muestra procesada

Se valoraron tres muestras de gel a las cuales se les aplicó el método analítico, dichas muestras se conservaron por un periodo de 24 h en el automuestreador a temperatura ambiente, después de transcurrido dicho periodo de tiempo se inyectaron junto con muestras a las que no se les sometió a dicha condición contra las cuales se compararon, los resultados se aprecian en la tabla 37. Los coeficientes de variación calculados a partir de las muestras sometidas a la estabilidad no rebasan el 10%, asimismo, la desviación absoluta no supera el 10% respecto a los controles inyectados en condiciones normales de trabajo.

Tabla 37. Estabilidad de muestra procesada almacenada en automuestreador por 24 h

Sustancia	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración calculada frescos (µg/mL)	Concentración calculada sometidos a estabilidad (µg/mL)	D.E.	C.V. (%)	Desv. Abs.
KET	4.88	4.923	4.924	0.063	1.289	0.027
MEL	21.74	21.49	21.187	0.563	2.656	1.414

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

5.3.8.2 Estabilidad en solución

En la tabla 38 se muestran los resultados de la respuesta calculada de KET y MEL en solución conservada en refrigeración por 12 días, se analizaron por triplicado las soluciones de concentración control (bajo, medio y alto), las cuales fueron sometidas a dicha condición, posteriormente se compararon contra la respuesta de soluciones de concentración control no sometidos a condiciones de estabilidad.

Tabla 38. Estabilidad en solución de KET y MEL.

Sustancia	Nivel control (µg/mL)	Altura sol. frescos (µV)	Altura sol. sometidas a estabilidad (µV)	D.E.	C.V. (%)	Desv. Abs.
KET	Bajo 0.90	4441	4257	23.965	0.563	4.158
	Medio 4.52	22374	21285	22.546	0.106	4.869
	Alto 8.13	39828	38775	38.786	0.1	2.644
MEL	Bajo 2.72	7650	7633	44.881	0.588	0.222
	Medio 13.59	39609	38265	76.788	0.201	3.392
	Alto 24.45	71321	69212	38.837	0.056	2.957

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

El criterio de aceptación para establecer que los analitos KET y MEL son estables al ser sometidos a dichas condiciones de temperatura y tiempo es cumplir con un coeficiente de variación y desviación absoluta menor al 10% respecto a los controles no sometidos a estabilidad.

5.3.9 Tolerancia al cambio de proporción en la fase móvil

Se evaluó la tolerancia del método analítico al cambio en la proporción de los componentes en la fase móvil en un $\pm 2\%$ de solvente orgánico, con lo anterior se probaron dos fases móviles con las proporciones de 58:42 y 62:38 v/v de amortiguador de fosfato de sodio monobásico 0.05 M (pH = 3.5): acetonitrilo respectivamente. Se analizaron por triplicado las soluciones de los tres niveles de control en ambas pruebas.

El método resultó ser tolerante a la fase móvil con proporción de 62:38 v/v amortiguador : ACN, los tiempos de retención de KET y MEL se vieron modificados ya que eluyeron más lento debido a que la fase móvil se volvió un poco más acuosa; sin embargo, los analitos se pudieron cuantificar sin ningún problema, en la tabla 39 se puede observar la comparación de las concentraciones obtenidas las cuales cumplen con un coeficiente de variación menor al 10% respecto a las concentraciones obtenidas en condiciones normales de trabajo.

Con un cambio en la proporción a 58:42 v/v buffer: ACN, en la fase móvil esta se vuelve más orgánica y los analitos eluyen de más rápido con lo que el MEL no se logró cuantificar debido a que el cambio en la longitud de onda interfirió con él sesgando el pico, con esto el método analítico no toleró un aumento de 2% en el solvente orgánico.

Tabla 39. Tolerancia al cambio de proporción de solvente orgánico - 2% de solvente orgánico.

Sustancia	Nivel control (µg/mL)	Concentración calculada frescos (µg/mL)	Concentración calculada sometidos a estabilidad (µg/mL)	D.E.	C.V.%	Desv. Abs.
KET	Bajo 0.90	0.9	0.893	0	0.023	0.793
	Medio 4.52	4.484	4.472	0.004	0.094	0.275
	Alto 8.13	8.059	7.998	0.024	0.294	0.755
MET	Bajo 2.72	2.707	2.677	0.004	0.142	1.1
	Medio 13.59	13.518	13.41	0.012	0.087	0.793
	Alto 24.45	24.376	24.199	0.075	0.311	0.727

Cada dato representa el promedio de tres determinaciones para cada nivel de concentración control.

La ventaja de ambos métodos es que se logró la determinación simultánea de KET y MEL para el análisis de muestras plasmáticas y muestras de gel que contengan ambos fármacos.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que los métodos analíticos cumplen con los criterios de validación de la NOM-177-SSA1-1998, siendo estos sencillos y económicos, para determinar las concentraciones de MEL y KET en plasma humano y en gel de uso tópico mediante HPLC con detección UV.

El método analítico para cuantificar KET y MEL en plasma humano evaluado en un rango de concentraciones de 14.29 a 715.71 ng/mL para KET y de 35.71 a 1082.86 ng/mL para MEL, es adecuado y puede ser empleado con seguridad en estudios de farmacocinética o en cualquier estudio en el que se requieran medir las concentraciones plasmáticas de estos fármacos.

El método analítico para la determinación de KET y MEL en formulación de gel validado en un rango de concentraciones de 0.36 a 9.03 µg/mL para KET y de 1.09 a 27.17 µg/mL para MEL puede emplearse para llevar a cabo el control de calidad del producto terminado.

El gel analizado presentó una proporción de 101.06% de KET y 100.91% de MEL respecto a lo especificado en el marbete.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Willard Hobart H., Merritt Lynne L., Dean John A., y Settle Frank A. 2002. Métodos instrumentales de análisis. México. Grupo Editorial Iberoamérica, 569.
- [2] Rouessac F., y Rouessac A. 2003. Análisis Químico métodos y técnicas instrumentales modernas. España. Mc Graw-Hill. Primera edición, 7.
- [3] Skoog A., West M., James F., y Crouch Stanley R. 2005. Fundamentos de química analítica. México. Thomson, Octava edición, 662 – 670.
- [4] Panchagnula R., y Narisetty S.T. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. 2000. Journal of Pharmaceutics. 201, 131–150.
- [5] Goodman y Gilman. 1996. Capítulo 1 Farmacocinética. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México. Mc Graw Hill Interamericana. Novena Edición, 5 – 24.
- [6] Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., y Moore P.K. 2004. Farmacología. Madrid. Churchill Livingstone, Quinta Edición, 96 – 113.
- [7] Bevan J.A. 1982. Fundamentos de farmacología, Introducción a los principios de acción de los fármacos. México. Harla Harper y Row Latinoamericana, Segunda Edición, 10 – 25.
- [8] Katzung B.G. 2005. Farmacología básica y clínica. México. El Manual Moderno, Novena Edición, 35 – 41.
- [9] Mc VAN B.F. 1997. Índice de Medicamentos. México. El Manual Moderno. Primera edición, 125 – 126, 882.
- [10] Chaudhary R.S., Gangwal S.S., Jindal K.C., y Khanna S. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of ketorolac and its application to bioequivalence studies in human serum. 1993. Journal of Chromatography. 614, 180 – 184.
- [11] Wang Z., Dsida R.M., y Avram M.J. Determination of ketorolac in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using solid-

phase extraction and ultraviolet detection. 2001. *Journal of Chromatography B*. 755, 383 – 386.

[12] Sweetman S.C. 2003. *Martindale Guía completa de consulta farmacoterapéutica*. España. Pharma Editores. Primera edición, 63 – 66.

[13] Rodríguez R. 2000. *Vademécum Académico de Medicamentos*. México. Mc Graw-Hil Interamericana, Tercera Edición, 551.

[14] Hayball P.J., Wrobel J., Tamblyn J.G., y Nation R.L. The pharmacokinetics of ketorolac enantiomers following intramuscula administration of the racemate. 1994. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 37, 75 – 78.

[15] Dsida R.M., Wheeler M., Birmingham P.K., Wang Z., Heffner C.L., Cote C.J., y Avram M.J. Age-Stratified pharmacokinetics of Ketorolac tromethamine in pediatric surgical patients. 2002. *Journal Anesth Analg*. 94, 266 –270.

[16] Pérez J., Granados V., Castañeda G., Hong E., González C., Martínez J.L., y Flores F.J. Analgesic efficacy and bioavailability of Ketorolac in postoperative pain: a probability analysis. 2000. *Archives of Medical Research*. 31, 191–196.

[17] Velpandian T., Jaiswal J., Bhardwaj R.K., y Gupta S.K. Development and validation of a new high-performance liquid chromatographic estimation method of meloxicam in biological samples. 2000. *Journal of Chromatography B*. 738, 431–436.

[18] Arayne S., Sultana N., y Siddiqui F.M. A new rp-hplc method for analysis of meloxicam in tablets. 2005. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 18, 58 – 62.

[19] Meineke I., y Türck D. Population pharmacokinetic analysis of meloxicam in rheumatoid arthritis patients. 2003. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 55, 32 – 38.

[20] Bae J.W., Kim M.J., Jang C.G., y Lee S.Y. Determination of meloxicam in human plasma using a HPLC method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study. 2007. *Journal of Chromatography B*. 859, 69 – 73.

[21] Hynninen V.V., Olkkola K.T., Bertilsson L., Kurkinen K.J., Korhonen T., Neuvonen P.J., y Laine K. Voriconazole increases while Itraconazole decreases plasma Meloxicam concentrations. 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 587 – 592.

[22] Carrasco M. 2008. Estudios farmacocinéticos en mexicanos. Evidencia de diferencias interétnicas y sus posibles causas. Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias en Investigación en Medicina. Escuela Superior de Medicina. IPN. México, D.F., 107 – 108.

[23] Patiño S. 2008. Farmacocinética y efecto analgésico del Ketorolaco, solo y combinado con vitaminas del complejo B, en pacientes con dolor moderado. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias en Investigación Clínica. Escuela Superior de Medicina. IPN. México, D.F., 36 – 38.

[24] NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.