



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA DETERMINACIÓN DE NIFEDIPINA Y SU METABOLITO
NIFEDIPINA OXIDADA EN PLASMA MEDIANTE CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ERÉNDIRA SELENE SANTOS TORRES



MÉXICO, D.F.

2014



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: DRA. JOSEFINA ELIZALDE TORRES

VOCAL: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

1er. SUPLENTE: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

2° SUPLENTE: M. EN C. KENNETH RUBIO CARRASCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

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

SUSTENTANTE: ERÉNDIRA SELENE SANTOS TORRES

Agradecimientos

Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por los años transcurridos, el conocimiento adquirido y las miles de experiencias que ahora son recuerdos invaluable, porque ahora son parte de mí, de lo que soy y seré.

A mis sinodales el Dr. Fausto Rivero y la Dra. Josefina Elizalde por su apoyo, observaciones y aportaciones a éste trabajo.

A la Dra. Miriam Carrasco y al Dr. Flores por la confianza y apoyo que me han brindado a lo largo de éste proyecto.

A la M. en C. Ariadna Cervantes por su amistad, apoyo, confianza, regaños, en fin por guiarme en todo momento, por todo lo que me ha enseñado académica y personalmente.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, Ana, Stephanie y Guadalupe, por su ayuda, consejos, pláticas, risas y compañía en todo momento, mil gracias por formar parte de ésta etapa que finaliza.

A la Dra. Marce, el Dr. Juan Carlos, las enfermeras Angie y Tere, Mary Sandra y Edith, por esa sonrisa con la que día a día me reciben en la UIF, y por su agradable compañía.

A todos los profesores que a lo largo de mi formación académica han sido parte vital para que ahora yo haya llegado hasta este punto, finalizando mi licenciatura. En especial gracias a mi profesor Ricardo Pizano, que me enseñó que primero hay que estudiar y después hay tiempo para divertirse, a la profesora Gloria y al profesor Gonzalo que me iniciaron para descubrir mi amor por la química, al profesor Juan Carlos Islas por darme otra visión del mundo mediante el arte, a mis profesoras de Literatura por darme a conocer el gran mundo de la lectura, al profesor Alejandro Rivera, a la profesora Juana Silvia, por reafirmar que mi camino era la química y finalmente a los profesores Carlos Cosío y José Landeros por guiarme en la carrera, por su apoyo, consejos, interés y amistad.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 Conceptos Generales de Farmacocinética.....	1
1.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	11
1.2.1 Instrumentación del Equipo HPLC.....	14
1.2.2 Aplicaciones de la Cromatografía de Líquidos de Alta.....	21
Resolución	
1.3 Validación de un Método Analítico en Fluidos Biológicos.....	22
1.3.1 Definiciones.....	23
1.4 Nifedipina y Nifedipina Oxidada.....	26
1.4.1 Propiedades Físico-Químicas.....	26
1.4.2 Farmacocinética.....	28
1.4.3 Farmacodinamia.....	29
1.4.4 Usos Terapéuticos y Dosis.....	30
1.4.5 Reacciones Adversas.....	32
1.4.6 Toxicidad.....	33
1.5 Métodos para la Extracción de NIF y NOX.....	35

CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Reactivos, Equipos e Instrumentos.....	38
2.2 Preparación de Soluciones.....	40
2.3 Desarrollo del Método Analítico.....	42
2.4 Parámetros de Validación del Método Analítico.....	43

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Desarrollo del Método Analítico.....	52
3.1.1 Condiciones Cromatográficas.....	52
3.1.2 Curva de Calibración y Muestras Control.....	52
3.1.3 Proceso de Extracción.....	54
3.2 Validación del Método Analítico.....	57
3.2.1 Selectividad.....	57
3.2.2 Linealidad.....	59
Sistema	
Método	
3.2.3 Precisión.....	67
Repetibilidad	
Reproducibilidad	
3.2.4 Exactitud.....	69
3.2.5 Recobro.....	69

3.2.6 Límite de Cuantificación.....	70
3.2.7 Límite de Detección.....	71
3.2.8 Efecto de Dilución.....	72
3.2.9 Tolerancia.....	72
3.2.10 Estabilidades.....	74
CONCLUSIONES.....	81
REFERENCIAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso LADME	2
Figura 2. Influencia de la vía de administración. (A) y la forma farmacéutica (B) en las concentraciones plasmáticas de un fármaco en determinado lapso de tiempo ⁶	4
Figura 3. Parámetros farmacocinéticos. ¹	5
Figura 4. Fases del metabolismo de fármacos. ⁶	8
Figura 5 Esquema del proceso de eliminación de fármacos liposolubles e hidrosolubles en su paso por el riñón e hígado. ⁴	10
Figura 6. Clasificación de la cromatografía en base a su fase estacionaria y fase móvil. ¹⁰ ..	12
Figura 7. Representación esquemática del equipo de HPLC.	14
Figura 8. Celda del detector UV en HPLC. ¹⁰	19
Figura 9. Cromatograma en el cual se representan dos compuestos el A y B con la señal obtenida del detector con respecto al tiempo, el tiempo muerto (t_0) y el tiempo de retención para cada compuesto (t_{rA} y t_{rB}). ¹⁰	20
Figura 10. Estructura química de la Nifedipina (NIF) y su metabolito Nifedipina Oxidada (NOX).	26
Figura 11. Oxidación de Nifedipina por acción de la luz UV y generación de Nifedipina Oxidada. ³⁶	28
Figura 12. Esquema metabólico de la Nifedipina. ³⁵	29
Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de extracción líquido-líquido de Nifedipina y Nifedipina Oxidada.	55
Figura 14. Cromatograma de Selectividad del Método. A) Control medio NOX 50 ng/mL 400 ng/mL, B) Blanco de reactivos, C) Blando de plasma, D) Límite de cuantificación NOX 10 ng/mL.....	57
Figura 15. Cromatograma de Selectividad en propiedades de la matriz biológica. A) Límite de cuantificación NOX 10 ng/mL y NIF 30 ng/mL, B) Plasma hemolizado, C) Plasma lipémico y D) Plasma con heparina.....	58
Figura 16. Cromtograma de Selectividad en fármacos de uso común. A) Límite de Cuantificación NOX 10 ng/mL y NIF 30 ng/mL, B) Plasma cargado con cafeína 30 µg/mL, C) Plasma cargado con Ibuprofeno 60 µg/mL, D) Plasma cargado con paracetamol 30 µg/mL.	58
Figura 17. Cromatografía Límite de Detección para Nifedipina y Nifedipina Oxidada. A) Límite de detección NOX 5 ng/mL y NIF 15 ng/mL, B) blanco de plasma.	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina Oxidada en Sistema.....	59
Gráfica 2. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina Oxidada.....	60
Gráfica 3. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina en Sistema.	61
Gráfica 4. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina.....	62
Gráfica 5. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina Oxidada en Método.....	64
Gráfica 6. Identidad de la recta Nifedipina Oxidada.....	65
Gráfica 7. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina en Método.	66
Gráfica 8. Identidad de la recta Nifedipina.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de la fase normal y fase reversa en cromatografía de líquidos. ¹¹	13
Tabla 2. Grupos funcionales polares y no polares empleados en la fase estacionaria normal y reversa. ¹⁰	17
Tabla 3. Compilación de la administración de Nifedipina en diversos padecimientos. ^{26, 27, 28}	31
Tabla 4. Compilación de los métodos analíticos reportados en la literatura para extraer y cuantificar Nifedipina Oxidada y Nifedipina en plasma. ^{56,57,50,35,58}	36
Tabla 5. Compilación de los métodos analíticos reportados en la literatura para extraer Nifedipina y cuantificarla mediante detección UV. ^{70,71,40,43,72}	37
Tabla 6. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina oxidada y Nifedipina para el Límite de Detección.....	47
Tabla 7. Condiciones cromatográficas finales empleadas en la validación de Nifedipina Oxidada y Nifedipina.....	52
Tabla 8. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina.....	53
Tabla 9. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina Oxidada.....	53
Tabla 10. Curva de calibración, puntos control y Límite de Cuantificación para Nifedipina y Nifedipina Oxidada.....	54
Tabla 11. Linealidad del Sistema Nifedipina Oxidada.....	59
Tabla 12. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina Oxidada.....	60
Tabla 13. Linealidad del Sistema Nifedipina.....	61
Tabla 14. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina.....	62
Tabla 15. Linealidad del Método Nifedipina Oxidada.....	63
Tabla 16. Identidad de la recta Nifedipina Oxidada.....	64
Tabla 17. Linealidad del Método de Nifedipina.....	65
Tabla 18. Identidad de la recta Nifedipina.....	66
Tabla 19. Repetibilidad Nifedipina Oxidada.....	68
Tabla 20. Repetibilidad Nifedipina.....	68
Tabla 21. Reproducibilidad de variabilidad inter día Nifedipina Oxidada.....	68

Tabla 22. Reproducibilidad o variabilidad inter día Nifedipina.....	69
Tabla 23. Recobro Nifedipina Oxidada.....	69
Tabla 24. Recobro Nifedipina.....	70
Tabla 25. Límite de cuantificación Nifedipina Oxidada y Nifedipina.....	70
Tabla 26. Límite de detección Nifedipina Oxidada y Nifedipina.....	71
Tabla 27. Efecto de dilución Nifedipina Oxidada y Nifedipina.....	72
Tabla 28. Tolerancia a +2% de Acetonitrilo Nifedipina Oxidada.....	72
Tabla 29. Tolerancia a +2% de Acetonitrilo Nifedipina.....	73
Tabla 30. Tolerancia a -2% de Acetonitrilo Nifedipina Oxidada.....	73
Tabla 31. Tolerancia a -2% de Acetonitrilo Nifedipina.....	73
Tabla 32. Tolerancia a preparación de la Fase Móvil Nifedipina Oxidada.....	74
Tabla 33. Tolerancia a preparación directa de la Fase Móvil Nifedipina.....	74
Tabla 34. Estabilidad en solución para Nifedipina Oxidada almacenada en refrigeración.....	74
Tabla 35. Estabilidad en solución para Nifedipina almacenada en refrigeración.....	75
Tabla 36. Estabilidad a temperatura ambiente 2 horas Nifedipina Oxidada.....	75
Tabla 37. Estabilidad a temperatura ambiente 2 horas Nifedipina.....	76
Tabla 38. Estabilidad de muestras almacenadas en refrigeración por 24 horas para Nifedipina Oxidada.....	76
Tabla 39. Estabilidad de muestras almacenadas en refrigeración por 24 horas para Nifedipina.....	77
Tabla 40. Estabilidad de muestra procesada a 24 horas Nifedipina Oxidada.....	77
Tabla 41. Estabilidad de muestra procesada a 24 horas Nifedipina.....	78
Tabla 42. Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación Nifedipina Oxidada.....	78
Tabla 43. Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación Nifedipina.....	79
Tabla 44. Estabilidad a largo plazo a 62 días en congelación Nifedipina Oxidada.....	79
Tabla 45. Estabilidad a largo plazo a 62 días en congelación para Nifedipina.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva.
ACN	Acetonitrilo.
BR	Blanco de reactivos.
CA	Control Alto.
CB	Control Bajo.
CC	Curva de calibración.
CG	Cromatografía de gases.
CI	Aclaramiento o depuración.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
CM	Control Medio.
C_{max}	Concentración plasmática máxima del fármaco.
CV (%)	Coefficiente de variación expresado en porcentaje.
CYP	Citocromo 450.
DA (%)	Desviación absoluta expresada en porcentaje.
Da	Daltones.
DE	Desviación estándar.
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.
EMA	Agencia Europea de Medicamentos.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos.
FM	Fase Móvil.
h	Horas.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
Ka	Constante de absorción.
Ke	Constante de eliminación.

L	Litros.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
LI	Liberación inmediata.
log P	Coefficiente de reparto.
LP	Liberación prolongada.
MeOH	Metanol.
MP	Muestra procesada.
MS	Masas.
ng	Nanogramos.
NIF	Nifedipina.
nm	Nanómetros.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
NOX	Nifedipina oxidada.
PC	Puntos Control.
pH	Potencial de iones Hidrógeno.
ppm	Partes por millón.
rpm	Revoluciones por minuto.
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media de eliminación.
TA	Temperatura ambiente.
UP	Unión a proteínas.
UV	Ultravioleta.
Vd	Volumen de distribución.
μg	Microgramos.
μL	Microlitros.
μm	Micrómetros.

RESUMEN

La nifedipina (NIF) es el prototipo de la familia de fármacos pertenecientes a las 1-4-dihidropiridinas, se emplea en el tratamiento de angina de pecho, hipertensión arterial y síndrome de Reynaud, debido a su efecto vasodilatador. Se han descrito una gran cantidad de estudios farmacocinéticos de este fármaco, sin embargo, en la gran mayoría de ellos solo se determina la NIF. En esos estudios se ha visto que existen diferencias entre poblaciones en la farmacocinética, sin embargo, al no medirse el metabolito no es posible establecer si la diferencia entre poblaciones es debido a diferencias en el metabolismo, en este sentido es necesario contar con métodos específicos y selectivos que nos permitan conocer de manera exacta y precisa la concentración de NIF y su metabolito nifedipina oxidada (NOX).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico para cuantificar las concentraciones de NIF y NOX en plasma humano mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés); de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998.

Empleando una extracción líquido-líquido se obtuvo la NIF y NOX contenida en el plasma, con un recobro mayor al 80% para ambos. La separación se llevó a cabo empleando una columna Symmetry Waters C₁₈ (150 x 3.9 mm, DI 5 µm), en el cromatógrafo de líquidos Alliance modelo 2695 y detector UV de Waters, la longitud de onda de detección fue de 235 nm, la fase móvil estuvo constituida por agua/metanol/acetonitrilo (45:25:30), la velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min, la temperatura de columna de 30°C ± 5°C, el volumen de inyección de la muestra fue de 10 µL, la temperatura del automuestreador fue de 5°C ± 3°C, con una corrida de 7.0 min, el tiempo de retención de NIF y NOX fue de 5.4 – 5.7 min y 4.7 – 4.9 min respectivamente.

El método analítico validado es selectivo, lineal, exacto y preciso en un rango de concentraciones de 10 a 100 ng/mL y 30 a 800 ng/mL, con un límite de cuantificación de 10 ng/mL y 30 ng/mL y un límite de detección de 5 ng/mL y 15 ng/mL para NOX y NIF respectivamente. Es preciso y exacto con coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15 % en cada nivel de

concentración, es tolerante a cambios en la FM ($\pm 2\%$ de ACN). Los analitos son estables a 24 h en refrigeración en muestras sin procesar y procesadas ($2-4^{\circ}\text{C}$), a temperatura de $15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas y a tres ciclos de congelación-descongelación; mientras se mantengan protegidas de la luz.

El método analítico es confiable para la determinación de NIF y su metabolito NOX por lo cual puede ser utilizado en estudios de monitoreo clínico, bioequivalencia, biodisponibilidad y farmacocinética, o para los fines requeridos.

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 Conceptos Generales de Farmacocinética

En la vida diaria es común consumir fármacos en cualquiera de sus variadas presentaciones, cuando presentamos algún problema de salud, esperando que su acción sea rápida y eficaz, aunque para que esto ocurra es necesario que se lleven a cabo procesos como la liberación del principio activo contenido en la forma farmacéutica, la absorción de dicha sustancia hacia la circulación general y posteriormente distribuirse entre los líquidos corporales, proteínas, tejidos y órganos, en dónde actuará y finalmente el metabolismo de dicha sustancia para ser transformarla en otra (metabolito) la cual cambia sus características fisicoquímicas para así ser eliminada del cuerpo a través del hígado y riñones ya sea en la orina, heces o bilis.

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el cambio temporal de las concentraciones del fármaco y sus metabolitos en fluidos biológicos y tejidos, así como también la respuesta biológica, mediante la construcción de modelos adecuados para la interpretación de tales datos.¹ Los procesos mediante los cuales el fármaco va modificando su concentración a través del organismo se designan con el acrónimo LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación), llevándose a cabo estos procesos de manera dinámica y simultánea,² esquematizado en la Figura 1.

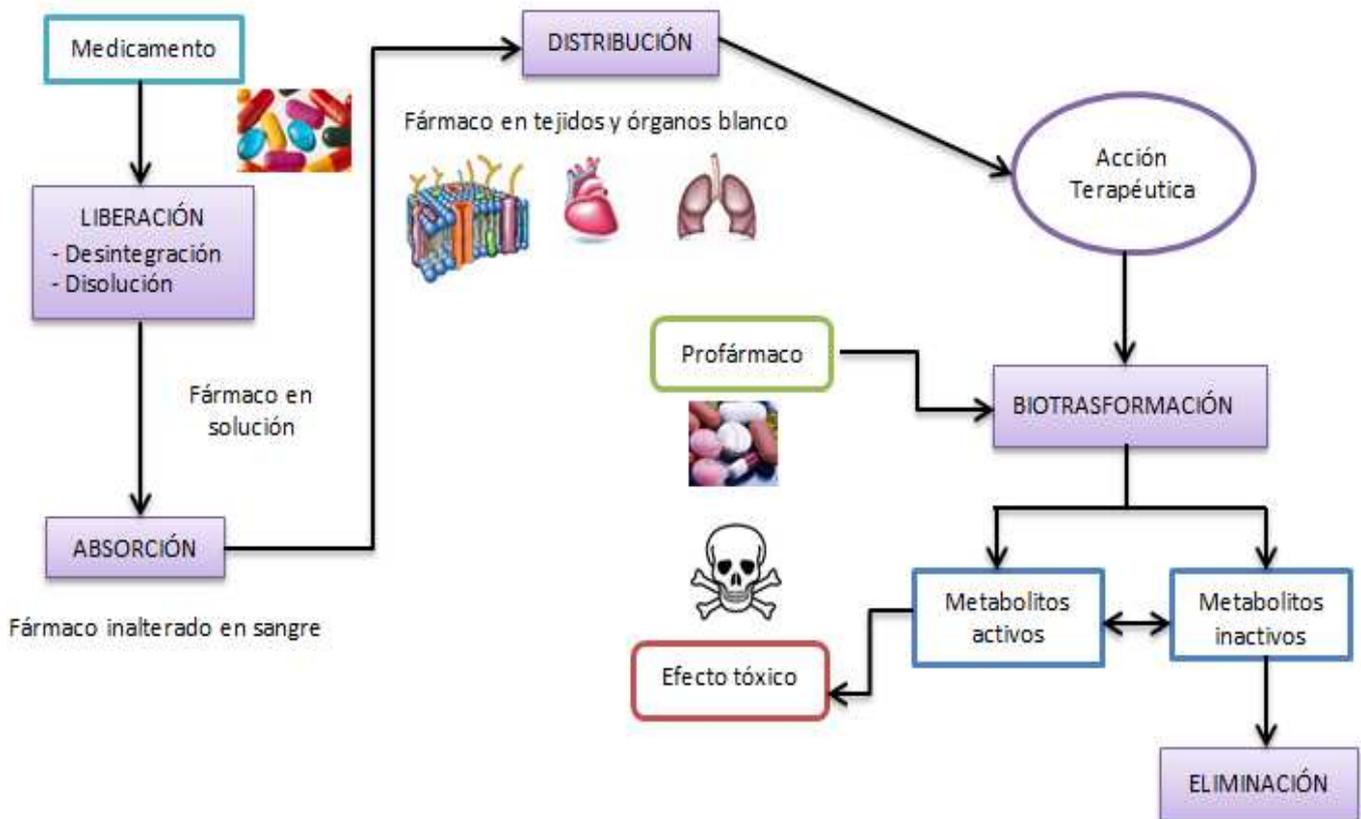


Figura 1. Esquema del proceso LADME

⌘ Liberación

Un medicamento tiene que liberarse de la matriz que lo contiene, es decir de la forma farmacéutica que facilita su administración. La liberación del fármaco depende de sus propiedades físicas y químicas, estado físico (sólido, semisólido o líquido), cristalización, solubilidad, estabilidad a temperaturas, pH u otras de importancia para las cuales se requiera conocer para llevar a cabo su formulación.

La formulación de cualquier forma farmacéutica no debe ser agresiva para el organismo, con buenas características reológicas, no presentar interacción con los fármacos y que vayan de acuerdo a la vía de administración que se requiere para tratar el padecimiento. Los cambios en la formulación de los fármacos así como en el tipo de forma farmacéutica tienen efecto en la velocidad de disolución,

absorción, metabolismo y excreción.³ Para considerar óptima la formulación de una vía de dosificación se debe cumplir con lo siguiente:

- El contenido del fármaco debe encontrarse en la cantidad adecuada.
- Que la liberación del fármaco de la matriz en donde se encuentra, se realice de manera óptima y con ello la respuesta terapéutica sea reproducible.
- La administración debe estar acorde con la vía y ser aceptable para el paciente.

Una vez liberado el fármaco, se disuelve en el organismo para continuar con el proceso de absorción, en el cual atraviesa las membranas celulares y llegar a la circulación lo que le permitirá transportarse hasta el sitio donde llevará a cabo su acción farmacológica.

⌘ **Absorción**

La absorción se define como el paso de un fármaco desde el sitio de administración hasta el torrente sanguíneo.⁴ La velocidad a la cual se absorbe un fármaco determina el comienzo de su acción.²

La absorción depende de:

- a) Forma farmacéutica y formulación que condiciona la velocidad a la cual un fármaco es liberado y disuelto, como se ejemplifica en la Figura 2B.
- b) Las características de la vía de administración (enteral y parenteral) que difieren en área de la superficie de contacto, el espesor de membrana, el pH, el flujo sanguíneo y los espacios intracelulares,⁵ como se ejemplifica en la Figura 2A.
- c) El metabolismo de primer paso ocasiona que la cantidad del fármaco administrada previa a su incursión al torrente sanguíneo no llegue al sitio de acción, reduciendo así su biodisponibilidad.
- d) Características fisicoquímicas del fármaco como el tamaño de la partícula, el carácter hidrofílico y lipofílico, el grado de ionización el cual depende de

las propiedades ácidas o alcalinas de la molécula y la concentración en el sitio de administración.⁵

- e) Factores fisiológicos como la edad en cuanto a niños y adultos mayores.
- f) Ingesta de comida que puede favorecer o no la absorción del fármaco.
- g) Factores patológicos.
- h) Interacciones entre fármacos.

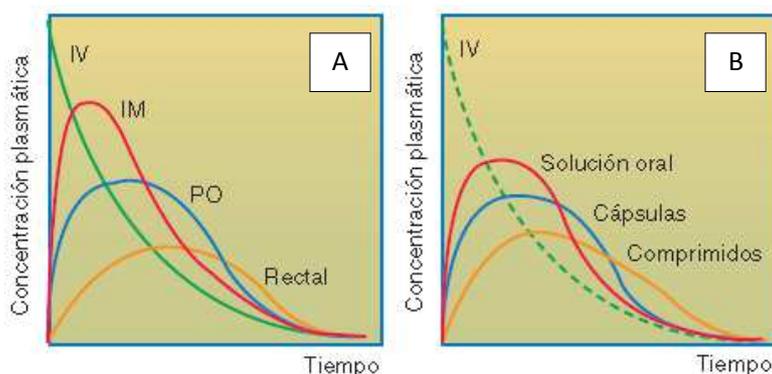


Figura 2. Influencia de la vía de administración (A) y la forma farmacéutica (B) en las concentraciones plasmáticas de un fármaco en determinado lapso de tiempo⁶

La cantidad de fármaco que queda libre e ingresa a la circulación sanguínea para distribuirse a los órganos después de su absorción se denomina biodisponibilidad, la cual a su vez también depende de que tan eficaz haya sido la liberación del principio activo contenido en la forma farmacéutica, la absorción y el metabolismo presistémico.⁵

La concentración plasmática máxima (C_{max}) se refiere a la mayor absorción alcanzada en la sangre, punto más alto representando en una curva concentración tiempo, la cual se correlaciona con las alcanzadas en el sitio de acción en un tiempo (T_{max}) y por lo tanto con la acción farmacológica. La cantidad que se absorbe de un fármaco se puede conocer al calcular el ABC en una gráfica de concentración sobre tiempo (Figura 3), dicho parámetro varía al cambiar de forma farmacéutica ya que se puede presentar con ello eliminación presistémica debida al metabolismo.

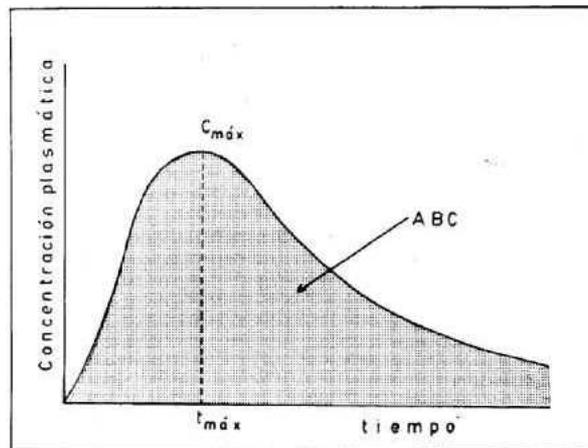


Figura 3. Parámetros farmacocinéticos.¹

⌘ Distribución

Se define como la llegada del fármaco al sitio de acción, dependiendo de las características propias de fármaco y del tejido u órgano al cual vaya dirigido.

Una vez que el fármaco ha sido absorbido y pasa a la circulación sanguínea, se dice que está libre para llegar al sitio blanco, pero no permanecerá así en su totalidad. Los fármacos se unen a proteínas plasmáticas en proporciones variables, de manera reversible y sigue la ley de acción de masas, por lo tanto la cantidad de fármaco unido depende de la concentración del fármaco libre, de la constante de asociación (K_1/K_2), el número de sitios de fijación libres por mol de proteína, la concentración de proteínas en el plasma y la especificidad.⁷

Los factores que modifican la distribución influyen en la C_{max} alcanzada por el fármaco en la dosis inicial, por lo cual debe de reajustarse, en el caso de dosis de mantenimiento no se aprecian alteraciones significativas.

Los factores que modifican la distribución son:

- Volumen real de distribución en el organismo: El cambio de peso (obesidad), edemas, derrames pleurales, insuficiencia cardiaca, acidosis, enfermedad renal, abscesos; afectan la distribución de fármacos hidrosolubles y liposolubles (ácidos y básicos).

- Unión a proteínas plasmáticas: Al estar el fármaco unido a proteínas no se puede distribuir formando así parte del equilibrio vascular-tisular, no se metaboliza, no se elimina, ni puede llegar a desencadenar una respuesta fisiológica y se puede ver afectada por la edad (recién nacidos y ancianos), enfermedades (hipoalbuminemia y hiperbilirrubinemia) e interacciones que tengan como efecto modificar la cantidad de proteínas normales en el organismo (albúmina y α_1 -glucoproteínas ácidas) o modificar su estructura en cuanto a los sitios de fijación.
- Factores que alteran la unión a los tejidos.

⌘ **Metabolismo o Biotransformación**

Una vez que el fármaco se encuentra en la circulación sanguínea puede pasar hacia el hígado (metabolismo del primer paso) y con ello iniciarse una serie de cambios en su estructura original dando paso a la formación de metabolitos ya sea activos o inactivos; a dicho proceso en el cual se modifican los fármacos por acción de diversas enzimas se le denomina biotransformación. Los fármacos son considerados sustancias ajenas o extrañas al cuerpo al igual que otras por lo cual de manera general se les denomina xenobióticos.⁶

El objetivo de la biotransformación de fármacos es facilitar la eliminación de éstos del cuerpo, incluso después de haberlos activado como es el caso de los profármacos, ya que en ambos casos se requiere que la molécula en cuestión abandone el cuerpo después de haber cumplido con su objetivo terapéutico. Dicho proceso se lleva a cabo en órganos como el hígado, riñón, pulmón, intestino y glándulas suprarrenales.⁷ Comprende dos fases (Figura 4):

- Fase 1: En la primera fase los cambios estructurales tienen como finalidad incrementar la polaridad de la molécula metabolizada alterando o creando nuevos grupos funcionales lo cual inactiva o reactiva el fármaco (profármacos) y en ciertos casos dicho metabolito activo puede ser tóxico; de los nuevos grupos funcionales expuestos, se generan metabolitos reactivos que contienen oxígeno el cual causa daño celular.

Reacciones de funcionalización

- Oxidación alifática (alcoholes, aldehídos, purinas)
- Hidroxilación aromática
- Desalquilación (N-, S- y O-)
- Epoxidación
- Desaminación oxidativa
- Formación de sulfóxidos y desulfuración
- N-oxidación y N-hidroxilación
- Reducción (azo y nitro)
- Hidrólisis (ésteres, amidas, enlaces peptídicos y epóxidos)

Como parte de las reacciones de fase 1 se encuentran las desempeñadas por enzimas no específicas englobadas como monoxigenasas de función mixta, localizadas principalmente en los microsomas hepáticos, a las cuales se les conoce como Citocromo (CYP). En dichas reacciones se requiere que el sustrato liposoluble se ponga en contacto con el CYP, siendo así reacciones lentas que requieren energía. Los CYP se localizan en varios órganos y tejidos y aunque realizan las mismas funciones varían en cuanto a la composición de aminoácidos, lo que ha llevado a que se agrupen en familias y subfamilias. El CYP 3A4 es la isoenzima más abundante constituyendo el 30% de la proteína hepática y el 70% de la intestinal, metabolizando así el 60% de los xenobióticos.⁸

- Fase 2: Las moléculas resultantes de la fase 1 continúan su proceso incorporando a ellas compuestos endógenos que faciliten su expulsión, asegurando así su inactivación, pero no totalmente ya que algunos metabolitos aún se pueden reactivar al formar nucleósidos y nucleótidos.⁶

Reacciones de conjugación

- Glucuronidación
- Acetilación
- Conjugación con glutatión y sulfato
- Metilación (N-, O- y S-)
- Transulfuración

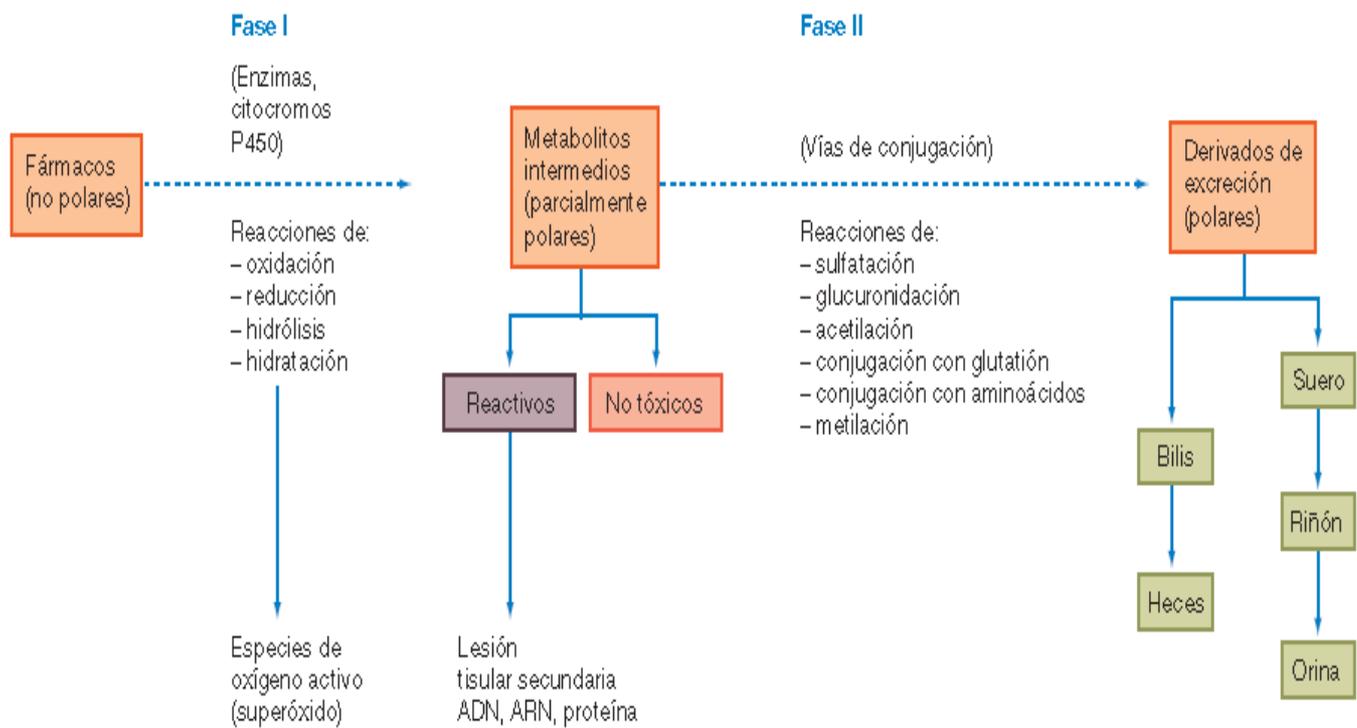


Figura 4. Fases del metabolismo de fármacos.⁶

La velocidad a la cual se metabolizan los fármacos ya sea de manera total o parcial, la variedad y concentración de los metabolitos generados depende de la genética de cada individuo, lo cual explica la variación en las concentraciones plasmáticas obtenidas de acuerdo con cada persona

Los factores que afectan el metabolismo son:

- Edad: Recién nacidos y ancianos tienen sistemas enzimáticos inmaduros o degenerados respectivamente, lo que ocasiona toxicidad.
- Variabilidad genética.
 - Acetilación: Rápida o lenta
 - Hidrólisis
 - Déficit enzimático: En glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y Glutación sintetasa
- Género.
- Estado patológico: Enfermedades hepáticas.
- Factores ambientales.
- Dieta: algunos alimentos pueden inhibir o inducir la actividad enzimática.
- Inducción e inhibición enzimática: Se presenta al generarse interacciones con otros fármacos o alimentos.

⌘ Eliminación

El último proceso que incluye la farmacocinética es la eliminación en la cual se remueve el fármaco inalterado y los metabolitos producto de la biotransformación fuera del organismo, que conlleva la disminución en la concentración plasmática.⁴

La principal vía de eliminación es la renal, en la cual se eliminan de primera instancia los metabolitos polares y posteriormente el fármaco inalterado liposoluble (Figura 5). El proceso más sencillo de eliminación es mediante la filtración en la cual los capilares renales que cuentan con numerosos poros intercelulares dan libre paso a moléculas de tamaño no mayor a 69 000 Da, es decir aquellas que no se encuentren unidas a proteínas plasmáticas, siendo así un proceso pasivo a favor del gradiente de concentración y la presión hidrostática entre la circulación y el contenido glomerular; para moléculas cargadas se puede o no requerir de transportadores iónicos al transcurrir de la arteriola aferente al túbulo renal, los cuales son sensibles a saturación y competición, por lo tanto de baja eficiencia. La reabsorción de agua en el túbulo proximal, el cambio en el pH de la orina y el

gradiente de concentraciones dependiente de la liposolubilidad incrementan las concentraciones del fármaco.^{5,7}

Otras vías de excreción son la biliar-entérica, constituida por el hígado y el intestino, en la primera se eliminan aquellas moléculas de gran tamaño sin importar su carga iónica, compuestos no ionizables y organometálicos, en cuanto a la segunda los fármacos pasan directamente de la sangre a la luz intestinal por difusión pasiva favorecida por el gradiente de concentración y las variaciones de pH. En ésta vía también existe la reabsorción debida a la circulación enterohepática, cuando el fármaco inalterado es eliminado a la luz intestinal a través de la bilis o por el epitelio intestinal pueden reabsorberse pasivamente en el intestino, proceso favorecido por el gradiente de concentración y la acción de los metabolitos al activar la flora intestinal, generando así que no disminuya las concentraciones plasmáticas y por lo tanto el efecto terapéutico. Se tienen otras vías de eliminación como: sudor, saliva, leche y epitelios descamados como la piel, uñas y cabello.^{4,5,6,7}

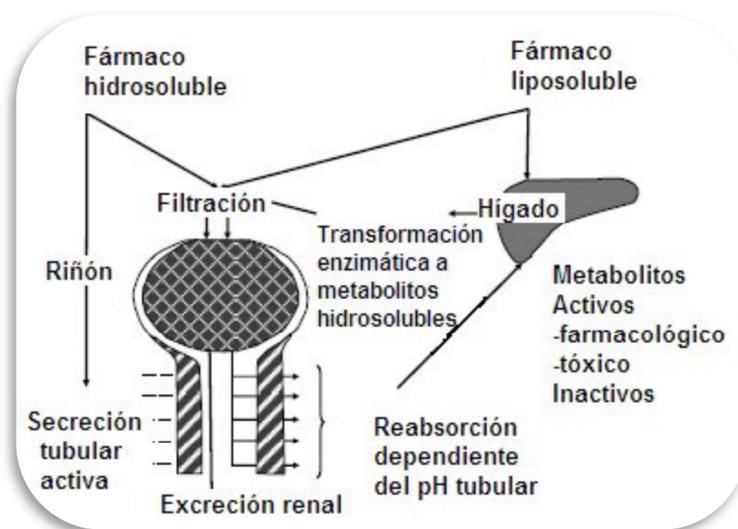


Figura 5 Esquema del proceso de eliminación de fármacos liposolubles e hidrosolubles en su paso por el riñón e hígado.⁴

La eliminación se ve afectada por:

- Características individuales: Como edad, género, genética, alimentación, consumo de otras sustancias de abuso, ejercicio y embarazo.
- Factores ambientales.
- Factores patológicos: Las enfermedades renales y hepáticas que reduzcan la depuración Cl de los fármacos y con ello el incremento en las concentraciones plasmáticas que lleguen a niveles tóxicos.
- Inducción e inhibición enzimática: Interacción entre fármacos.
- Competición en el transporte renal.
- Cambios en el pH urinario: Los cuales se pueden manipular mediante la alimentación ya sea para favorecer o limitar la eliminación de algún fármaco.

1.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

A la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) por sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography) la define la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) como un método físico de separación basado en las diferencias entre las velocidades de migración de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos en dos fases una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil, con el propósito de determinar cuantitativamente la cantidad de cada uno.⁹

La cromatografía se clasifica de acuerdo al tipo de fase móvil y estacionaria empleadas, como se esquematiza en la Figura 6.^{10,11} En cromatografía la muestra se disuelve en la fase móvil, moviéndose así a través de la fase estacionaria que se encuentra en una columna; las interacciones entre ambas fases que dan como resultado la separación son la adsorción y la distribución.¹⁰

El principio básico de la cromatografía es la partición de los analitos entre dos fases inmiscibles. Cuando los analitos tienen diferente relación de partición entre las dos fases, se pueden separar.

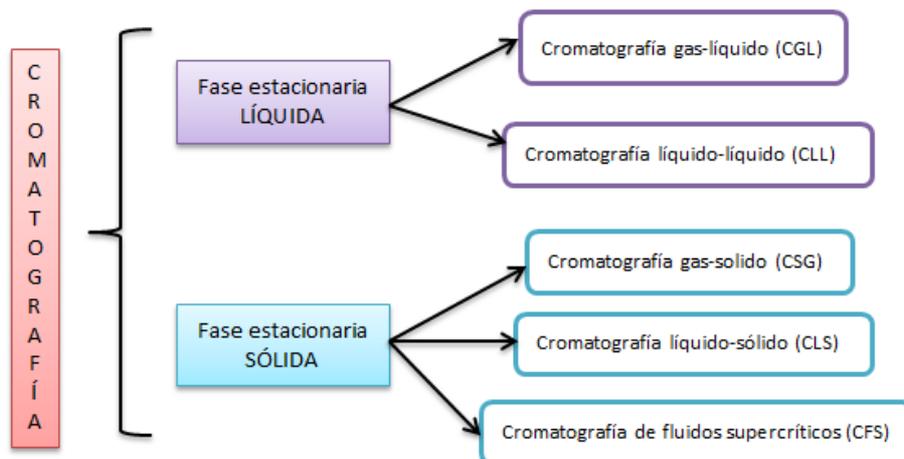


Figura 6. Clasificación de la cromatografía en base a su fase estacionaria y fase móvil.¹⁰

Los analitos son retenidos en la fase estacionaria por interacciones (polar o no polar) de éstos con los grupos activos de superficie, cuando la diferencia en la retención es suficientemente larga, los componentes eluyen por la columna a diferente velocidad y tiempo, separándose.

La diferencia de migración en los componentes individuales a través de la columna depende del equilibrio de distribución de éstos entre la fase móvil y la fase estacionaria, la cual se ve afectada por condiciones experimentales como: la composición de la fase móvil, de la fase estacionaria y la temperatura.

La velocidad a la cual cada componente migra a través de la columna es determinada por el número de moléculas que se encuentran en ese momento en la fase móvil.

El que determinado compuesto tenga una mayor afinidad por una fase estacionaria depende de las características de ésta, en cuanto a polaridad. De acuerdo con esta propiedad se ha dividido la cromatografía en dos sistemas: Fase normal y Fase reversa.¹¹ Las características que describen cada sistema se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la fase normal y fase reversa en cromatografía de líquidos.¹¹

Propiedades	Fase normal	Fase reversa
Polaridad de la fase estacionaria	Alta	Baja
Polaridad de la fase móvil	De baja a media	De media a alta
Orden de elución de las muestras	Las moléculas menos o no polares eluyen primero	Las moléculas más polares eluyen primero
Efecto producido al incrementar la polaridad de la fase móvil	Se reduce el tiempo de elución	Se incrementa el tiempo de elución
Fase estacionaria	Sólidos polares como la sílica gel, alúmina, silicato de magnesio y perlas de vidrio poroso. En la sílica las interacciones se deben a los grupos silanoles (-Si-OH).	Sólidos no polares como hidrocarburos, ceras líquidas o sílica unida a grupos no polares como los alquilo, fenilos aromáticos, ciano y amino. El más común es el octadecililano (ODS) que genera a (C ₁₈ y C ₈), Silica modificada con poliestireno-divinilbenceno pH 1-13
Fase móvil	Solventes no polares o de baja polaridad como hexano, cloruro de metileno, cloroformo, dietil éter y mezclas de éstos	Agua, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo y mezclas de ellos.
Interacciones	Polares - Fuerzas de dispersión - Dipolo-dipolo - Puentes de Hidrógeno - Iónicas	No polares - Van Der Waal's, - Iónicas

1.2.1 Instrumentación del Equipo HPLC

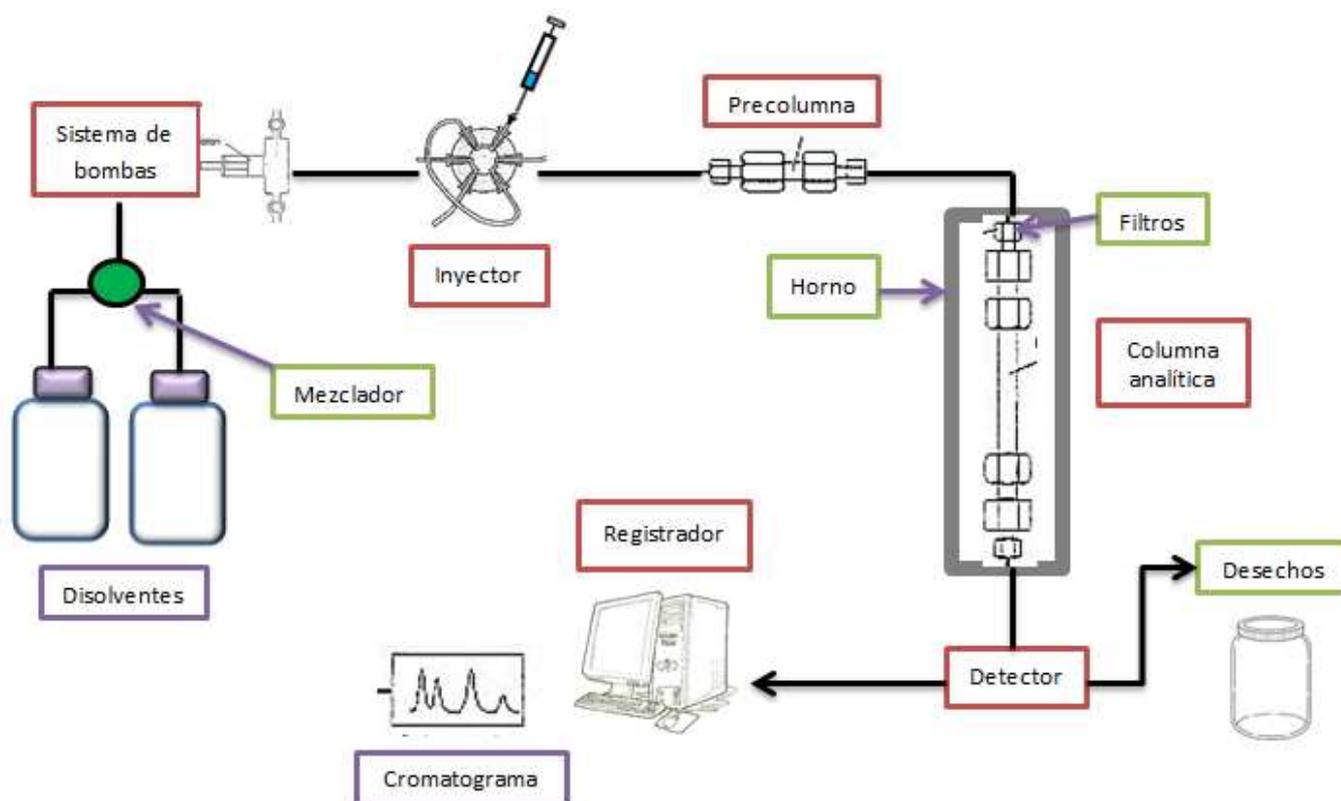


Figura 7. Representación esquemática del equipo de HPLC.

⌘ Reactivos

Los disolventes que se emplean en el proceso de cromatografía y por lo tanto se introducirán al equipo poseen un alto grado de pureza (>99.9%). Antes de iniciar el análisis de las muestras se requiere filtrar los disolventes a emplear para asegurarse de que partículas de 20 a 30 μm no bloqueen el sistema de bombas y con ello incrementen la presión en el sistema; así como desgacificarlos empleando hidrógeno o helio en un baño ultrasónico. Una vez que se cumple con las acciones anteriores se almacenan los disolventes en frascos de vidrio o acero inoxidable, los cuales no están presurizados.^{10,11} Los buffer se preparan con agua ultrapura y filtrarse posteriormente a través de una membrana de 0.45 μm .

⌘ Sistema de bombas

Se requiere un sistema basado en el movimiento de un pistón que proporcione presiones de 30-300 bar (3-30 MPa) en un rango de velocidades de flujo que van de 0.5 – 2.0 mL/min en algunas columnas, y en otra va de 0.01-10 mL/min, libres de pulsaciones, ya que éstas influyen un 0.5% en la reproducibilidad, tiempos de retención y altura de los picos obtenidos.¹⁰

Ubicado antes del sistema de bombas pero también dependiente de él se encuentra la unidad de mezclado que permite el cambio en la FM, la cual debe recorrer el sistema a una velocidad específica.¹²

- Velocidad de flujo: Es la velocidad a la cual la FM recorrerá el sistema cromatográfico, por lo cual debe estar regulada y programada a lo largo del proceso, en cada etapa de éste o en su totalidad. Se mide en mL/min.
- Cambio de las proporciones de los disolventes de la FM: Se lleva a cabo de dos maneras de acuerdo a las características del equipo:
 - Mezclado en una cámara: La mezcla de acuerdo a las proporciones programadas de cada uno y las bombas mandan ésta hacia la columna. No permite efectuar programaciones exponenciales.
 - Mezclado en corriente: Requiere de dos bombas de desplazamiento continuo, permitiendo así suministrar una cantidad determinada de cada disolvente, lo que hace posible generar cualquier gradiente.

⌘ Inyector y sistema del inyector

El objetivo del inyector es dosificar un determinado volumen de la muestra en solución dentro del flujo de la fase móvil, de manera homogénea, manteniendo presiones altas y constantes justo antes de entrar a la columna. Existen dos tipos de inyectores:

- Inyectores de volumen fijo: Tiene una alta precisión en cuanto al volumen inyectado, pero requiere para llenarse un volumen mayor al establecido, de igual manera se debe lavar varias veces con la FM antes de introducir otra

muestra, al momento de inyectar la muestra, se incrementa la presión en la columna.⁹

- Inyectores de volumen variable: El volumen que pueden suministrar va de 1 a 500 μL , para ello se cuenta con una jeringa dentro del inyector. El sistema empleado consiste en seis válvulas adjuntas al loop del inyector.¹⁰

⌘ Columnas y precolumnas

Exteriormente las columnas están fabricadas en acero inoxidable, en el interior un tubo de vidrio de paredes gruesas contiene el material de empaque.¹⁰ Una columna para HPLC mide de 15 – 25 cm empacada con partículas de 5 μm .

Las precolumnas se colocan antes de la columna para protegerla de partículas que puedan obstruirla, por lo cual constituye el último filtro antes de que sea analizada la muestra; para ello se empaqueta con el mismo material de una columna analítica pero con partículas de mayor tamaño (10 a 30 μm) y más porosas, son de bajo costo y por ello fácilmente reemplazables. Prolongan la vida de la columna analítica ya que su volumen muerto es pequeño, lo cual no afecta la eficiencia ni provoca el ensanchamiento de los picos.⁹

- Fase estacionaria – Empaque de columna

La sílica es el material comúnmente empleado para empaquetar las columnas analíticas, empleándose sola o modificada químicamente en la cromatografía por adsorción. La superficie de la sílica está cubierta por grupos silanoles (-Si-OH), los cuales se modifican químicamente cambiando así su forma, tamaño y porosidad al ser empleados tanto para cromatografía en fase normal como reversa; los grupos unidos a la sílica se muestran en la Tabla 2.

La sílica se puede contaminar con iones como Fe^{+3} , Al^{+3} , Ni^{+2} y Zn^{+2} provocando que los picos cambien de forma. Los pH altamente ácidos o alcalinos también provocan su deterioro, ya que el rango al cual es funcional va de un pH de 2 a 8, al superarlo la sílica es disuelta. Con el fin de tolerar un rango de pH más amplio (1 a 13) se han implementado materiales híbridos a base de polímeros de poliestileno-

divinilbenceno y metacrilato; con ello vienen desventajas como la disminución en la eficiencia de la columna y no ser capaz de soportar grandes presiones, por lo cual el cambio en los disolventes de la FM no es recomendable.¹⁰

Tabla 2. Grupos funcionales polares y no polares empleados en la fase estacionaria normal y reversa.¹⁰

Fases polares		Fases no polares	
Grupo funcional	Estructura	Grupo funcional	Estructura
Diol	$-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Octadecilo	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
Ciano	$-(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$	Octilo	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
Amino	$-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ n= a 3 o 4	Fenilo	$-(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$
Dimetilamino	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$		
Diamino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$		

➤ Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro y hacia afuera de los poros de la partícula; a medida que el tamaño de las partículas aumenta la difusión se hace más lenta, es decir la transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. Al disminuir el tamaño de las partículas, los poros de éstas también lo hacen lo que permite incrementar la velocidad de difusión y con ello mejorar la resolución.¹²

Se emplea un horno cuando se requiere una temperatura mayor a la ambiente que mejore la separación de los compuestos y en el caso del automuestreador temperaturas menores que permitan conservar las muestras debido a sus características.

Como características que debe tener una buena columna, elegida de acuerdo a las características del analito a analizar son:

Resolución (R): Medida cuantitativa que caracteriza la habilidad de la columna para separar dos analitos en sus correspondientes picos. Se asume que los picos son simétricos cuando $R=1$, ya que la superposición de ambos es menor al 2%.

Selectividad (α): Capacidad de la columna para discriminar entre dos picos, determinado por el espacio entre ellos. Se optimiza con el cambio en las FM. Cuantitativamente el valor de α va de 1.0 a 1.5, a valores menores el segundo componente se retrasa en salir.

Eficiencia: El ancho del pico expresa que tan eficientemente es transportado el analito a través de la columna. Entre más estrechos sean los picos en relación con su tiempo de retención, más efectiva es la columna. Cuantitativamente se relaciona con el número de platos teóricos (N); los cuales constituyen zonas a lo largo de la columna en donde se lleva a cabo la distribución del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil, entre mayor sea el número de ellos la columna será más eficiente.

⌘ Detectores

Es un dispositivo que mide de manera cuantitativa alguna característica de la solución o del analito generando una señal proporcional a su concentración y proporciona una lectura continua y lineal. En cuanto a CLAR los dos tipos principales de detectores son aquellos que:^{11,12}

- Permitan visualizar un cambio en base a la FM empleada por medio del índice de refracción o la conductividad, siendo así un método indirecto de observar un cambio en el analito estudiado. Son inestables a los cambios de temperatura, velocidad de flujo y cambio en proporciones de la FM, cuentan con una sensibilidad moderada que va de los mg a las ppm.
- Características del analito visualizadas mediante absorción UV, fluorescencia, difusión y electrodos. No se ven afectados por fluctuaciones en la temperatura y velocidad de flujo.

El detector ideal para un analito debe ser sensible, es decir ser capaz de detectar cantidades muy pequeñas aún con la interferencia que provoca la señal de los disolventes empleados, la propia muestras, fluctuaciones en la temperatura o burbujas de aire, a las que en conjunto se les denomina señal ruido. Otra característica es que la señal generada por el detector debe guardar una respuesta lineal con respecto a la concentración de la muestra analizada, siendo así cuantitativa.¹²

➤ Detectores de ópticos

El detector empleado en el 70% de los análisis realizados por CLAR es el de UV-VIS que tiene un rango de absorción que va de 190 a 800 nm. Se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al ser atravesada por un haz de luz monocromática, por lo cual es selectivo ya que solo reaccionaran a ella los compuestos cromóforos, aun así los disolventes empleados en la FM no deben presentar señal en la región de interés para el analito.¹⁰

El detector está conformado por una celda cilíndrica, la ventana por la cual incide la luz UV y la de salida hacia el detector. Una vez que la muestra ha corrido a través de la columna y por lo tanto se han separado los analitos, éstos son trasportados por la FM hacia la celda del detector, la cual se llena, momento en el cual incide sobre ella la luz proveniente de la lámpara y es absorbida por la muestra para después ir hacia la ventana del detector en donde se amplificara y se representara gráficamente mediante el cromatograma.¹⁰

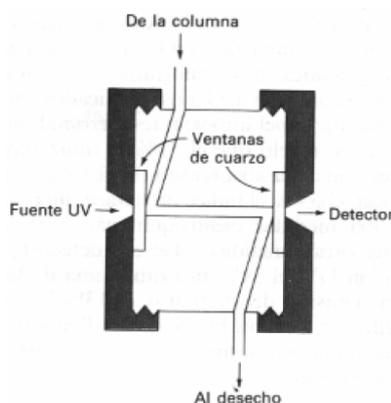


Figura 8. Celda del detector UV en HPLC. ¹⁰

⌘ Registrador

Una vez que el detector obtiene una señal que nos permite visualizar de manera cuantitativa el comportamiento de la muestra en cuanto a la cantidad que está presente, se requiere de un registrador, en este caso la computadora, que cuente con programas específicos que permitan obtener a partir de la señal anterior una interpretación gráfica del proceso cromatográfico.¹²

➤ Cromatograma

Un cromatograma es la representación gráfica de la separación, identificación y cuantificación de los analitos como resultado de un proceso de cromatografía en función del tiempo. En el cromatograma se presentan los siguientes datos (Figura 9):¹⁰

- Picos cromatográficos: Señales gráficas generadas a partir de los analitos separados por la columna.
- Tiempo de retención: Tiempo que transcurre después de la inyección de la muestras para que ésta alcance el detector. Es específico para cada analito mientras se lleve a cabo el proceso cromatográfico en determinadas condiciones experimentales.
- Respuesta: Ya sea altura o área del pico cromatográfico.

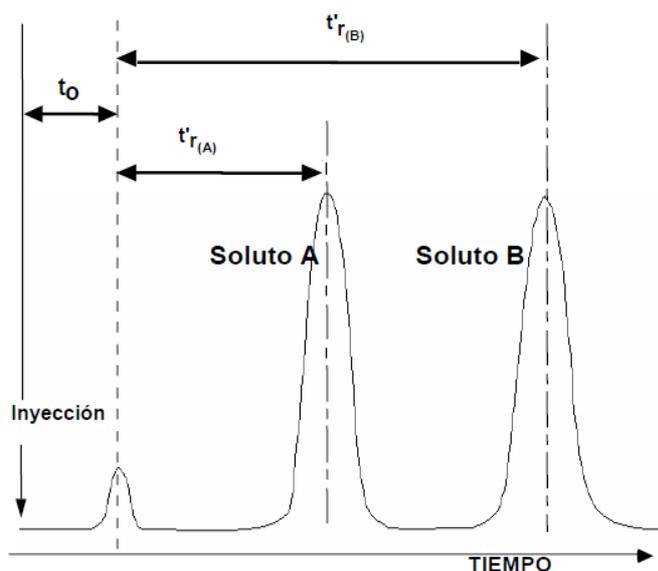


Figura 9. Cromatograma en el cual se representan dos compuestos el A y B con la señal obtenida del detector con respecto al tiempo, el tiempo muerto (t_0) y el tiempo de retención para cada compuesto (t_{rA} y t_{rB}).¹⁰

1.2.2 Aplicaciones de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La técnica de CLAR es de las más empleadas en diferentes áreas de la industria e investigación debido a su gran diversidad de aplicaciones. En la industria alimenticia se empleó por primera vez en 1960 para el análisis de refrescos y sustitutos de azúcar; posteriormente se incluyó el análisis de residuos de pesticidas en frutas y vegetales, así como el contenido de ácidos orgánicos, lípidos y aminoácidos en los alimentos. Se enlistan otras de las aplicaciones en la actualidad.^{12,13}

- Investigación universitaria en química y bioquímica: Análisis de muestras complejas, purificación de compuestos químicos, desarrollo de procesos para la síntesis de compuestos, aislamiento de productos naturales beneficiosos y predicción de propiedades físicas (peso molecular, distribución de polímeros).
- Control de calidad: Permite asegurar la pureza de la materia prima en el proceso, realizar pruebas que mejoren el rendimiento, analizar el producto terminado y evaluar la estabilidad del producto al monitorear la degradación.
- Control ambiental: Análisis de los contaminantes en aire, agua y suelo, monitoreando los pesticidas en el ambiente que conllevan un riesgo.
- Agencias reguladoras federales y estatales: Vigilancia de alimentos y medicamentos, identificación y confiscación de narcóticos y confirmación de lo indicado en las etiquetas del producto.

En cuando a la industria farmacéutica el HPLC con detector UV se emplea para:

- Proveer métodos exactos, precisos y robustos para la cuantificación de determinados fármacos y preparaciones.
- Monitoreo de la estabilidad de sustancias y fármacos y su descomposición.
- Determinación de metabolitos de fármacos en fluidos biológicos.
- Control de calidad de la materia prima, muestreo del producto terminado, estabilidades y todo el proceso que conlleva fabricar un medicamento.^{12,13}

En el área clínica se aplica en el análisis de los fármacos y medicamentos como:

- Estudios de bioequivalencia: Requiere de un método analítico a emplear en los estudios in vivo e in vitro disponible para cuantificar el fármaco, profármacos y metabolitos; el cual sea exacto, preciso, sensible y reproducible de acuerdo con las características del estudio a realizar. Es esencial el determinar de manera cuantitativa las concentraciones del fármaco presente en los fluidos biológicos (sangre, plasma, suero, orina).
- El monitoreo terapéutico emplea diferentes técnicas para la determinación de las concentraciones del o los fármacos administrados como parte de una terapia, entre ellas el HPLC-UV y HPLC-MS, ya que permiten detectar varios fármacos a bajo costo y corto tiempo de análisis, además de ser flexibles, sensibles, específicos y eficaces. Prácticamente cualquier tipo de fármaco puede ser analizado mediante CLAR (antiretrovirales¹⁴, metformina¹⁵, antiarritmicos¹⁶ como propranolol, dilticem, verapamilo, amiodarona¹⁷, antifúngicos como fluconazol, posaconazol, itraconazol, inmunosupresores^{18,19} en trasplantes, anticonvulsivos, antidepresivos, antibióticos, anticancerígenos²⁰, antiepilépticos²¹).

1.3 Validación de un Método Analítico en Fluidos Biológicos

La validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. El objetivo de validar un método analítico es demostrar la confiabilidad de éste para determinar la concentración de un analito en una matriz biológica específica.

Todos los métodos analíticos deben ser validados en el sitio donde se haya llevado a cabo el análisis correspondiente y para el propósito previsto.

La validación para la determinación de NIF y su metabolito NOX se realizó de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998²² 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; la cual es de carácter

obligatorio en nuestro país; basada a su vez en regulaciones internacionales como lo son la de Estados Unidos a través de la FDA²³ y la Europea a través de la EMA²⁵ y la ICH Q2²⁴.

1.3.1 Definiciones

A continuación se presentan algunas definiciones, esenciales para la comprensión de la parte experimental correspondiente a la validación del método analítico para la determinación de NIF y NOX, así como los criterios de aceptación establecidos en la normativa mexicana.

Una **corrida analítica** es el conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

El **rango o intervalo de trabajo** se define por las concentraciones del compuesto comprendidas entre el nivel superior y el inferior, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal. El cual debe establecerse antes de iniciar el análisis o estudio de acuerdo a las concentraciones alcanzadas cuando se administra el medicamento.

Se les denomina **muestras control (puntos control de calidad)** a aquellas muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la validación y corrida analítica para corroborar la validez del método analítico. Se denominan como el Control Bajo (CB), el cual es tres veces el valor de la concentración más baja del rango de trabajo, el Control Medio (CM) que corresponde aproximadamente al 50% de la concentración del rango que abarca la curva de calibración y el Control Alto (CA) que corresponde a un valor por debajo de la concentración más alta en el intervalo de trabajo aproximadamente entre el 75 y 80%.

La **curva de calibración** es el conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

La **selectividad del método** se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el o los compuestos a analizar, en presencia de otros

compuestos que pudieran estar presentes en la muestra biológica o propia de ella. La finalidad es demostrar que el analito de interés se puede identificar a pesar de la presencia de impurezas y que éstas no le afectan.

La **linealidad** es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

La **precisión** de un método analítico establece el grado de variación entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea, ya sea en el mismo día de análisis (repetibilidad) o en distintos días de análisis (reproducibilidad).

La **repetibilidad** expresa la precisión de un método analítico en un intervalo corto de tiempo en el cual se realizan determinaciones independientes y sucesivas de concentraciones conocidas, bajo las mismas condiciones experimentales dentro de un mismo laboratorio.

La **reproducibilidad** expresa la precisión de un método analítico cuando se llevan a cabo determinaciones independientes y sucesivas, en el mismo laboratorio, pero sometiéndose a la variación de factores como: los días de análisis, el cambio de analista, el cambio de equipo de trabajo, el cambio de columna cromatográfica.

La **exactitud** es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se denomina **límite de cuantificación** a la concentración más baja del analito, que puede ser identificada y cuantificada, en la matriz biológica, cumpliendo con los criterios de exactitud y precisión establecidos en el método analítico, considerándose así el primer punto que conforma la curva de calibración. De acuerdo a la FDA la señal propia de ésta concentración debe ser 10 veces mayor a la señal ruido y de acuerdo con la EMA, la señal debe ser 5 veces mayor a la que presenta el blanco.

Se denomina **límite de detección** a la concentración más baja del analito que pueda ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. De acuerdo con los parámetros que establece la FDA, el LD debe detectarse visualmente y ser 3 veces mayor que la señal ruido, para considerarse aceptable.

El **recobro (recuperación absoluta)** se define a través de la comparación entre la respuesta obtenida después de la extracción del analito presente en la matriz biológica y la respuesta del analito en la solución estándar. Demuestra la eficiencia de un método para cuantificar el analito de interés en la muestra biológica.

La **estabilidad** es la propiedad del analito por analizar, para conservar sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis. Se determinan las condiciones de temperatura y tiempo, entre otras, en las cuales el analito conserva sus propiedades en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. La muestra permanecerá almacenada en congelación, por lo cual se requiere evaluar la estabilidad después de descongelar la muestra en varias ocasiones, ya sea de la muestra como tal o la muestra procesada; así como a la temperatura a la cual se lleva a cabo su procesamiento y mientras se encuentra dentro del equipo (autoinyector o automuestreador) y la estabilidad de la muestra en solución.

En el **efecto de dilución** la dilución de una muestra biológica se considera cuando la respuesta obtenida sea mayor a la concentración máxima que establece la curva de calibración, en dicho caso, la muestra en cuestión se debe diluir con el mismo tipo de matriz biológica, sin que ello afecte su precisión y exactitud.

En el **efecto de acarreo** no debe presentarse acumulación entre muestras que son analizadas, ya que ello puede ocasionar interferencias que afecten su precisión y exactitud.

La **tolerancia** del método analítico se refiere a pequeñas variaciones deliberadas en ciertos parámetros (pH, proporción de los disolventes que componen la fase móvil, longitud de onda, velocidad de flujo, marca de la columna cromatográfica, temperatura en el horno de la columna, temperatura de las muestras, equipo) que

a pesar de ello permitan obtener resultados exactos y precisos, determinando así que el método es tolerante o no a esos cambios.

1.4 Nifedipina y Nifedipina Oxidada

1.4.1 Propiedades Fisicoquímicas

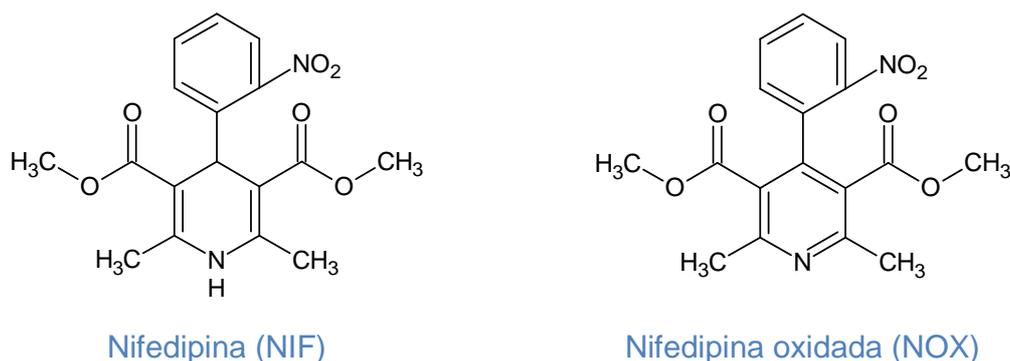


Figura 10. Estructura química de la Nifedipina (NIF) y su metabolito Nifedipina Oxidada (NOX).

La Nifedipina (NIF) tiene como nombre IUPAC 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo, siendo su fórmula molecular condensada $C_{17}H_{18}N_2O_6$, correspondiente con el peso molecular de 346.3346 g/mol (Figura 10). Es un polvo amarillo altamente sensible a la luz, con un log P de 2.20 por lo tanto un compuesto liposoluble con pka de 5.33, de carácter básico, insoluble en agua y soluble en acetona, cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo, metanol, etanol y DMSO. Su punto de fusión es 172 – 174 °C. Identificable mediante su número CAS 21829-25-4 y el código ATC C08CA05.^{26,27,28,29,30} La apariencia física de la NIF es sensible a los cambios de temperatura, teniéndola en un inicio como un polvo amorfo, conforme se incrementa la temperatura se van llevando a cabo transiciones, tanto exotérmicas como endotérmicas, para dar paso a diferentes estructuras polimórficas cristalinas (Forma I 122°C, forma II 163°C y forma III 135°C), con la finalidad de llegar hasta la más estable. El cambio en la forma de los cristales de NIF ocasiona cambios en propiedades físico-químicas como la solubilidad en agua, el punto de fusión, la sensibilidad a luz y temperatura, las cuales al momento de la formulación impactan

en la calidad del producto.^{31, 32, 33} La NIF es electroattractiva en pH de 2 a 12 y su oxidación disminuye al incrementar éste.³⁴

La vida media de la NIF depende del medio disolvente, (disolventes orgánicos o plasma), así como de la exposición a la luz o radiación (luz eléctrica o exposición solar). Al someterse a altas temperaturas, exposición a radiación y material de laboratorio que permite el paso de la luz la NIF no tiene una estabilidad mayor 3.6 h, pero si se almacena en temperaturas bajas, con material ámbar y bajo luz roja o en obscuridad incrementa hasta en 50.4 h.^{35,36}

La Nifedipina oxidada (NOX) es el metabolito de piridina resultado de la oxidación de NIF de manera metabólica llevada a cabo por el CYP3A4 o de manera física como resultado de la exposición a radiación UV o por el contacto con metales de altas temperaturas (Figura 11).^{35,36} Su nombre IUPAC es 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil) piridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo, con fórmula condensada $C_{17}H_{16}N_2O_6$ a la cual corresponde un peso molecular de 344.3187 g/mol (Figura 10); físicamente tiene la apariencia de un polvo color amarillo claro que funde a los 100 – 105 °C, ebulle a 443.7 °C y debe de mantenerse almacenado en temperaturas de 2 – 8 °C. Su densidad es de 1.284 g/cm³, log P de 1.904, por lo tanto un compuesto liposoluble, el cual es soluble en cloroformo e identificable mediante su número CAS 67-035-22-7.^{37,38} No presenta actividad como agente antihipertensivo.

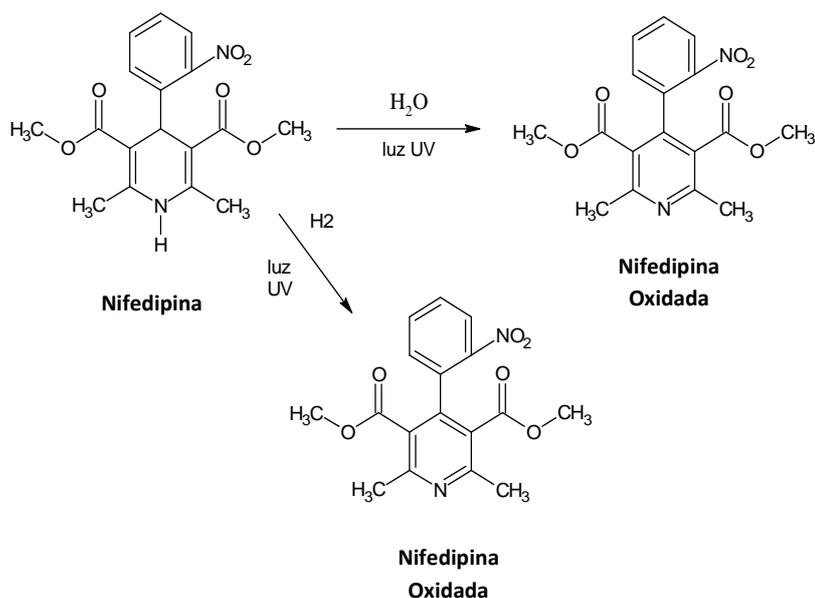


Figura 11. Oxidación de Nifedipina por acción de la luz UV y generación de Nifedipina Oxidada.³⁶

1.4.2 Farmacocinética

En administraciones orales la NIF se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal, principalmente en el yeyuno, en un 90%; siendo así su biodisponibilidad del 60 al 70 %, la cual depende de las diferencias gastrointestinales y la forma farmacéutica administrada.^{39,40} Se une a proteínas plasmáticas del 92 a 98 %. Tiene una vida media bifásica para las presentaciones de liberación inmediata, la primera de 90 a 120 min y la segunda de 5 horas, en presentaciones de liberación controlada la primera vida media va de 2.5 a 5 horas y la segunda de 6 a 12 horas.

Para una dosis de 10 mg de NIF administrada de manera única en tableta de liberación inmediata (LI) y en tabletas de liberación prolongada (LP), se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: volumen de distribución (V_d) 0.78 ± 0.22 L/Kg, (Cl) depuración 7.0 ± 1.8 mL/min/Kg, (t_{max}) tiempo máximo LI 0.5 ± 0.2 h, LP ~ 6 h y concentración plasmática máxima (C_{max}) en LI 79 ± 44 ng/mL y en LP 35 ± 49 ng/mL.¹⁹ En artículos que desarrollan estudios de farmacocinética y bioequivalencia la relación entre los parámetros farmacocinéticos mencionados anteriormente se mantiene sin mayores variaciones.^{39,40,41,18,42,43}

La NIF inicia su metabolismo en el intestino delgado 30 minutos después de su administración, posteriormente lo continúa extensivamente en el hígado mediante el CYP450, en específico por el CYP3A4 y las isoenzimas CYP1A2 y CYP2A6; hasta obtener metabolitos inactivos solubles en agua, los cuales corresponden al 60 - 80% de la dosis inicial administrada, eliminados así a través de la orina en un 80% y un 0.1% de la NIF inalterada; una pequeña porción se excreta en las heces (15%).⁴⁴

La NIF se metaboliza mediante una deshidrogenación oxidativa hacia dihidronifedipina (NOX), una nueva oxidación provoca la escisión del éster del ácido carboxílico dando así paso al metabolito de la piridina (M II), siguiendo con el metabolismo una hidroxilación dando paso al siguiente hidroximetil metabolito (M III). El metabolito de lactona se forma a partir de NOX por acción del pH y la temperatura (20 min a 95 °C a pH 5.0) debido a una oxidación en el grupo 2-metil con la subsecuente pérdida de agua (M IV). Del 5 al 10% de la dosis inicial de NIF se convierte en M IV in vivo.⁴⁵

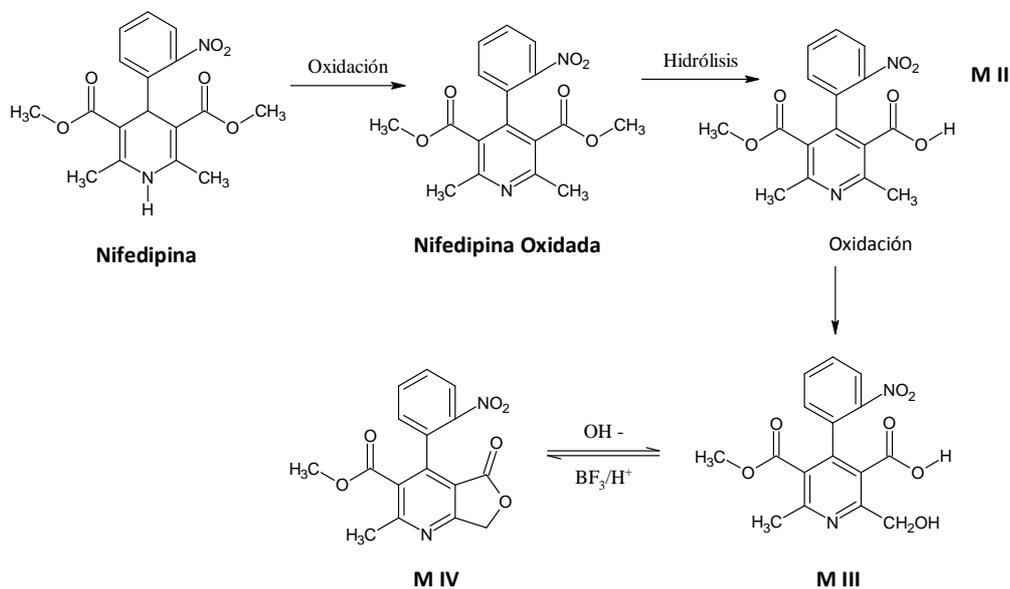


Figura 12. Esquema metabólico de la Nifedipina.³⁵

La NIF es el arquetipo de las dihidropiridinas bloqueadoras de canales de calcio, se emplea como base para investigar la actividad de CYP3A4 en humanos y animales, in vivo e in vitro.⁴⁵

1.4.3 Farmacodinamia

La NIF se une directamente y de manera específica a los canales inactivos de calcio tipo L (CaV1.1-CaV1.3), estabilizando esta conformación, evitando así la entrada del ión Ca^{+2} a las células cardiacas y de musculatura lisa vascular. Se altera la formación del complejo calcio-calmodulina, evitando así la estimulación de las cinasas de cadena ligera de miosina, bloqueándose la interacción entre la actina y miosina, dando como resultado la relajación vascular.⁶

La disminución intracelular de Ca^{+2} produce diversos efectos en el sistema cardiovascular como: disminución de la contractibilidad cardiaca, dilatación de las arterias y arteriolas coronarias, dilatación de los vasos periféricos; reduciendo así la resistencia vascular periférica total y la presión arterial, en consecuencia la poscarga, lo cual a su vez incrementa el reflejo de la actividad simpática cardiaca. El efecto final es una disminución en el consumo de oxígeno por parte del corazón.⁴⁶

1.4.4 Usos Terapéuticos y Dosis

Las concentraciones terapéuticas de la NIF en plasma van de 10^{-6} a 10^{-9} M, es decir de microgramos (μg) a nanogramos (ng)^{35,47}, en un intervalo más establecido van de 25 – 100 ng/mL.³⁶

La NIF es un vasodilatador periférico potente que no disminuye el automatismo del nódulo SA, produciendo así cierta taquicardia refleja. La actividad taquicardia refleja tiende a negar los efectos inotrópicos negativos.

Está aprobada para el tratamiento de:

- Hipertensión arterial
- Terapia cerebrovascular
- Espasmos de diversos orígenes

- Angina de pecho, vaso espástica y estable
- Crisis hipertensiva
- Migraña
- Síndrome de Renauds

Tabla 3. Compilación de la administración de Nifedipina en diversos padecimientos. ^{26, 27, 28}

Forma farmacéutica	Dosis	Administración	Padecimiento
Tabletas de liberación inmediata *	30 mg	Una tableta al día	Angina de pecho estable y crónica Hipertensión arterial sistémica
	60 mg	Una tableta al día	
Tabletas de liberación prolongada **	30 mg	Una tableta al día	Angina de pecho crónica estable (angina de esfuerzo) Angina vasoespástica
	30, 60 y 90 mg	Al día	Hipertensión
Cápsulas de gelatina blanda	10 mg	1 cápsula 3 veces al día	Antianginosos ***
		2 cápsulas x 3 veces a día	
		1 cápsula cada 8 h vía sublingual	Antihipertensivos
		1 cápsula 3 veces al día	
	2 cápsulas x 3 veces a día		
20 mg	2 cápsulas vía sublingual	Crisis hipertensivas	

* La dosis se podrá incrementar en forma escalonada hasta un total de 120 mg una vez al día, de acuerdo a la gravedad de la enfermedad y a la respuesta del paciente. ** El incremento en la dosis se puede realizar a lo largo de un lapso de 7 a 14 días, con dosis de 60 mg en una sola toma, hasta un máximo de 90 mg. *** Se administra con un intervalo no menor a 2 h entre cada toma, la cápsula se puede masticar.

1.4.5 Reacciones Adversas

La NIF es un potente vasodilatador que se emplea en un amplio intervalo de edades que va de adultos menores de 50 años hasta aquellos mayores de 80. Lo cual constituye un largo tiempo de exposición al fármaco en el cual se pueden presentar reacciones adversas a éste. Dentro de las reacciones adversas más comunes asociadas a la NIF se encuentran:^{45,48}

- Hipotensión
- Dolor de cabeza
- Edema periférico
- Salpullido en piel
- Mareos
- Irritabilidad

La administración de NIF no suele ser de manera única, por lo cual en el desarrollo de una terapia puede presentar interacción con los otros fármacos provocando así los siguientes cambios en su farmacocinética:

- Incremento de la C_{max} y el ABC: Otros bloqueadores de canales de calcio (Diltiacem).
- Incremento de efectos adversos: Los inhibidores de la ECA (Benacepril), los β -bloqueadores (Timolol) y antibióticos (Treprostnil) incrementan el efecto hipotensor de la NIF, antibióticos (Telitromicina) disminuye el aclaramiento de NIF.
- Incremento de la toxicidad: Motilidad gastrointestinal (Cisaprida) y Antineoplásicos (Imatrinib).
- Inducción del CYP3A4: Antivirales (Etravirina y Tipranavir), Antituberculosos (Rifampicina, Barbitúricos (Amobarbital), Carbamacepina, Barbitúricos (Tiopental) y Antidepresivos disminuyen las concentraciones de NIF.
- Inhibición del CYP3A4: Otros bloqueadores de canales de calcio (Verapamilo), antiseoretos (Cimetidina), antibióticos (Quinupristina/Dalfopristina), antivirales (Ritonavir), Parasimpaticomiméticos

(Tacrina), antifúngicos (Voriconazol y Ketoconazol) y hierba de San Juan, incrementan las concentraciones plasmáticas de NIF.

- Acción de la NIF sobre otro fármaco

En cuanto a los alimentos, se debe evitar concomitantemente con alcohol, ya que se ve incrementado el efecto hipotensor de la NIF⁴⁹ y otros tipos de licor; así como con la toronja en cualquiera de sus presentaciones (fruta entera, jugos, infusiones, cáscara) y la hierba de San Juan,⁵⁰ ya que éstas inhiben el CYP3A4, lo que incrementa las concentraciones séricas hasta un nivel tóxico. Se puede consumir con alimentos preferiblemente bajos en grasa, ya que no se ven afectadas las concentraciones plasmáticas terapéuticas requeridas.⁵¹

1.4.6 Toxicidad

Aunque el riesgo de muerte por una sobre dosis de NIF no es tan alto como el que presenta el verapamilo y diltiacem, se puede presentar, preferentemente en niños y ancianos, los cuales son más propensos a llegar a concentraciones tóxicas; en el caso de los adultos mayores debido al cambio que sufre la farmacocinética de la NIF y por lo tanto la disminución en su aclaramiento.^{48,52} En tabletas de LI se alcanzan concentraciones sistémicas elevadas debido a la rápida liberación de NIF, la cual satura el hígado ya que es más de lo que éste puede metabolizar.³⁹

Una sobre dosis depende de la edad y género del paciente, en niños (70 mg/kg), hombres (105-143 mg/kg) y mujeres de (6-31 mg/kg) diferentes dosis de NIF administradas vía oral puede desencadenar efectos tóxicos generando los siguientes síntomas:

- Pérdida de conciencia
- Arritmias cardíacas
- Acidosis metabólica
- Hipoxia
- Shock cardiogénico
- Edema pulmonar
- Disminución en la presión cardíaca

- Cardiomiopatía
- Infarto
- Hiperglicemia
- Psicosis
- Alucinaciones
- Nauseas
- Vomito
- Somnolencia

La liberación inmediata de la NIF de la forma farmacéutica que la contiene, en especial de tabletas, genera una rápida disminución en la presión sanguínea y por lo tanto hipotermia, la cual en este caso es de corta duración, para las de liberación retardada el efecto tiene un lapso más prolongado de tiempo; aun así estas presentan menos efectos adversos.³⁹

La NIF al ser muy sensible a descomposición (oxidación) por acción de la radiación o luz natural a partir de una transferencia electrónica intramolecular genera su metabolito inactivo NOX, el cual se ha demostrado es tóxico, al igual que el fármaco del cual provienen, en estudios in vivo para diferentes sistemas biológicos. Los reportes de reacciones adversas para la piel en cuanto a uso de NIF son escasos, aun así ocurren debido a la acumulación de éste y su metabolito, así como de otras 1-4-dihidropiridinas, en los tejidos debido a su carácter lipofílico, lo cual incrementa las reservas y por lo tanto la toxicidad. La generación de NOX se lleva a cabo por medio de la exposición a la radiación natural, aun así se está protegido gracias al plasma y células sanguíneas que actúan como un filtro limitando la oxidación de la NIF.^{53,54}

Las especies fotoinducidas de NIF provocan fototoxicidad al contacto con la piel provocando la presencia de vasculitis, edema eritematoso en piernas y eritromelalgia, se requiere una concentración mayor a la terapéutica para llegar a presentar dichos síntomas.⁵³

La NIF debido a su estructura molecular, en específica al NO₂ en posición orto en el anillo, se degrada rápidamente y previene la formación del oxígeno singulete, lo cual provee le estabilidad y un alto carácter antioxidante, protegiendo así el sistema biológico. Aunque la NIF no tiende a genera por sí misma el radical oxígeno, otras 1-4-dihidropiridinas almacenadas en los tejidos si lo generan, incrementando así las concentraciones de éste y desencadenando un daño al cuerpo.⁵⁵ Lo cual podría explicar la razón de porque con una menor dosis las mujeres presentan síntomas de toxicidad, todo ello debido a que presentan una mayor proporción de grasa corporal con respecto a los hombres.

1.5 Métodos Analíticos para la Extracción de NIF y NOX

Se han desarrollado varios métodos analíticos para determinar NOX y NIF principalmente mediante HPLC-MS, HPLC-UV, CG y otros sistemas de detección (Tabla 4) y de manera específica por UV (Tabla 5).

Son más los artículos en los cuales se cuantifica solamente la NIF, con diversos métodos de extracción y detección como MS^{42,59}, CG, voltamperometría^{34,60}, CG-MS^{61,62} y UV.^{36,63,64,65,66,67,68,69} En la siguiente tabla solo se exponen algunos en los cuales la cuantificación se realizó por UV.

Tabla 4. Compilación de los métodos analíticos reportados en la literatura para extraer y cuantificar Nifedipina Oxidada y Nifedipina en plasma.^{56,57,50,35,58}

Matriz biológica	Procesamiento de la muestra	Sistema de detección	Columna cromatográfica	Fase móvil	Condiciones cromatográficas		Rango de trabajo	Estándar interno
					Velocidad de flujo	Temperatura de columna		
1.20 mL de plasma	Extracción sólida empleando precolumna preempacadas con Superspher 100 RP-18 (4 µm) y cartuchos LiChrospher 100 RP-18 (5µm) de Merck.	Masas (MS)	LiChroCart (125 x 4 mm D.I) Precolumna LiChroCart (4 x 4 mm DI) Merck	Acetato de amonio al 50 Mm / Metanol 50:50 v/v	Velocidad de flujo	1 mL/min	0.5 a 100 ng/mL LC NIF 0.24 ng/ML NOX 0.26 ng/mL	Butil 4-aminobenzoato (Butamben) Aldrich
					Volumen de inyección	100 µL		
					Temperatura de columna	35 °C		
					Temperatura de muestras	18°C		
1.0 mL de plasma	Extracción líquido-líquido 1.0 mL de plasma + 0.5 mL de NaOH 1M + 150 ng de EI + 5 mL de diclorometano/pentano (3:7) v/v, se evapora a sequedad a una temperatura de 40°C.	UV λ 238 nm	MOS-Hipersil 100 mm, DI 2.8 mm OD 6.35mm (5 µm)	Buffer de acetatos (0.05 M pH 4.0) / Acetonitrilo o 7:5 v/v	Velocidad de flujo	1 mL/min	2 – 400 ng/mL LD NIF 2 ng/mL	Nitredipina (Bayer)
					Volumen de inyección	200 µL		
					Temperatura de columna	25 °C		
0.5 mL de plasma	Extracción líquido-líquido 0.5 mL de plasma + 20 µL de la SE de NIF + 20 µL de la SE de DNIF + 20 µL de EI, se mezcla en vortex y se agregan 2 mL de la mezcla éter/n-hexano (3:1) v/v. Se somete a evaporación a sequedad en atmósfera de N ₂ a 45 °C.	Masas (MS)	Hipersil BDS C ₁₈ 2.1 X 50 mm ID (5 µm)	Metanol/a gua (con 1%de ácido fórmico) 80:20 v/v	Velocidad de flujo	2 mL/min	0.5 – 100 ng/mL	Nitredipina
					Volumen de inyección	10 µL		
					Temperatura de columna	25 °C		
					Temperatura de muestras	4 °C		
0.5 mL de plasma	Extracción líquido-líquido 0.5 mL de plasma + 500 µL de EI + 200 µL de Buffer de TRIS (20 mM pH 9) + 1 mL de tolueno. se transfiere la fase orgánica (400 µL) a un vial.	Gases (CG) detector de captura de electrones Ni ⁶³	Columna capilar de 30 cm x 0.53 mm DI y (2.65 µm)	Nitrógeno	Velocidad de flujo	60 mL/min	NOX 0.5 – 100 ng/mL NIF 1.0 – 200 ng/mL	Nitredipina
					Volumen de inyección	1 µL		
					Temperatura de columna	300°C		
	La NIF se obtuvo de Merck y la NOX se sintetizó en el laboratorio.	UV λ 230 nm	C ₁₈ Novapack 150 x 3.9 mm DI, (4 µm) Precolumna C ₁₈ Novapack	Metanol/ Acetato de amonio (0.04M)/A cetonitrilo/ Trietilamin a 2:2:1:0.4 v/v pH 7.10	Velocidad de flujo	1.2 mL/min	0 – 1000 ng/mL	Imipramina
					Temperatura de columna	22 °C		
					Temperatura de muestras	4 °C		

Tabla 5. Compilación de los métodos analíticos reportados en la literatura para extraer Nifedipina y cuantificarla mediante detección UV.^{70,71,40,43,72}

Matriz biológica	Procesamiento de la muestra	Longitud de onda	Columna analítica	Fase móvil	Condiciones cromatográficas		Rango de trabajo	Estándar interno
					Velocidad de flujo	Temperatura de muestras		
1.0 mL de plasma	Extracción sólida empleando cartuchos "Bond-Elut" C ₁₈ N 607101	235 nm	Ultrasphere ODS Modelo 256-06 Altex-Berkeley CA 94710 15 x 4.6 mm DI, con tamaño de partícula de (5 µm).	Acetonitrilo/metanol/ Buffer de fosfatos (10 mmol/L pH 6.1) 25/20/55 v/v/v	Velocidad de flujo	1.5 mL/min	0.4 – 400 ng/mL LD 0.4 ng/mL	11-ketoproges terona
					Volumen de inyección	30 µL		
					Temperatura de columna	50 °C		
					Temperatura de muestras	4 °C		
1.0 mL de plasma	Extracción líquido-líquido 1 mL de plasma s + 30 µL de EI + 4 mL de diclorometano/hexano 70/30 v/v. La fase orgánica, se evapora a sequedad en atmósfera de N ₂ .	240 nm	Hypersil BDS-C ₁₈ 250 x 4.6 mm DI (5µm) Precolumna Hypersil BDS-C ₁₈ 10 x 4 mm DI (5µm)	Agua/metanol 45:55 v/v	Velocidad de flujo	1.0 mL/min	1.5 – 200 ng/mL LD 1.5 ng/mL	Carbamacepina (1 µg/mL) en metanol
					Volumen de inyección	50 µL		
					Temperatura de columna	25 °C		
					Temperatura de muestras	4 °C		
1.0 mL de plasma	Extracción líquido-líquido 1.0 mL de plasma + 100 µL de NaOH 1M + 5mL de dietileter, se agitó en vortéx, la fase orgánica se evaporó a sequedad en atmósfera de N ₂ .	240 nm	Supelcosil LC-18 15 cm x 4.6 mm DI. (5 µm) Precolumna del mismo material	Acetonitrilo/Metanol/ Agua 35:17:48 v/v/v, ajustado a un pH de 3.8 con ácido fosfórico.	Velocidad de flujo	1.2 mL/min	10 – 200 ng/mL LC 3 ng/mL	Diazepam (1 µg/mL) en metanol
					Volumen de inyección	80 µL		
					Temperatura de columna	25 °C		
					Temperatura de muestras	----		
1.0 mL de plasma	Extracción sólida empleando cartuchos Bond Elut ciano	238 nm	Partisil ODS-3 250 x 4.6 mm DI (5 µm) Precolumna 20 x 2 mm DI	Acetonitrilo/agua 60:40 v/v	Velocidad de flujo	1 mL/min	5 – 400 ng/mL LC 5 ng/mL	Nitredipina (300 ng/mL)
					Volumen de inyección	100 µL		
					Temperatura de columna	25 °C		
					Temperatura de muestras	18 °C		
500 µL de plasma	Extracción sólida empleando cartuchos de 10 mm x 2 mm DI	338 nm	Symmetry C ₁₈ 150 mm x 4 mm DI, (5 µm) precolumna de las mismas características WATERS	Acetonitrilo/ buffer de fosfatos (13 mM) pH 7 65:35 v/v	Velocidad de flujo	0.5 mL/min	2 – 200 ng/mL	Nitredipina
					Volumen de inyección	----		
					Temperatura de columna	----		
					Temperatura de muestras	----		

CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS

Lo correspondiente a la parte experimental comprende dos etapas, el desarrollo del método analítico, en el cual se buscaron las condiciones óptimas para la extracción y cuantificación de NOX y NIF y la validación del método en el cual se determina mediante varias pruebas que éste es seguro, exacto y preciso.

2.1 Material, Reactivos, Equipos e Instrumentos

Material

- Frascos de polipropileno con tapa de rosca con capacidad de 30 y 125 mL
- Matraces aforados de 10 mL, 25 mL y 100 mL
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Tubos de vidrio con tapa de rosca 13 x 100 mm
- Tubos de vidrio 13 x 100 mm
- Combitips de 1=50 µL, 1=100 µL, 1=0.5 mL y 1=1 mL
- Viales de alto recobro con tapa
- Gradillas
- Espátula
- Frascos de vidrio KIMAX® de 50mL, 500 mL, 200 mL y 1000 mL
- Puntas de plástico para Micropipetas
- Agitador magnético
- Membranas de filtración Nylon de 0.45 µm marca Waters

Equipos e instrumentos

- Micropipetas marcas Eppendorf y BIOHIT de capacidad 2-20 µL, 20-200 µL y 100 –1000 µL
- Micropipeta repetidora marca Eppendorf
- Balanza analítica marca SCIENTECH ® SA 80
- Congelador marca TORREY

- Centrífuga refrigerada marca Thermo Electronic Corporation, modelo Sorvall LEGEND MACH 1.6R
- Ultra congelador REVCO (Kendro Laboratory Products Ashecille NC USA)
- Evaporador de solventes marca CALIPER con corriente de N₂ grado medicinal
- Agitador Vórtex Genie-2 (Scientific Industries)
- Equipo de filtración
- Bomba de vacío
- Campana de extracción
- Equipo para la obtención de agua desionizada: equipo Mili Q (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo Alliance 2695 marca Waters
Detector UV-VIS modelo 2487 marca Waters
- Software Empower – Pro Build 1154 Waters

Reactivos

- Agua desionizada
Obtenida del equipo Mili Q (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acetonitrilo
Cloruro de metilo CH₃CN
Grado HPLC (J.T. Backer, E.U.A)
- Metanol
Alcohol metílico CH₃OH
Grado HPLC (MERCK, Darmstadt, Alemania)
- Metil terbutil éter
2-metoxi-2-metilpropano (CH₃)₃OCH₃
Grado HPLC (J.T. Backer, E.U.A)
- Cloruro de sodio- cristal (NaCl)
J.T. Backer E.U.A
Pureza 99.7%

- Hidróxido de sodio – Perlas (NaOH)
Bajo en carbonatos – Pureza 98.2%
J.T. Backer E.U.A

Sustancias de referencia

- Nifedipina
Proporcionada por Sigma Aldrich
Pureza > 98%
- Nifedipina oxidada
Proporcionada por Sigma Aldrich
Pureza ~ 95%

2.2 Preparación de Soluciones

➤ *Fase móvil*

La fase móvil estuvo constituida de agua desionizada, metanol grado y acetonitrilo grado cromatográfico, los cuales previamente se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm y se desgasificaron. La mezcla fue realizada por el equipo en proporciones de 45:25:30 v/v/v respectivamente.

➤ *Solución de dilución*

Estuvo constituida por una mezcla de agua desionizada y metanol grado cromatográfico (50:50) v/v. Se preparó en un frasco de vidrio (de 100 mL), mezclando 50 mL de agua desionizada y 50 mL de metanol, posteriormente se agitó vigorosamente, se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se desgasificó empleando el sonicador durante 5 minutos. Esta solución se empleó para aforar las soluciones estándar de ambos analitos, como blanco de reactivo, en el blanco de plasma y como solución para reconstituir.

➤ *Solución de NaOH 1M*

Se pesaron 2.036 g de hidróxido de sodio en perlas (NaOH), se transfirieron a un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvió con aproximadamente 10 mL de agua desionizada mediante agitación continua en una parrilla, se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, se llevó al aforo, se agitó vigorosamente y se almacenó en un frasco de vidrio con tapa.

➤ *Solución saturada de NaCl*

Se colocaron en un vaso de precipitados 100 mL de agua desionizada, manteniendo agitación constante por medio de la parrilla, se agregó poco a poco el cloruro de sodio cristal (NaCl) con la espátula hasta que éste no se disolvió, posteriormente se transfirió a un frasco de polipropileno y se almacenó.

➤ *Solución estándar (A) de Nifedipina*

Se pesó el equivalente a 10 mg de NIF, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL ámbar, y se disolvió con metanol grado cromatográfico, posteriormente se aforó, se agitó vigorosamente y se transfirió a un frasco de polipropileno (125 mL), el cual se almacenó en refrigeración de 2 – 4°C, protegido de la luz. La concentración final fue de 100 µg/mL NIF.

➤ *Solución estándar (B) de Nifedipina*

La solución se preparó tomando una alícuota de 500 µL de la solución estándar A de NIF (100 µg/mL) empleando para ello una micropipeta, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL ámbar, se llevó al volumen de aforo con la solución de dilución, se agitó vigorosamente y finalmente se transfirió en su totalidad a un frasco de polipropileno (30 mL), el cual se almacenó en refrigeración 2 – 4°C protegido de la luz. La concentración final fue de 5 µg/mL NIF.

➤ *Solución estándar (I) de Nifedipina Oxidada*

Se pesó la cantidad contenida en el vial (2.2 mg), la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió con metanol grado cromatográfico; se llevó al

aforo, se agitó vigorosamente y se transfirió en su totalidad a un frasco de polipropileno (125 mL), el cual se almacenó en congelación a $(-20 \pm 5^\circ\text{C})$ protegido de la luz. La concentración final fue de 41.8 $\mu\text{g/mL}$ NOX.

➤ Solución estándar (II) de Nifedipina Oxidada

La solución se preparó tomando una alícuota de 2 990 μL de la solución estándar I de NOX (41.8 $\mu\text{g/mL}$) empleando para ello una micropipeta, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL ámbar, se llevó al volumen de aforo con la solución de dilución, se agitó vigorosamente y se transfirió en su totalidad a un frasco de polipropileno (30 mL), el cual se almacenó en refrigeración de 2 – 4°C, protegido de la luz. La concentración final fue de 5 $\mu\text{g/mL}$ NOX.

2.3 Desarrollo del Método Analítico

Se realizó una revisión bibliográfica a partir de la cual se seleccionaron métodos similares para determinar ambos analitos, así como sus características fisicoquímicas (solubilidad, pKa, estructura química, etc.) y farmacocinéticas (C_{max} , t_{max} , ABC, $t_{1/2}$,) que pudieran ser de utilidad en el establecimiento de las condiciones cromatográficas y de extracción adecuadas para conformar el método analítico.

Se inició el desarrollo del método para cuantificar NOX y NIF empleando columnas C_{18} y como FM una mezcla de agua/metanol/acetonitrilo en diversas proporciones, hasta lograr separar los picos correspondientes a los analitos de estudio. Para lograr la detección en UV se probaron dos longitudes de onda (235 y 270 nm) de las cuales se tenía referencia previa en la literatura, se eligió aquella en la cual la señal registrada fue de mayor intensidad. Para determinar el volumen de inyección, la temperatura de la columna y la velocidad de flujo se realizaron múltiples pruebas hasta obtener aquellos parámetros que permitieran obtener la mejor señal de los picos cromatográficos de los analitos.

Una vez que las condiciones cromatográficas quedaron definidas se prosiguió a optimizar el proceso de extracción, el cual se inició en base a lo propuesto por la

literatura (Tabla 4 y 5). Tomando en consideración los reactivos con los cuales se contaba y el método propio de extracción se tomó como base el siguiente proceso esquematizado, al cual posteriormente se le realizaron modificaciones para obtener el mayor recobro posible. El procesamiento de la NIF y NOX se debe llevar a cabo en todo momento bajo luz roja y a una temperatura de $15 \pm 5^{\circ}\text{C}$, para evitar que los analitos se degraden.

2.4 Parámetros de Validación del Método Analítico

⌘ Selectividad

La selectividad del método se evaluó por medio del “pool” de plasma, el cual mediante un análisis previo no se observaron picos que interfirieran con la elución de los analitos.

El método debe ser capaz de discriminar entre los analitos de estudio y otras interferencias propias de la matriz biológica, por ello se evaluaron en muestras blancos por duplicado plasma hemolizado, plasma lipémico y plasma con heparina (anticoagulante contenido en los tubos de muestreo).

De igual manera para descartar la existencia de interferencias entre los analitos de estudio y fármacos de uso común, se evaluó la influencia de la cafeína, ibuprofeno y acetaminofén; para ello se prepararon soluciones estándar de 1 mg/mL de cada uno. Basándose en la C_{max} de cafeína 20 $\mu\text{g/mL}$, acetaminofén 20 $\mu\text{g/mL}$ e Ibuprofeno 60 $\mu\text{g/mL}$; se realizaron muestras por duplicado en las cuales el plasma libre de fármaco se cargó con cada solución estándar.

En el caso de las muestras lipémicas y hemolizadas cargadas, no deben presentarse interferencias con los tiempos de retención de los picos correspondientes a los analitos de estudio y la respuesta de éstos no debe presentar variación mayor al 15% en comparación con las muestras cargadas en plasma normal

- Criterios de aceptación: En caso de que se presente una señal en la mezcla de los plasmas que conforman el blanco, ésta no debe exceder el 20% con

respecto a la respuesta que presente la concentración más baja del o los analitos de estudio.

⌘ **Linealidad**

La curva de calibración para cada analito se estableció en base a la concentración plasmática de la Nifedipina y su metabolito NOX, en un rango de concentraciones que va de 30 a 800 ng/mL para NIF y de 10 a 100 ng/mL para NOX.

➤ Linealidad de Sistema

Para evaluar la linealidad en sistema se corrieron 6 curvas de calibración en solución, preparadas de acuerdo a las concentraciones establecidas en las tablas 9 y 10; en el vial se colocaron 50 µL de la solución estándar de NIF, 50 µL de la solución estándar de NOX y 25 µL de la solución de dilución. Se inyectaron por sextuplicado 10 µL al cromatógrafo.

* Criterios de aceptación: Una vez elegida la ecuación lineal (ponderación) que describa de mejor manera la relación entre la respuesta proporcionada por el equipo y la concentración del analito de estudio, el coeficiente de regresión debe ser mayor o igual al 0.99, el error relativo a la regresión no mayor al 2%, y el coeficiente de variación para la regresión debe ser menor o igual al 3%.

➤ Linealidad de Método

Para evaluar la linealidad se procesaron e inyectaron 6 series independientes de curvas de calibración en plasma, en el rango de concentraciones establecido en la Tabla 10 para NIF (30 – 800 ng/mL) y NOX (10-100 ng/mL).

* Criterios de aceptación: Una vez elegida la ecuación lineal (ponderación) que describa de mejor manera la relación entre la respuesta proporcionada por el equipo y la concentración del analito de estudio, el coeficiente de regresión debe ser mayor o igual al 0.99 y la diferencia entre los valores de la concentración recuperada y el valor nominal en términos porcentuales, no debe exceder al 15%

para cada nivel de concentración, a excepción del LC en el cual no debe de ser mayor al 20%.

⌘ **Precisión**

La precisión del método analítico se evaluó mediante los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad.

➤ Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad se procesó y corrió una curva de calibración en método y el sextuplicado de los puntos control en sus tres niveles de concentración para NIF y NOX (Tabla 10). Se cuantificaron los controles el mismo día y de los resultados obtenidos se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada nivel de concentración recuperada.

* Criterios de aceptación: El coeficiente de variación no debe exceder del 15% para cada uno de los niveles de concentración evaluados.

➤ Reproducibilidad

La reproducibilidad se evalúa mediante el análisis de una curva de calibración y el duplicado de los puntos control en plasma para NIF y NOX (Tabla 10), realizado en tres días consecutivos. Del duplicado de controles, en los tres niveles de concentración, realizado en los tres días de análisis se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en cuanto a la cantidad recuperada con respecto al valor nominal.

* Criterios de aceptación: El valor del coeficiente de variación no debe exceder el 15% en cada uno de los niveles de concentración evaluados.

⌘ **Exactitud**

Para determinar si el método es exacto se obtuvo el valor promedio de las determinaciones de cada nivel de concentración que comprenden los puntos

control, de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad realizadas anteriormente.

* Criterios de aceptación: El valor promedio de la desviación relativa de las determinaciones realizadas se debe encontrar entre el $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal en cada nivel de concentración.

⌘ **Recobro**

El porcentaje de recobro se define a partir de la comparación entre la respuesta que se obtiene del análisis de los puntos control en sus tres niveles de concentración en Sistema, inyectados por sextuplicado y el sextuplicado de los puntos control en Método, preparados, procesados y analizados el mismo día para NIF y NOX (solución vs extracción).

* Criterio de aceptación: El recobro no es necesario que sea del 100% pero si debe de ser constante, preciso y reproducible en los niveles de concentración para cada analito.

⌘ **Límite de cuantificación**

El LC que constituye el primer punto de la curva de calibración para NOX (10 ng/mL) y NIF (30 ng/mL), se procesó e inyectó de manera independiente por sextuplicado.

* Criterios de aceptación: El valor promedio de las determinaciones realizadas se encuentra dentro del $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal. La señal propia del LC, debe ser 10 veces mayor a la que presente el ruido.

⌘ **Límite de detección**

Para el LD se prepararon soluciones estándar tanto para NIF como para NOX de acuerdo con la tabla siguiente, en la cual se detalla la alícuota que se requirió, así como la concentración de la solución y la concentración final en el plasma. Se procesaron y analizaron por quintuplicado.

Tabla 6. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina Oxidada y Nifedipina para el Límite de Detección

Analito	Alícuota de la SE de NOX [5 µg/mL] (µL)	Alícuota de la SE de NIF [5 µg/mL] (µL)	Concentración de la SE de NOX (ng/mL)	Concentración de la SE de NIF (ng/mL)	Alícuota de NOX y NIF (µL)	Concentración de NOX en 500 µL de plasma (ng/mL)	Concentración de NIF en 500 µL de plasma (ng/mL)
NOX	100	-----	50	-----	50	5	-----
NIF	-----	300	-----	150	50	-----	15

* Criterio de aceptación: La señal debe ser detectable y 3 veces mayor con respecto a la que presente el ruido.

⌘ Efecto de dilución

Se procesó y corrió por triplicado muestras con una concentración mayor (NOX 150 ng/mL y NIF 1000 ng/mL) al punto más alto de la curva de calibración (NOX 100 ng/mL y NIF 800 ng/mL), con la finalidad de cuantificarlas de manera reproducible y repetible. Para ello se colocó en un tubo de vidrio con tapa de rosca 60 µL de la solución II de NOX (5 µg/mL) y 20 µL de la solución A de NIF (100 µg/mL), posteriormente se adicionó 1920 µL de plasma libre de fármaco, para completar un volumen total de 2 mL; se agitó durante 15 s en el vortex.

Se dosificó en cada uno de los tres tubos con tapa de rosca 250 µL de plasma cargado y se adicionaron 250 µL de plasma libre de fármaco para un volumen de 500 µL totales.

* Criterios de aceptación: El coeficiente de variación obtenido de las tres inyecciones no debe ser mayor al 15% de desviación con respecto al valor original.

⌘ Tolerancia

- Cambio en las proporciones de los componentes en la FM ($\pm 2\%$ de ACN)

Se procesó una curva de calibración y el triplicado de puntos control, en los tres niveles de concentración. Las muestras se inyectaron de acuerdo con las

condiciones normales de trabajo (Tabla 7), posteriormente las mismas muestras se reinyectaron realizando los cambios en la proporción de ACN que conforma la FM ($\pm 2\%$) de éste. Finalmente se cuantificaron y se comparó la respuesta obtenida de las muestras sometidas al cambio de FM y las muestras en condiciones normales.

* Criterios de aceptación: Las respuestas obtenidas al realizar cada uno de los cambios, en promedio no deben sobrepasar el 15% de desviación con respecto al valor original, es decir el obtenido sin que se hayan realizado cambios en la FM.

➤ Preparación de la Fase Móvil

Se preparó de manera directa la FM, mezclando en un frasco de vidrio 450 mL de agua desionizada, 200 mL de metanol grado cromatográfico y 300 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, se agitó vigorosamente la mezcla y finalmente se filtró al vacío a través de una membrana de 0.45 μm .

Se procesó una curva de calibración y el triplicado de los puntos control, en sus tres niveles de concentración. Las muestras se inyectaron en condiciones normales de trabajo (Tabla 7), es decir con la FM suministrada por el cromatógrafo; posteriormente las mismas muestras se reinyectaron realizando la corrida con la FM preparada de manera directa en el frasco de vidrio.

* Criterios de aceptación: Las respuestas obtenidas al realizar cada uno de los cambios, en promedio no deben sobrepasar el 15% de desviación con respecto al valor original, es decir el obtenido sin que se hayan realizado los cambios.

⌘ **Estabilidad**

Se determinan las condiciones de temperatura y tiempo a las cuales NIF y NOX conservan de manera inalterada sus propiedades en la matriz biológica.

➤ Estabilidad en solución

A partir de las Soluciones estándar de los analitos (Tabla 10), almacenadas en refrigeración de 2 – 8°C y protegidas de la luz directa durante 32 días para NOX y

69 días para NIF se preparó el triplicado de puntos control en los niveles de concentración que éstos comprenden; de los cuales posteriormente se comparó la respuesta (altura) obtenida contra el triplicado de puntos control preparados el día del análisis.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

➤ Estabilidad a temperatura ambiente a 2 horas

Se preparó por triplicado los puntos control en sus tres niveles de concentración para NIF y NOX (Tabla 10), colocando 50 μL de la solución estándar de NIF, 50 μL de la solución estándar de NOX y 500 μL de plasma en tubos de vidrio con tapa de rosca; se dejaron reposar durante 2 horas en la mesa de trabajo bajo luz roja y a temperatura ambiente ($15 \pm 5^\circ\text{C}$). Transcurrido el tiempo se procesaron y finalmente se comparó la respuesta obtenida con respecto a los controles preparados en el día del análisis, cuantificados con una curva de calibración.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

➤ Estabilidad en refrigeración durante 24 horas

Se preparó el triplicado de los puntos control en sus tres niveles de concentración (Tabla 10) colocando 50 μL de la solución estándar de NIF, 50 μL de la solución estándar de NOX y 500 μL de plasma en tubos de vidrio con tapa de rosca; se almacenaron protegidos de la luz directa en refrigeración de $2-4^\circ\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente se procesaron. Se comparó la respuesta obtenida de la prueba de estabilidad con la proporcionada por los controles preparados en el día del análisis y cuantificados con la curva de calibración correspondiente.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

➤ Estabilidad de muestra procesada a 24 horas

Se prepararon por triplicado los puntos control en sus tres niveles de concentración para NIF y NOX (Tabla 10), se procesaron e inyectaron como parte de una corrida normal la cual incluye la curva de calibración correspondiente, posteriormente se almacenaron dentro del automuestreador de cromatógrafo ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) durante 24 horas; después de las cuales se reinyectaron junto con muestras control preparadas el día del análisis, calibradas con su correspondiente curva de calibración, con las cuales se comparó la respuesta obtenida en ambos casos.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

➤ Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación

Un ciclo de congelación-descongelación es aquel en el cual la muestra de plasma cargado con los dos analitos se congela y posteriormente se descongela a temperatura ambiente.

En ésta prueba se realizó en tres ciclos de congelación-descongelación con un lapso de 30 min entre cada uno, tiempo durante el cual la muestra se descongela completamente a temperatura ambiente, posteriormente se congela completamente en el mismo intervalo de tiempo. Las muestras para el triplicado de los puntos control a sus tres niveles de concentración se prepararon con 50 μL de la solución estándar de NIF, 50 μL de la solución estándar de NOX y 500 μL de plasma (Tabla 10) en tubos con tapa de rosca, las cuales se almacenan a ($-80 \pm 5^\circ\text{C}$) para su congelación; después del tercer ciclo se procesaron y se compararon con controles preparados y procesados en el día del análisis cuantificados con la correspondiente curva de calibración.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

➤ Estabilidad a largo plazo a 62 días en congelación

Se prepararon cinco series de triplicado de puntos control en sus tres niveles de concentración (Tabla 10) para evaluar la estabilidad en un tiempo total de 62 días, que comprende un total de dos meses, para ello se colocaron 50 μL de la solución estándar de NIF, 50 μL de la solución estándar de NOX y 500 μL de plasma (Tabla 10) en tubos de vidrio con tapa de rosca, los cuales se almacenaron a $(-80 \pm 5^\circ\text{C})$ en el ultracongelador protegidos de la luz directa. Transcurridos los días de almacenamiento se procesaron y se analizaron comparando la respuesta obtenida con respecto a la obtenida de los puntos control preparados el día de análisis, cuantificados con la curva de calibración correspondiente.

* Criterios de aceptación: La respuesta obtenida después de la evaluación de la estabilidad no debe de exceder el $\pm 15\%$ con respecto a la respuesta que se obtuvo del valor original (tiempo cero), para considerarse estable.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Método Analítico

3.1.1 Condiciones Cromatográficas

La Nifedipina y su metabolito Nifedipina oxidada se determinaron mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta, las condiciones finales a las cuales se llevó a cabo la validación se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas finales empleadas en la validación de Nifedipina Oxidada y Nifedipina.

Cromatógrafo	Alliance 2695 (Waters)	
Detector	UV-VIS 2487 (Waters)	
Columna cromatográfica	Symmetry Waters C ₁₈ 150 x 3.9 mm 5 µm	
Longitud de onda	235 nm	
Fase móvil	Agua/MeOH/ACN (45:25:30) v/v/v	
Velocidad de flujo	0.80 mL/min	
Volumen de inyección	10 µL	
Temperatura de la columna	30°C ± 5°C	
Temperatura de la muestra	5°C ± 3°C	
Tiempo de retención	NOX 4.7 – 4.9 min	NIF 5.4 – 5.7 min
Tiempo de corrida	7.0 min	

3.1.2 Curva de Calibración y Muestras Control de Calidad

Se describe la preparación de las soluciones estándar de NIF y NOX empleadas para su determinación simultánea.

En las Tablas 8 y 9 se especifica el volumen de la alícuota de la solución estándar A y B de NIF y de las soluciones estándar I y II de NOX empleado para la

preparación de las soluciones que conformaran las curva de calibración y los puntos control, en un volumen final de 10 mL, así como la concentración en Sistema en un volumen final de 125 μ L y el límite de cuantificación.

Tabla 8. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina.

Clasificación	Alícuota de la Solución estándar A [100 μ g/mL] (μ L)	Alícuota de la Solución estándar B [5 μ g/mL] (μ L)	Concentración de NIF (ng/mL)	Alícuota de la solución de NIF (μ L)	Concentración de Sistema en 125 μ L (ng/mL)
LC	---	600	300	50	120
CC2	---	2000	1000	50	400
CB	150		1500	50	600
CC3	250	---	2500	50	1000
CC4	350	---	3500	50	1400
CM	400	---	4000	50	1600
CC5	500	---	5000	50	2000
CC6	600	---	6000	50	2400
CA	700	---	7000	50	2800
CC7	800	---	8000	50	3200

Tabla 9. Preparación de las soluciones estándar de Nifedipina Oxidada

Clasificación	Alícuota de la Solución estándar B [5 μ g/mL] (μ L)	Concentración de NOX (ng/mL)	Alícuota de la solución de NOX (μ L)	Concentración de Sistema en 125 μ L (ng/mL)
LC	200	100	50	40
CC2	300	150	50	60
CB	500	250	50	100
CC3	700	350	50	140
CC4	900	450	50	180
CM	1000	500	50	200
CC5	1200	600	50	240
CC6	1600	800	50	320
CA	1800	900	50	360
CC7	2000	1000	50	400

En la Tabla 10 se detalla la preparación de la curva de calibración en Método, los puntos control, el límite de cuantificación para la NIF y NOX, así como la concentración final en un volumen de 500 μ L de plasma.

Tabla 10. Curva de calibración, Puntos Control y Límite de Cuantificación para Nifedipina y Nifedipina Oxidada.

Clasificación	Concentración de la SE de NIF (ng/mL)	Concentración de la SE de NOX (ng/mL)	Alícuota de NIF y NOX (µL)	Concentración de NIF en 500µL de plasma (ng/mL)	Concentración de NOX en 500µL de plasma (ng/mL)
LC	300	100	50	30	10
CC2	1000	150	50	100	15
CB	1500	250	50	150	25
CC3	2500	350	50	250	35
CC4	3500	450	50	350	45
CM	4000	500	50	400	50
CC5	5000	600	50	500	60
CC6	6000	800	50	600	70
CA	7000	900	50	700	90
CC7	8000	1000	50	800	100

3.1.3 Proceso de Extracción

La determinación y cuantificación de NIF y NOX se realizó de acuerdo a las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 7 y siguiendo el proceso de extracción líquido- líquido esquematizado en la Figura 13.

El blanco de plasma se preparó con 500 µL de plasma libre de fármaco y la adición de 100 µL de solución de dilución, posteriormente se siguió el proceso de extracción líquido-líquido esquematizado.

➤ Diagrama para el proceso de extracción

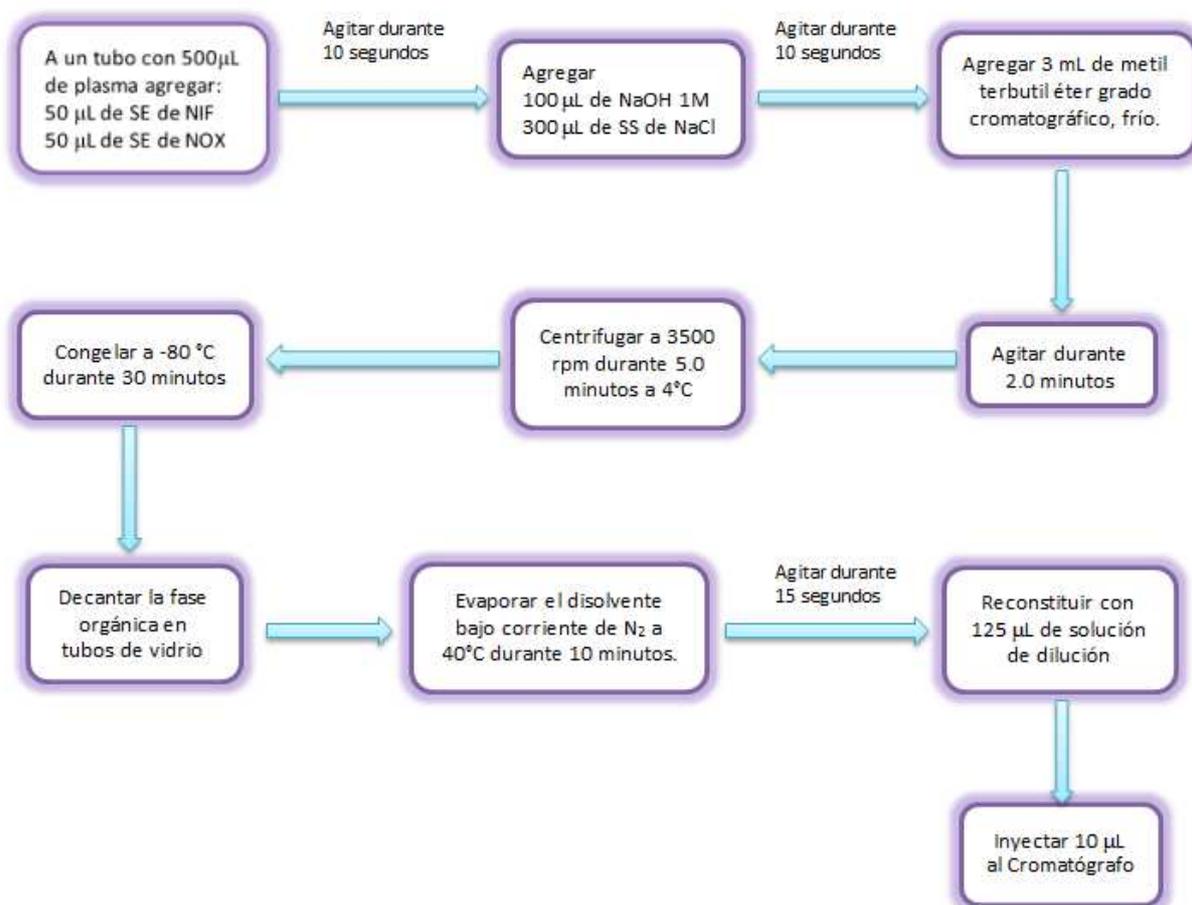


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de extracción líquido-líquido de Nifedipina y Nifedipina Oxidada.

➤ Muestra biológica – Plasma

El plasma que se empleó procedió de individuos sanos, comprobable mediante la documentación que avala la bioseguridad de las unidades solicitadas al banco de sangre del INER.

Cada unidad de plasma con la cual se trabajó se evaluó individualmente empleando el método de extracción esquematizado y la solución de dilución como reemplazo del volumen correspondiente a los analitos de estudio; con la finalidad de comprobar que no existan interferencias de compuestos endógenos propios de

la matriz biológica que obstaculicen la cuantificación de los analitos en sus tiempos de retención (Blanco de matriz biológica o blanco de plasma).

Una vez evaluada cada unidad se eligieron aquellas en las cuales no se presentaron respuesta en la posición del tiempo de retención correspondiente a los analitos; se eligieron 7 unidades diferentes, se mezclaron para así conformar el “pool” con el cual se trabajó, con un volumen total de 200 mL, el cual se fraccionó y se almacenó en congelación a temperatura de $(- 20 \pm 5^{\circ}\text{C})$ hasta su posterior uso; una de las fracciones se almacenó en refrigeración a temperatura de $2 - 8^{\circ}\text{C}$ estando en uso durante la validación.

➤ *Blanco de reactivos*

Constituido por la solución de dilución agua/metanol 50:50 v/v.

➤ *Solución de adecuabilidad del Sistema*

Se colocaron en un vial de alto recobro 50 μL de la solución de dilución, 100 μL de la solución estándar control medio (4000 ng/mL) de NIF y 100 μL de la solución estándar control medio (500 ng/mL) de NOX, se agitó en el vórtex, se eliminaron las burbujas y se inyectaron por septuplicado en forma consecutiva al inicio de cada corrida analítica. La concentración final en Sistema fue de 1600 ng/mL NIF y 200 ng/mL NOX.

Todas las soluciones estándar para la curva de calibración y puntos control tanto para NIF como para NOX, así como la solución de adecuabilidad se prepararon con protección directa de la luz (luz roja) y se almacenaron en refrigeración ($2-8^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior uso.

➤ *Integración*

Para la cuantificación de los analitos se empleó el Software Empower Pro con el cual se graficó la concentración de NIF y NOX (eje de las abscisas) contra la respuesta de altura (eje de las ordenadas) de los analitos; se realizó el ajuste matemático mediante la regresión lineal (ecuación de la recta $y = mx + b$), donde

m es la pendiente de la recta y b la ordenada al origen. La ponderación empleada fue $1/X^2$ para ambos analitos.

3.2 Validación del Método Analítico

3.2.1 Selectividad

En la Figura 14 se muestran los cromatogramas correspondientes a la selectividad del Método, en los cuales se observa que el BR y la matriz biológica, representada por el BP, no presentan picos que interfieran con la cuantificación de los analitos NOX y NIF; por lo tanto el método es selectivo.

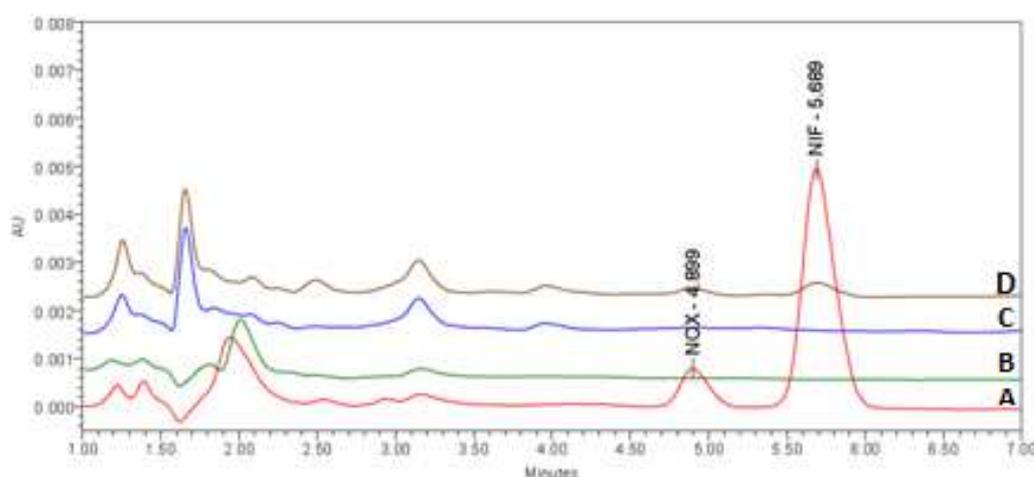


Figura 14. Cromatograma de Selectividad del Método. A) Control medio NOX 50 ng/mL 400 ng/mL, B) Blanco de reactivos, C) Blando de plasma, D) Límite de cuantificación NOX 10 ng/mL.

En la Figura 15 se muestran los cromatogramas correspondientes a la selectividad del método en cuanto a propiedades de la matriz biológica, es decir empleando para la determinación de los analitos plasma lipémico (C), hemolizado (B), así como el uso de heparina (D) como anticoagulante al momento de tomar la muestra sanguínea. No se presentan interferencias entre los analitos y los plasmas lipémico, hemolizado y la heparina, por lo tanto el método analítico es selectivo.

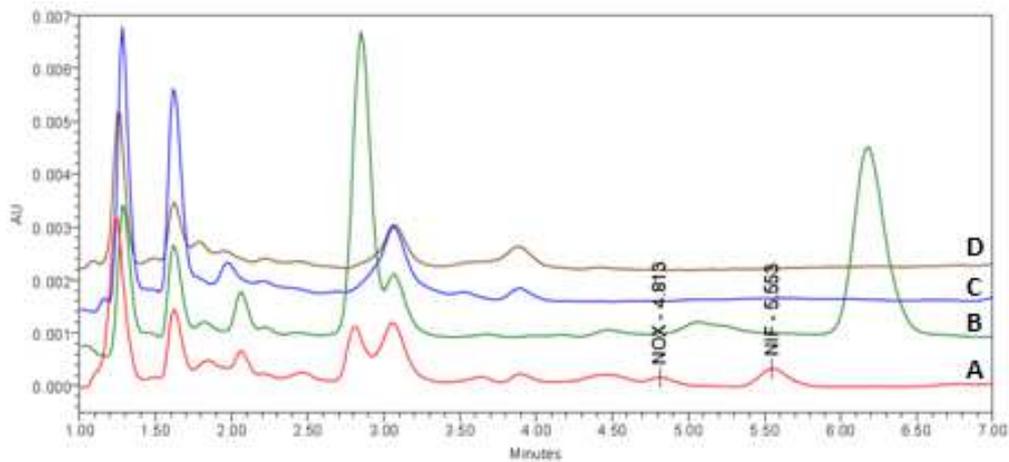


Figura 15. Cromatograma de Selectividad en propiedades de la matriz biológica. A) Límite de cuantificación NOX 10 ng/mL y NIF 30 ng/mL, B) Plasma hemolizado, C) Plasma lipémico y D) Plasma con heparina

En la Figura 16 se muestran los cromatogramas de selectividad del método correspondientes a fármacos de uso común como la cafeína (B), paracetamol (D) e ibuprofeno (C), los cuales no presentaron ninguna interferencia significativa que dificulte la cuantificación de NIF y NOX, por lo tanto el método analítico es selectivo.

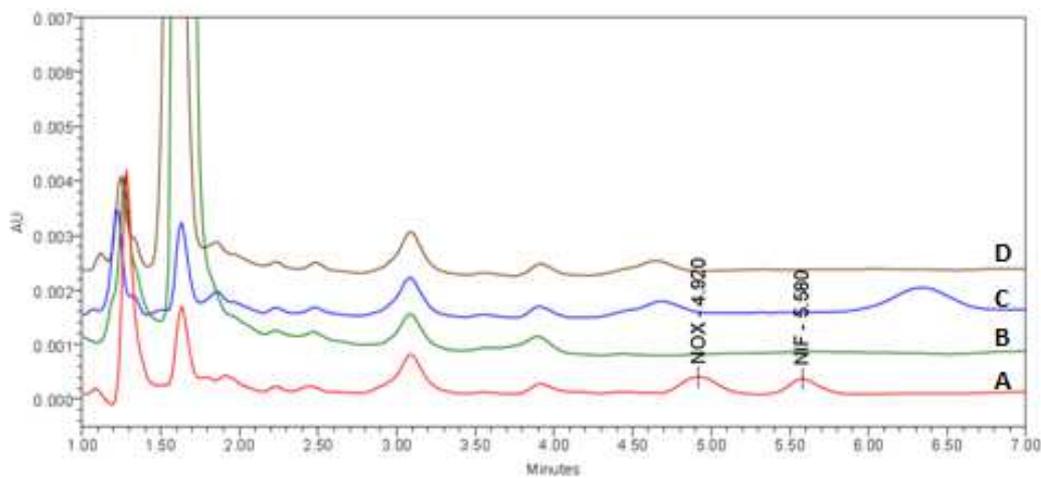


Figura 16. Cromatograma de Selectividad en fármacos de uso común. A) Límite de Cuantificación NOX 10 ng/mL y NIF 30 ng/mL, B) Plasma cargado con cafeína 30 µg/mL, C) Plasma cargado con Ibuprofeno 60 µg/mL, D) Plasma cargado con paracetamol 30 µg/mL.

3.2.2 Linealidad

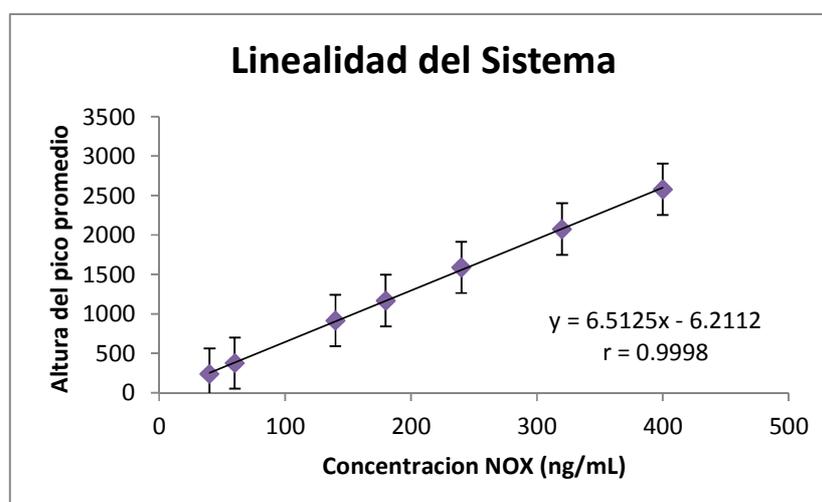
Linealidad del Sistema

Del sextuplicado de la curva de calibración en Sistema para NOX se obtuvo el promedio de la altura, en cada uno de los niveles de concentraciones que la conforman, valores que se muestran en la Tabla 11; así como la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (% CV) y el error estándar. Se incluyen los valores de identidad de la recta.

Tabla 11. Linealidad del Sistema Nifedipina Oxidada.

Concentración teórica de NOX (ng/mL)	Promedio por Altura de NOX	Desviación estándar	% CV	Error estándar
40	238.889	5.393	2.257	2.202
60	375.619	5.974	1.591	2.439
140	916.556	13.747	1.500	5.612
180	1169.186	18.670	1.597	7.622
240	1589.492	9.624	0.605	3.929
320	2075.137	48.192	2.322	19.674
400	2578.897	36.344	1.409	14.837

La Gráfica 1 presenta los valores promedio de altura contra la concentración teórica de NOX, el comportamiento fue lineal en un rango de 40 ng/mL a 400 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y = 6.5125x - 6.2112$, que comprende una pendiente (m) de 6.5125, una ordenada al origen (b) de $- 6.2112$, coeficiente de determinación (r^2) 0.9996 y coeficiente de correlación (r) de 0.9998.



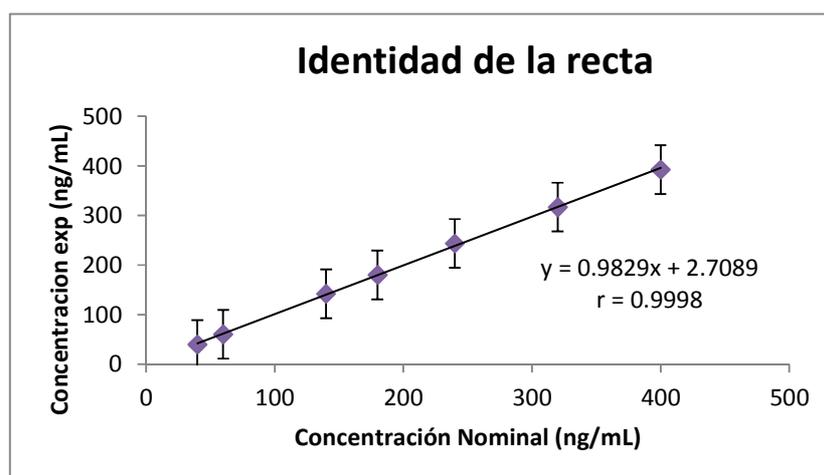
Gráfica 1. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina Oxidada en Sistema.

En la Tabla 12 se despliegan los valores de la concentración calculada como promedio del sextuplicado de la curva de calibración de NOX del Sistema, los cuales se obtuvieron a partir de la integración de la respuesta (altura). Se calculó la DE, % CV y el error estándar.

Tabla 12. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina Oxidada.

Concentración teórica de NOX (ng/mL)	Promedio de la concentración calculada de NOX	Desviación estándar	% CV	Error estándar
40	39.697	0.276	0.696	0.113
60	60.341	0.800	1.326	0.327
140	141.981	1.688	1.189	0.689
180	180.095	1.873	1.040	0.765
240	243.542	0.731	0.300	0.298
320	316.846	7.554	2.384	3.084
400	392.859	4.163	1.060	1.699

La Gráfica 2 presenta la concentración calculada, a partir de la integración de la respuesta de altura, contra la concentración teórica de NOX, así como la identidad de la recta, la cual presenta un comportamiento lineal en un rango de 40 ng/mL a 400 ng/mL descrita por la siguiente ecuación de la recta $y=0.9829x + 2.7089$, que comprende una pendiente (m) de 0.9829, una ordenada al origen (b) de 2.7089, coeficiente de determinación (r^2) 0.9996 y coeficiente de correlación (r) de 0.9998.



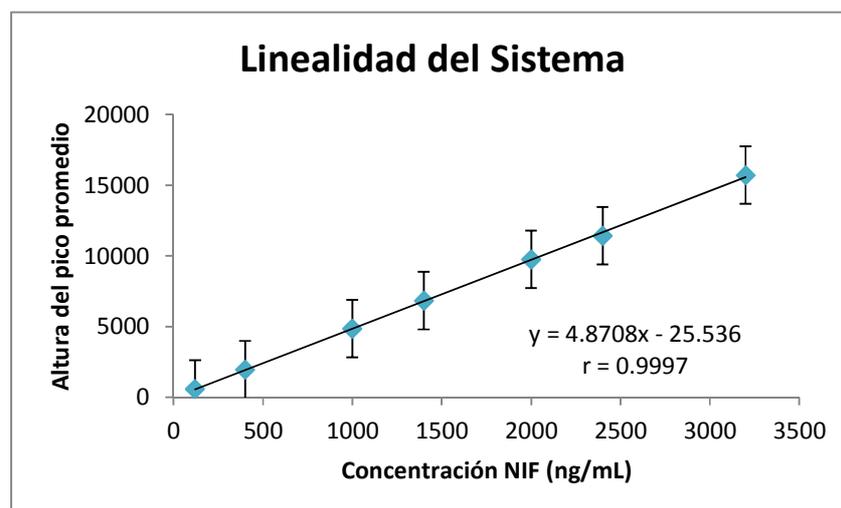
Gráfica 2. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina Oxidada.

El promedio de la altura del pico de NIF se obtuvo a partir del sextuplicado de la curva de calibración en Sistema, permitiendo calcular así la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (% CV) y el error estándar; valores que se presentan en la Tabla 13. Se incluyen los valores de identidad de la recta.

Tabla 13. Linealidad del Sistema Nifedipina

Concentración teórica de NIF (ng/mL)	Promedio por Altura de NIF	Desviación estándar	% CV	Error estándar
120	572.493	9.435	1.648	3.852
400	1942.760	18.691	0.962	7.630
1000	4843.242	42.258	0.873	17.252
1400	6829.459	53.243	0.780	21.736
2000	9752.762	55.398	0.568	22.616
2400	11412.107	289.991	2.541	118.388
3200	15709.199	132.906	0.846	54.259

La Gráfica 3 exhibe los valores promedio de altura contra la concentración teórica de NIF, el comportamiento fue lineal en un rango de 120 ng/mL a 3200 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y = 4.8708x - 25.536$, que comprende una pendiente (m) de 4.8708, una ordenada al origen (b) de -25.536 , coeficiente de determinación (r^2) 0.9995 y coeficiente de correlación (r) de 0.9997.



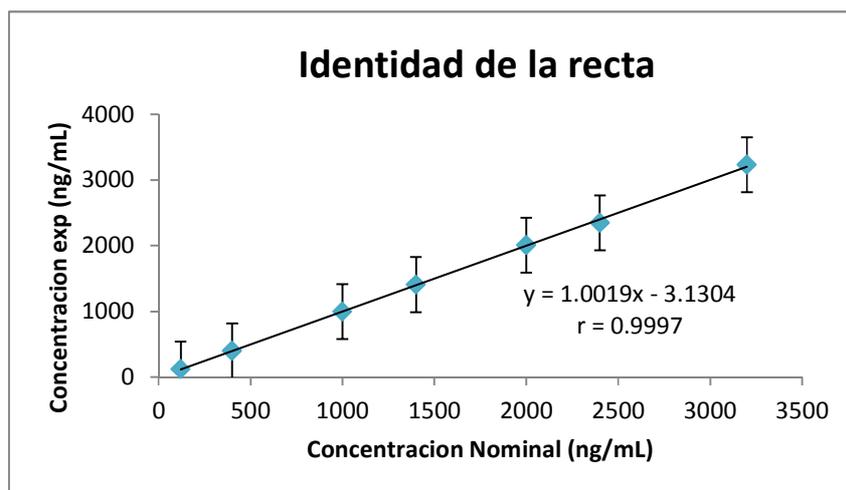
Gráfica 3. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina en Sistema.

En la Tabla 14 se presentan los valores de la concentración calculada como promedio del sextuplicado de la curva de calibración de NIF del Sistema, los cuales se obtuvieron a partir de la integración de la respuesta (altura). Se calculó la DE, % CV y el error estándar.

Tabla 14. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina.

Concentración teórica de NIF (ng/mL)	Promedio de la concentración calculada de NIF	Desviación estándar	% CV	Error estándar
120	119.867	0.351	0.293	0.143
400	401.739	3.632	0.904	1.483
1000	998.342	8.470	0.848	3.458
1400	1406.894	9.694	0.689	3.958
2000	2008.218	10.723	0.534	4.378
2400	2349.504	57.544	2.449	23.492
3200	3233.379	16.731	0.517	6.831

La Gráfica 4 presenta la concentración calculada, a partir de la integración de la respuesta de altura, contra la concentración teórica de NIF, así como la identidad de la recta, la cual presenta un comportamiento lineal en un rango de 120 ng/mL a 3200 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y=1.009X-3.1304$, que comprende una pendiente (m) de 1.0019, una ordenada al origen (b) de $- 3.1304$, coeficiente de determinación (r^2) 0.9995 y coeficiente de correlación (r) de 0.9997.



Gráfica 4. Identidad de la recta del Sistema Nifedipina.

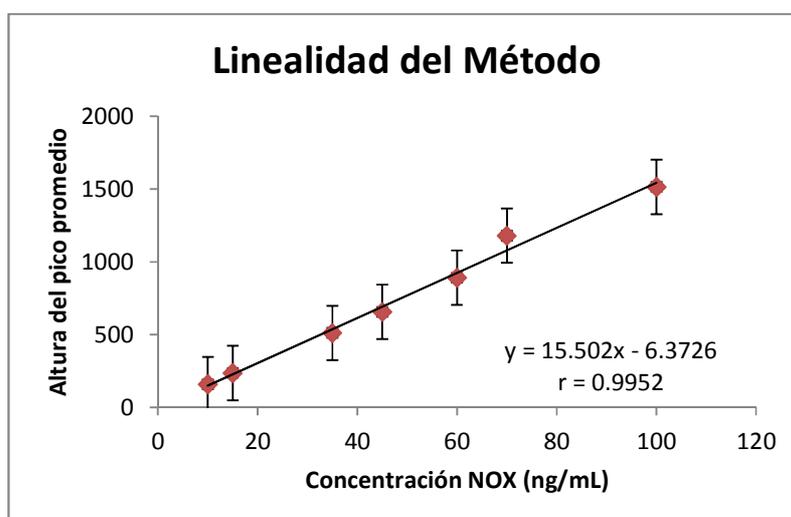
Linealidad de Método

El promedio de la altura del pico de NOX se obtuvo a partir del sextuplicado de la curva de calibración después de haber pasado por el proceso de extracción, permitiendo calcular así la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (% CV) y el error estándar; valores que se presentan en la Tabla 15. Se incluyen los valores de identidad de la recta.

Tabla 15. Linealidad del Método Nifedipina Oxidada.

Concentración teórica de NOX (ng/mL)	Promedio por Altura de NOX	Desviación estándar	% CV	Error estándar
10	158.991	8.033	5.053	3.280
15	235.887	14.277	6.053	5.829
35	512.271	17.305	3.378	7.065
45	656.879	40.913	6.228	16.703
60	891.031	46.133	5.178	18.834
70	1178.749	85.284	7.235	34.817
100	1514.898	94.917	6.266	38.750

La Gráfica 5 presenta los valores promedio de altura contra la concentración teórica de NOX, el comportamiento fue lineal en un rango de 10 ng/mL a 100 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y=15.502x - 6.3726$, que comprende una pendiente (m) de 15.502, una ordenada al origen (b) de - 6.3726, coeficiente de determinación (r^2) 0.9904 y coeficiente de correlación (r) de 0.9952.



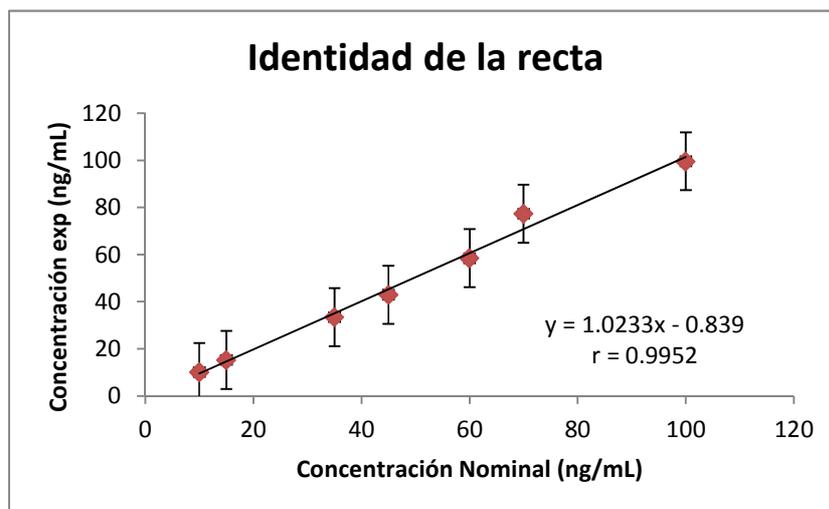
Gráfica 5. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina Oxidada en Método.

En la tabla 16 se presentan los valores de la concentración calculada como promedio del sextuplicado de la curva de calibración de NOX en Método, los cuales se obtuvieron a partir de la integración de la respuesta (altura). Se calculó la desviación estándar DE, % CV y el error estándar.

Tabla 16. Identidad de la recta Nifedipina Oxidada

Concentración teórica de NOX (ng/mL)	Promedio de la concentración calculada de NOX	Desviación estándar	% CV	Error estándar
10	10.060	0.307	3.049	0.125
15	15.155	0.696	4.592	0.284
35	33.417	0.645	1.929	0.263
45	42.934	1.336	3.112	0.545
60	58.431	2.187	3.742	0.893
70	77.361	2.679	3.462	1.094
100	99.579	2.871	2.883	1.172

La Gráfica 6 muestra la concentración calculada, a partir de la integración de la respuesta de altura, contra la concentración teórica de NOX, así como la identidad de la recta, la cual presenta un comportamiento lineal en un rango de 10 ng/mL a 100 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y=1.02033x - 0.839$, que comprende una pendiente (m) de 1.02033, una ordenada al origen (b) de $- 0.839$, coeficiente de determinación (r^2) 0.9904 y coeficiente de correlación (r) de 0.9952.



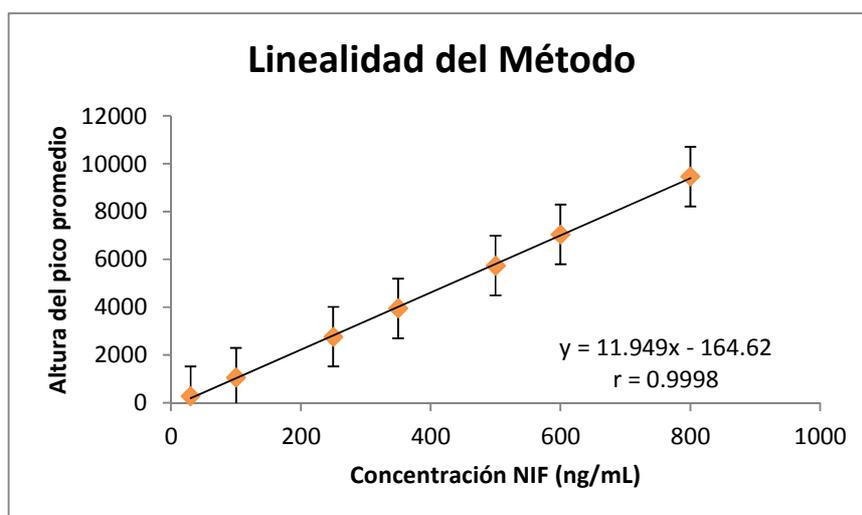
Gráfica 6. Identidad de la recta Nifedipina Oxidada

El promedio de la altura del pico de NIF se obtuvo a partir del sextuplicado de la curva de calibración en Método, permitiendo calcular así la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (% CV) y el error estándar; valores que se presentan en la Tabla 17. Se incluyen los valores de identidad de la recta.

Tabla 17. Linealidad del Método de Nifedipina.

Concentración teórica de NIF (ng/mL)	Promedio por Altura de NIF	Desviación estándar	% CV	Error estándar
30	275.358	19.717	7.161	8.050
100	1054.446	66.325	6.290	27.077
250	2760.876	105.056	3.805	42.889
350	3951.479	128.507	3.252	52.463
500	5734.640	150.874	2.631	61.594
600	7036.938	118.270	1.681	48.284
800	9459.214	173.687	1.836	70.907

La Gráfica 7 presenta los valores promedio de altura contra la concentración teórica de NIF, el comportamiento fue lineal en un rango de 30 ng/mL a 800 ng/mL, descrita por la siguiente ecuación de la recta $y=11.949x-164.62$, que comprende una pendiente (m) de 11.949, una ordenada al origen (b) de -164.62 , coeficiente de determinación (r^2) 0.9996 y coeficiente de correlación (r) de 0.9998.



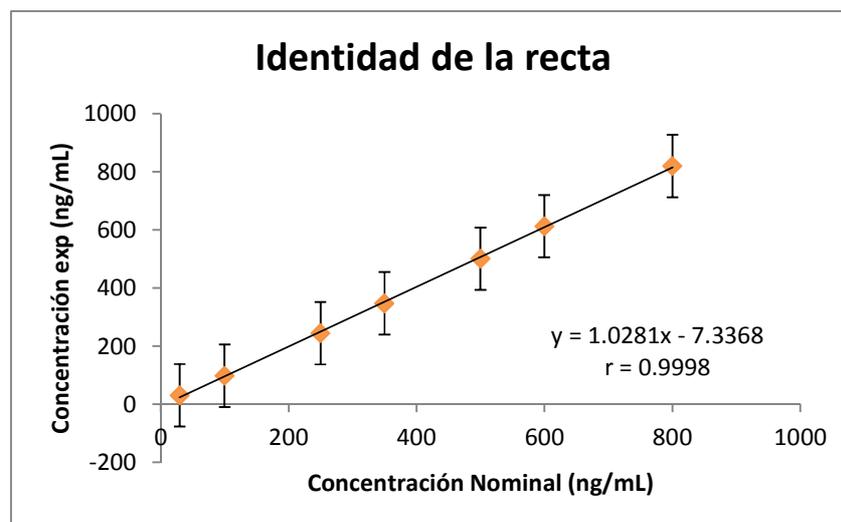
Gráfica 7. Curva de calibración promedio para la determinación de Nifedipina en Método.

En la Tabla 18 se presentan los valores de la concentración calculada como promedio del sextuplicado de la curva de calibración de NIF en Método, los cuales se obtuvieron a partir de la integración de la respuesta (altura). Se calculó la DE, % CV y el error estándar.

Tabla 18. Identidad de la recta Nifedipina.

Concentración teórica de NIF (ng/mL)	Promedio por Altura de NIF	Desviación estándar	% CV	Error estándar
30	30.273	0.315	1.040	0.129
100	97.408	4.324	4.439	1.765
250	244.403	6.097	2.495	2.489
350	347.009	9.085	2.618	3.709
500	500.615	9.950	1.988	4.062
600	612.847	6.122	0.999	2.499
800	820.083	11.993	1.462	4.896

La Gráfica 8 presenta la concentración calculada, a partir de la integración de la respuesta de altura, contra la concentración teórica de NIF, así como la identidad de la recta, la cual presenta un comportamiento lineal en un rango de 30 ng/mL a 800 ng/mL, descrita con la siguiente ecuación de la recta $y=1.0281x-7.3368$, que comprende una pendiente (m) de 1.0281, una ordenada al origen (b) de -7.3368 , coeficiente de determinación (r^2) 0.9996 y coeficiente de correlación (r) de 0.9998.



Gráfica 8. Identidad de la recta Nifedipina.

De acuerdo con los resultados obtenidos para ambos analitos en Sistema y en Método, en relación a la altura del pico y la concentración calculada se obtienen coeficientes de variación menores al 15% con respecto al valor nominal, así como una relación lineal que corresponde a una $r > 0.99$, por lo tanto la NIF es lineal en un rango de 30 a 800 ng/mL y NOX en un rango de 10 a 100 ng/mL. El método analítico para determinar NIF y NOX en plasma es lineal.

3.2.3 Precisión

Repetibilidad

En las Tablas 19 y 20 se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad del Método, para la cual se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% respecto al valor nominal, tanto para NOX como para NIF, en los tres niveles de concentración que comprenden los puntos control analizados por sextuplicado de manera independiente en el mismo día.

Tabla 19. Repetibilidad Nifedipina Oxidada

Concentración nominal de NOX (ng/mL)	Puntos control		
	CB 25	CM 50	CA 90
Promedio	25.722	49.539	83.701
DE	1.079	3.137	4.151
% CV	4.194	6.332	4.959
DA (%)	2.886	0.923	6.999

Tabla 20. Repetibilidad Nifedipina.

Concentración nominal de NIF (ng/mL)	Puntos control		
	CB 150	CM 400	CA 700
Promedio	156.908	430.065	720.288
DE	6.657	6.561	32.318
% CV	4.243	1.526	4.487
DA (%)	4.605	7.516	2.898

El método cumple con la característica de repetibilidad al ser aplicado de manera consecutiva en el mismo día sin representar grandes variaciones en los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de trabajo.

Reproducibilidad

En las Tablas 21 y 22 se exhiben los datos obtenidos de la reproducibilidad (tres días consecutivos) realizada con los puntos control por triplicado tanto para NOX como para NIF, obteniéndose coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto al valor nominal.

Tabla 21. Reproducibilidad de variabilidad inter día Nifedipina Oxidada.

Concentración nominal de NOX (ng/mL)	Puntos control		
	CB 25	CM 50	CA 90
Promedio	26.445	52.000	86.399
DE	1.289	2.823	4.810
% CV	4.873	5.430	5.567
DA (%)	5.780	4.000	4.002

Tabla 22. Reproducibilidad o variabilidad inter día Nifedipina.

Concentración nominal de NIF (ng/mL)	Puntos control		
	CB 150	CM 400	CA 700
Promedio	154.522	411.127	710.194
DE	4.440	18.870	28.462
% CV	2.874	4.590	4.008
DA (%)	3.014	2.782	1.456

El método es reproducible al realizar el análisis en tres días consecutivos manteniendo las mismas condiciones de trabajo sin que con ello se presentaran variaciones mayores al 15% con respecto al valor nominal, demostrado tanto en coeficientes de variación como en desviaciones absolutas.

3.2.4 Exactitud

De acuerdo con los resultados obtenidos de la pruebas de repetibilidad y reproducibilidad (Tablas 19, 20, 21 y 22 respectivamente), el método es exacto, ya que se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto al valor nominal para ambos analitos en los tres niveles de concentración que comprenden los puntos control.

3.2.5 Recobro

En las Tablas 23 y 24 se muestra la comparación entre la respuesta obtenida de los puntos control en Sistema (solución) y en Método (extracción), en los tres niveles de concentración, a partir de 6 determinaciones independientes.

Tabla 23. Recobro Nifedipina Oxidada.

Concentración nominal (ng/mL)	Altura promedio en Sistema	Altura promedio en Método	Recobro (%)
25	485.667	413	85.038
50	944	811	85.911
90	1707.667	1425.667	83.486

Tabla 24. Recobro Nifedipina.

Concentración nominal (ng/mL)	Altura promedio en Sistema	Altura promedio en Método	Recobro (%)
150	1926.833	1633.167	84.759
400	5238.833	4558.5	87.014
700	8996.333	7952.5	88.397

La respuesta del Sistema representa el 100%, a partir de ella se calculó el porcentaje que corresponde a la respuesta obtenida en plasma. El recobro global para NOX es del 84.81% y para NIF es del 86.72%. El método de extracción para NIF y NOX es eficiente ya que se recupera más del 80% de manera constante en cada uno de los tres niveles de concentración con respecto a la concentración nominal.

3.2.6 Límite de Cuantificación

En la Tabla 25 se despliegan los valores promedio de las concentraciones calculadas de 6 determinaciones independientes de NOX y NIF en su concentración más baja, primer punto de la curva de calibración en plasma.

Tabla 25. Límite de Cuantificación Nifedipina Oxidada y Nifedipina.

Analito	Concentración (ng/mL)	Concentración Promedio (ng/mL)	DE	% CV	DA	Altura promedio	Señal ruido	Altura/ruido
NOX	10	10.507	0.298	2.836	5.006	218.6	3	72.867
NIF	30	27.984	2.029	7.251	6.721	499.4	4	124.85

De las determinaciones independientes se obtuvo un coeficiente de variación y una desviación absoluta menores al 20% con respecto al valor nominal, cumpliendo así con la precisión y exactitud para establecer el LC de NOX en 10 ng/mL y para NIF en 30 ng/mL.

La señal obtenida del LC para NOX y NIF fue mayor 10 veces en relación con la señal propia del ruido, por lo cual no se presentan interferencias con la matriz biológica, cumpliéndose así los criterios de aceptación.

3.2.7 Límite de Detección

En la Tabla 26 se presentan los valores promedio de las concentraciones calculadas de las 6 determinaciones independientes de NOX y NIF para el LD, concentración menor al primer punto de la CC.

Tabla 26. Límite de Detección Nifedipina Oxidada y Nifedipina.

Analito	Concentración (ng/mL)	Promedio Concentración (ng/mL)	DE	% CV	DA	Altura promedio	Señal ruido	Altura/ruido
NOX	5	4.125	0.139	3.361	17.5	55.5	3	18.3
NIF	15	14.264	0.748	5.242	4.909	267	4	66.75

De las determinaciones independientes se obtuvo un coeficiente de variación y desviación absoluta menores al 20% con respecto al valor nominal. La señal propia de NOX y NIF fue mayor 3 veces con respecto a la señal ruido. El LD quedó establecido para NOX 5 ng/mL y para NIF en 15 ng/mL.

En la Figura 17 se presentan los cromatogramas correspondientes al BP y al LD, en el cual se distinguen los picos correspondientes a los analitos NOX y NIF con una señal mayor a la propia del ruido en el BP; por lo tanto visualmente detectables.

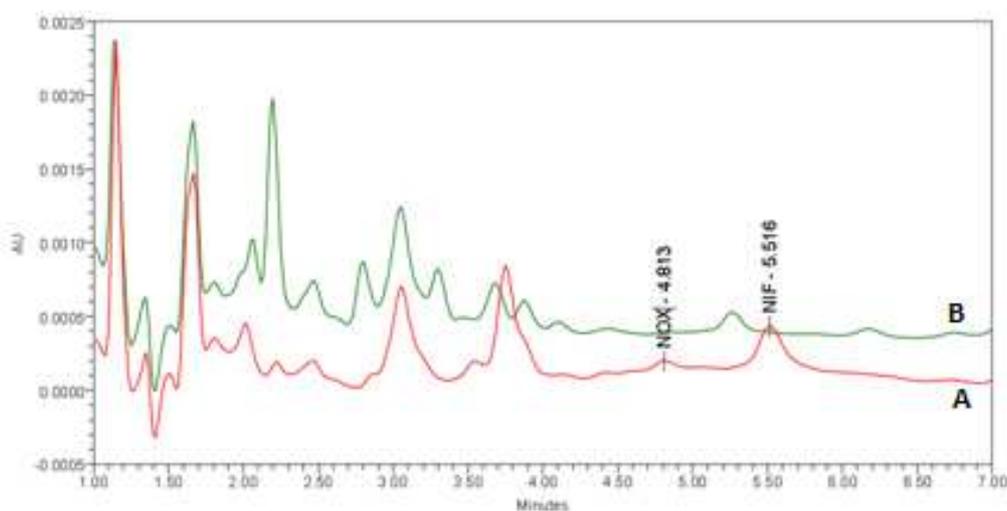


Figura 17 Cromatografía Límite de Detección para Nifedipina y Nifedipina Oxidada. A) Límite de detección NOX 5 ng/mL y NIF 15 ng/mL, B) blanco de plasma.

3.2.8 Efecto de Dilución

La Tabla 27 muestra los valores obtenidos después de realizada la dilución de los analitos en el pool de plasma. La cuantificación de los analitos se realizó a partir de 3 determinaciones independientes.

Tabla 27. Efecto de dilución Nifedipina Oxidada y Nifedipina.

Analito	Concentración nominal (ng/mL)	Promedio concentración (ng/mL)	DE	% CV	DA
NOX	150	141.217	4.414	3.126	5.855
NIF	1000	959.162	24.887	2.595	4.084

El método para cuantificar NOX y NIF en plasma permite que se obtengan resultados de la misma exactitud y precisión tanto en muestras sometidas a dilución como de muestras analizadas directamente; ya que de la prueba realizada se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto al valor nominal.

3.2.9 Tolerancia

- Cambio en las Proporciones de los Componentes en la FM ($\pm 2\%$ de ACN)

En las Tablas 28 a 31 se exponen los datos obtenidos de la tolerancia que presentó el Método al cambio en las proporciones de ACN $\pm 2\%$.

Tabla 28. Tolerancia a +2% de Acetonitrilo Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
25	24.039	24.643	0.645	2.616	2.513
50	47.721	48.479	0.296	0.610	1.590
90	86.937	88.539	1.743	1.968	1.842

Tabla 29. Tolerancia a +2% de Acetonitrilo Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
150	159.474	158.861	3.194	2.011	0.384
400	418.324	419.736	1.506	0.359	0.337
700	714.472	723.247	14.065	1.945	1.228

Tabla 30. Tolerancia a -2% de Acetonitrilo Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
25	23.77	24.976	3.154	12.627	5.063
50	49.679	50.456	2.738	5.426	1.565
90	88.267	88.741	4.895	5.516	0.537

Tabla 31. Tolerancia a -2% de Acetonitrilo Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
150	140.342	145.130	17.848	12.298	3.412
400	385.261	393.93	3.305	0.839	2.250
700	662.208	674.656	33.632	4.985	1.880

De las modificaciones realizadas en cuanto a las condiciones cromatográficas se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto a los puntos control analizados en condiciones normales, en los tres niveles de concentración para ambos analitos. El método analítico es tolerante a los cambios en la proporción de $\pm 2\%$ de ACN en la composición original de la FM.

➤ Preparación de la Fase Móvil

En las Tablas 32 y 33 se exponen los datos obtenidos de la tolerancia que presentó el Método a realizar de manera directa la mezcla de los disolventes que constituyen la FM.

Tabla 32. Tolerancia a preparación de la Fase Móvil Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
25	23.77	24.258	3.555	14.654	2.043
50	49.679	49.964	2.861	5.726	0.574
90	88.267	94.178	6.915	7.343	6.697

Tabla 33. Tolerancia a preparación directa de la Fase Móvil Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones modificadas			
150	140.342	149.446	19.832	13.270	6.487
400	385.261	392.360	6.997	1.783	1.843
700	662.208	664.888	34.330	5.163	0.405

De la comparación entre los puntos control en las condiciones de trabajo modificadas y los analizados en condiciones normales se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15%, por lo tanto el método analítico es tolerante a la preparación directa de la FM lo que hace posible analizar las muestras en equipos en los que se requiera prepararla de manera directa sin que con ello se afecten la precisión y exactitud de los resultados.

3.2.10 Estabilidad

➤ Estabilidad en Solución

En las Tablas 34 y 35 se despliegan los valores correspondientes a la estabilidad de las soluciones estándar de los analitos NOX y NIF almacenadas en refrigeración.

Tabla 34. Estabilidad en solución para Nifedipina Oxidada almacenada en refrigeración.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
100	455.667	457.333	4.726	1.033	0.366
200	916.667	918	11.358	1.237	0.145
360	1617	1605	7.211	0.449	0.742

Las soluciones estándar de NOX almacenadas en refrigeración (32 días) al compararse con las preparadas el día del análisis presentan coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto a éstas, por lo tanto son estables y se pueden emplear de manera confiable para la determinación del analito en muestras.

Tabla 35. Estabilidad en solución para Nifedipina almacenada en refrigeración.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
600	1979.333	1972.0	50.478	2.560	0.370
1600	5316	5566.667	61.093	1.097	4.715
2800	9790.333	9328.667	162.001	1.737	4.716

Las soluciones estándar de NIF se almacenaron durante 69 días, después de los cuales se procesaron, analizaron y compararon con soluciones preparadas el día de la corrida, obteniéndose así coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto a éstas. Las soluciones de NIF son estables almacenadas en refrigeración, por lo tanto es seguro y confiable emplearlas en la determinación del analito en muestras de plasma.

➤ Estabilidad a Temperatura Ambiente 2 horas

En las Tablas 36 y 37 se muestran los valores obtenidos de la estabilidad de los analitos en la matriz biológica a temperatura ambiente (15 ± 5 °C) en un intervalo de 2 horas.

Tabla 36. Estabilidad a temperatura ambiente 2 horas Nifedipina Oxidada

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
25	23.77	25.901	2.961	11.433	8.956
50	49.679	47.824	2.817	5.890	3.733
90	88.267	94.077	6.387	6.789	6.583

Tabla 37. Estabilidad a temperatura ambiente 2 horas Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
150	140.342	136.233	16.681	12.244	2.928
400	385.261	354.683	26.308	7.417	7.937
700	662.208	670.688	50.498	7.529	1.281

La comparación entre el triplicado de puntos control, después de su extracción preparados el día del análisis y los puntos control procesados después del tiempo transcurrido en las condiciones antes mencionadas, presentan un coeficiente de variación y la desviación absoluta menores al 15% con respecto a los obtenidos en condiciones normales de trabajo, tanto para NOX como para NIF. Los analitos son estables a permanecer en la mesa de trabajo (protegidos de la luz) a temperatura de 15 ± 5 °C durante dos horas, sin que con ello se vea afectada la precisión y exactitud de las determinaciones realizadas una vez procesadas las muestras.

➤ Estabilidad en Refrigeración durante 24 horas

En las Tablas 38 y 39 se exponen los valores obtenidos de la comparación entre los puntos control preparados el día del análisis y los puntos control por triplicado procesados después de ser almacenados 24 horas en refrigeración a (2-4°C) protegidos de la luz.

Tabla 38. Estabilidad de muestras almacenadas en refrigeración por 24 horas para Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
25	25.959	25.702	0.628	2.445	0.991
50	51.205	51.579	1.757	3.406	0.732
90	91.893	89.822	1.235	1.375	2.254

Tabla 39. Estabilidad de muestras almacenadas en refrigeración por 24 horas ara Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
150	158.772	148.668	4.098	2.756	6.364
400	413.784	398.495	18.145	4.553	3.695
700	735.346	703.026	24.110	3.430	4.395

Una muestra que se someterá a análisis o en su caso el plasma cargado con los analitos se pueden almacenar en refrigeración (2-4°C) protegidos de la luz durante 24 horas, ser procesados y cuantificados sin que con ello se vean afectados los resultados en cuanto a precisión y exactitud, lo cual se demuestra al obtener un coeficiente de variación y una desviación absoluta menores al 15% éstos como resultado de la comparación entre las muestras sometidas a estas condiciones de almacenamiento y muestras preparadas el día del análisis.

➤ Estabilidad de la Muestra Procesada a 24 horas

En las Tablas 40 y 41 se presentan los valores obtenidos después de analizar las muestras almacenadas en el automuestreador (5 ± 3°C) protegidas de la luz durante 24 h y su comparación con el triplicado de los puntos control preparados el día del análisis.

Tabla 40. Estabilidad de muestra procesada a 24 horas Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
25	25.959	26.826	0.365	1.361	3.340
50	51.205	52.675	0.537	1.020	2.872
90	91.893	90.766	0.764	0.842	1.226

Tabla 41. Estabilidad de muestra procesada a 24 horas Nifedipina

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
150	158.772	163.221	1.817	1.113	2.802
400	413.784	436.784	10.433	2.388	5.559
700	735.346	727.479	8.531	1.173	1.070

De las muestras procesadas y almacenadas se obtuvieron CV y DE menores al 15% con respecto al valor nominal, al comparar la concentración de éstas con las procesadas y analizadas en el día de la corrida la DA fue menor al 15% por lo cual la no se presentó una alta variabilidad entre las diferentes determinaciones. La determinación de NOX y NIF como muestras procesadas, almacenadas en el automuestreador, protegidas de la luz y a bajas temperaturas durante 24h es precisa y exacta, por lo tanto son estables a estas condiciones.

➤ Estabilidad a 3 Ciclos de Congelación-descongelación

En las Tablas 42 y 43 se exponen los valores obtenidos de la cuantificación de los analitos NOX y NIF después de someterse a 3 ciclos de congelación-descongelación y compararse con muestras de los puntos control preparadas el día del análisis.

Tabla 42. Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
25	25.959	25.395	1.465	5.768	2.175
50	51.205	49.155	0.866	1.762	4.004
90	91.893	91.146	4.635	5.086	0.813

Tabla 43. Estabilidad a 3 ciclos de congelación-descongelación Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
150	158.772	147.578	6.202	4.202	7.051
400	413.784	395.493	8.560	2.164	4.420
700	735.346	701.592	17.563	2.503	4.590

El plasma cargado con los analitos analizado después de concluir los 3 ciclos de congelación-descongelación se comparó con PC preparados en condiciones normales de trabajo, de lo cual se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15% con respecto a las muestras frescas; por lo tanto NOX y NIF son estables a éstas condiciones de almacenamiento sin que con ello se vea afectada la precisión y exactitud de los resultados obtenidos.

➤ Estabilidad a Largo Plazo

En las Tablas 44 y 45 se presenta los valores obtenidos a partir de la cuantificación de los puntos control para ambos analitos después de ser almacenados en congelación durante 2 meses (62 días), una vez transcurridos, se procesaron y analizaron, comparándose con PC preparados el día de la corrida.

Tabla 44. Estabilidad a largo plazo a 62 días en congelación Nifedipina Oxidada.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
25	23.443	25.875	0.278	1.074	10.374
50	49.643	49.719	1.230	2.475	0.152
90	88.252	89.641	3.525	3.932	1.574

Tabla 45. Estabilidad a largo plazo a 62 días en congelación para Nifedipina.

Concentraciones nominales (ng/mL)	Promedio concentración		DE	% CV	DA
	Condiciones normales	Condiciones de estabilidad			
150	153.700	151.615	4.880	3.219	1.357
400	410.225	392.966	12.015	3.057	4.207
700	739.188	698.140	14.442	2.069	5.553

De la comparación entre las muestras de plasma cargadas con los analitos y almacenadas en congelación y los PC preparados el día del análisis se obtuvieron coeficientes de variación y desviaciones absolutas menores al 15%, lo que demuestra que se pueden almacenar muestras durante 2 meses en congelación y protegidas de la luz sin que con ello se afecte las características de las muestras, demostrando mantener la precisión y exactitud de NOX y NIF.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de NIF y su metabolito NOX en plasma mediante una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, con detección UV, de acuerdo a los lineamientos establecidos en la NOM-177-SSA-1989.

El método analítico validado es lineal, exacto y preciso en un rango de concentraciones de 10 a 100 ng/mL y 30 a 800 ng/mL para NOX y NIF respectivamente. Con un límite de cuantificación de 10 ng/mL y 30 ng/mL y un límite de detección de 5 ng/mL y 15 ng/mL para NOX y NIF respectivamente.

El método también demostró ser selectivo para NOX y NIF ya que es posible su cuantificación en plasma lipémico, hemolizado y con heparina; y no presentó interferencias a la cafeína, paracetamol e ibuprofeno.

Es un método eficaz al presentar un recobro mayor al 80 % tanto para NIF como para NOX. Es tolerante a cambios en la FM ($\pm 2\%$ de ACN) y la preparación directa de ésta.

Los analitos son estables a 24 h en refrigeración en muestras sin procesar y procesadas (2-4°C), a temperatura de $15 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 2 horas y a tres ciclos de congelación-descongelación; mientras se mantengan protegidas de la luz.

El método analítico es confiable para la determinación de NIF y su metabolito NOX en estudios de monitoreo clínico, bioequivalencia, biodisponibilidad y farmacocinética, o para los fines requeridos.

REFERENCIAS

- 1.- Cárcamo C. E. (1982). *Introducción a la farmacocinética*. Washington D.C (USA) Departamento de asuntos científicos y tecnológicos de la secretaría general de la organización de los estados unidos de américa.
- 2.- Conn, M. P. (1991). *Principios de Farmacología*. México. El manual moderno S.A. de C.V.
- 3.- Sarfaraz, K. N. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulation: Compressed Solid Products*, 2° ed. Vol 1, USA. INFOMA.
- 4.- Pascuazzo-Lime, C. (2008). *Farmacología Básica*. Ed. Depósito del Rey.
- 5.- Flórez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, A. (2000). *Farmacología Humana*, 5°ed, México. EL SERVIER MASSON.
- 6.- Katsung, B. G., Master Susan B. y Trevor Anthony J. (2004). *Farmacología Básica y Clínica*, 11° ed. Bogotá. Ed. Mc Graw Hill.
- 7.- Rang, H. P. y Dale, M. M. (2008). *Pharmacology*, 6°ed, Churchill Livingstone El SERVIER.
- 8.- Hudgson, E. (2004). *A textbook of modern toxicology*. New Jersey (USA): WILEY-INTERSCIENCE.
- 9.- Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- 10.- Kellner, R. (2009). *Analytical Chemistry*, 2° ed, Wiley-Volt Verlag.
- 11.- Bidlingmeyer, B. A. (1992). *Practical HPLC Methodology and Applications*, USA, Wiley-Interscience Publication.
- 12.- McNair, H. M. y Esquivel, B. (1973). *Cromatografía Líquida de Alta Presición*. Washington D.C. Eva. V. Chesneau.
- 13.- Heftman, E. (1992). *Journal of Chromatography library: Fundamentals and Applications of Chromatography and related differential migration methods*. Vol 51A. 5°ed. EL SERVIER.

-
- 14.-** Taylor, P. J., Tai, C., Franklin, M. E. y Pillan, P. I. (2011). The current role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressant and antiretroviral drugs. *Clinical Biochemistry*, 44, 14–20.
- 15.-** AbuRuza. S., Millership, J. y McElnay, J. (2006). Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin. *Journal of Chromatography B*, 832, 202–207.
- 16.-** Shuijun, L., Gangyi, L., Jingying, J., Yun, L., Cheng, P., Chen, Y., Yongbao, C. y Jianying, R. (2007). Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 847, 174–181.
- 17.-** Zhang, J., Song, H., Fan-Long, B., Chun-Min, W., Gui-Yan, Y., Xiao-Yan, L., Ben-Jie, W. y Rui-Chen, G. (2010). Bioequivalence of nifedipine softgel and capsule in healthy Chinese volunteers by liquid chromatography–mass spectrometry. *European Journal Drug Metab Pharmacokinet*, 35, 67–73.
- 18.-** Yang, Z., y Wang, S. (2008). Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Journal of Immunological Methods*, 336, 98–103.
- 19.-** Aucella, F., Vincenzo, L., Vecchione, G., Tiscia, G. L. y Grandone E. (August 2013). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method as the golden standard for therapeutic drug monitoring in renal transplant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86, 123–126.
- 20.-** Adawaya, J. E. y Keevila, B. G. (2012). Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 883– 884, 33– 49.
- 21.-** Matar, K. M. (2010). Therapeutic drug monitoring of topiramate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 411, 729–734.
- 22.-** 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. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 07 de mayo de 1999.
- 23.-** Code of Federal Regulations. [Revised as of April 1, 2013]. Title 21--Food and Drugs: Chapter I--Food and Drug Administration: Subchapter D Drugs for human use: Part 320 Bioavailability and Bioequivalence Requirements. [Title 21, Volume 5]. Department of Health and Human Services. [CITE: 21CFR320]. On line in

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=320&showFR=1&subpartNode=21:5.0.1.1.7.1>

24.- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, FDA, USA, Noviembre 2005.

25.- Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency (EMA/EMEA), 21 de Julio del 2011

26.- <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01115>

27.- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4485>

28.- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=46505103>

29.- <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4330.html>

30. <http://www.iuphardb.org/DATABASE/LigandDisplayForward?tab=summary&ligandId=2514>

31.- Grooff, D., De Villiers, M. M. y Liebenberg, W. (2007). Thermal methods for evaluating polymorphic transitions in nifedipine. *Thermochimica Acta*, 454, 33–42.

32.- Aso, Y., Yoshioka, S. y Kojima, S. (2001). Feasibility of using isothermal microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous nifedipine and phenobarbital. *Thermochimica Acta*, 380, 194-204.

33.- Keymolen, B. , Ford James L., Powell Mark W. y Rajabi-Siahboomi Ali R. (2003). Investigation of the polymorphic transformations from glassy nifedipine. *Thermochimica Acta*, 397, 103–117.

34.- López, J. A., Martínez, V., Alonso, R. M. y Jiménez, R. M. (2000). High-performance liquid chromatography with amperometric detection applied to the screening of 1,4-dihydropyridines in human plasma. *Journal of Chromatography A*, 870, 105–114.

35.- Schmid, B. J., Perry, H. E. y Idle, J. R. (1988). Determination of Nifedipine and its three Principal Metabolites in Plasma and Urine by Automated Electron-Capture Capillary Gas Chromatography, *Journal of Chromatography*, 425, 107-119.

36.- Logan, B. K. (1990). Photodegradation of nifedipine relative to nitrendipine evaluated by liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 529, 175-181.

-
37. <http://www.iuphardb.org/DATABASE/LigandDisplayForward?tab=summary&ligandId=2514>
38. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/uc167?lang=es®ion=MX>
- 39.- Imai, Y., Abe, K., Sasaki, S., Nihei, M., Sekino, H. y Yoshinaga, K. (1986). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Conventional and Slow Release Forms of Nifedipine in Essential Hypertensive Patients. *Tohoku J. exp. Med.*, 148, 421-438.
- 40.- Abou-Auda, H. S., Najjar, T. A., Al-Khamis, K. I., Al-Hadiya, B. M., Ghilzai, N. M., y Al-Fawzan, N. F. (2000). Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 241–249.
- 41.- Ahmad, M., Ahmad, T., Sultan, R. A. y Murtaza, G. (October 2009). Pharmacokinetic Study of Nifedipine in Healthy Adult Male Human Volunteers. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, (5), 385-391.
- 42.- Guo, Y., Dai, J., Qian, G., Guo, N., Zheng, M. y Xing, J. G. (2007). Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. *International Journal of Pharmaceutics*, 341, 91–96.
- 43.- Niopas, I. y Daftsios, A. C. (2003). Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: Validation and application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 1213- 1218.
- 44.- Alfonso, R. G. (2003). *Remington Farmacia*. 20°ed. Buenos Aires, Argentina. Ed. Medica Panamericana.
- 45.- Roosemalen, M. C. M., Soons, P. A., Funaki, T. y Breimer, D. D. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of the polar metabolites of nifedipine in plasma, blood and urine. *Journal of Chromatography*, 565, 516-522.
- 46.- Goodman y Gilman. (2005). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Médica*. 11°ed. Mc Graw-Hill.
- 47.- Piper, H. M. et al (1984). Temperature Dependence of Nifedipine Action, *J Mol Cell Cardiol*, 16, 277-280.
- 48.- Pahm, M., Manto, A., Pedone, C., Carosella, L., Guralnik, I., Jack, M. y Carbonin, P. (1996). Age and Severe Adverse Drug Reactions Caused by Nifedipine and Verapamil. *Journal of Clinical Epidemiology*, 49 (8), 921-928.

- 49.- Pucilowski, O., Krzascik, P., Trzaskowska, E. y Kostowski, W. (1988). Different Effect of Diltiazem and Nifedipine on Some Central Actions of Ethanol in the Rat. *Alcohol*, (6), 165-168.
- 50.- Xue-Ding, W., Jia-Li, L., Yan Lu, X. C., Min, H., Balram, C. y Shu-Feng, Z. (2007). Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to a clinical herb–drug interaction study. *Journal of Chromatography B*, 852, 534–544.
- 51.- Wonnemann, M., Schug, B., Anschütz, M., Brendel, E., De Nucci, G. y Blume, H. (2008). Comparison of Two Marketed Nifedipine Modified-Release Formulations: An Exploratory Clinical Food Interaction Study, *Clinical Therapeutics*, 30, (1), 48-58.
- 52.- Lee, D. C., Greene, T., Dougherty, T. y Pearigen, P. (2000). Fatal Nifedipine Ingestions in Children. *The Journal of Emergency Medicine*, 19, (4), 359–361.
- 53.- Alcalay, J., David, M. y Sandbank, M. (1987). Cutaneous Reactions to Nifedipine. *Dermatology*, 174 (4), 191–193.
- 54.- Gibbs, N. K., Traynor, N. J., Johnson, B. E. y Ferguson, J. (1992). In vitro phototoxicity of nifedipine: sequential induction of toxic and non-toxic photoproducts with UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 13, 275-288.
- 55.- Pizarro-Urzúa, N. A. y Luis, J. N. (2005). Nifedipine and nitrendipine reactivity toward singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 175, 129–137.
- 56.- Streel, B., Zimmer, C., Sibenaler, R. y Ceccato, A. (1998). Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 720, 119–128.
- 57.- Kleinbloesem, C. H. y Harten, J. V. (1984). Liquid Chromatographic Determination of Nifedipine in Plasma and of this Main Metabolite in Urine. *Journal of Chromatography*, 308, 209-216.
- 58.- García, M. A., Soláns, C., Aramayona, J. J, Fraile, J. L., Bregante, M. A. y Castillo, J. R. (1998). A common method for the determination of several calcium channel blockers using an HPLC system with ultraviolet detection. *Talanta*, 47, 1245–1254.

-
- 59.-** Dankers, J., Van Den Elshout, J., Ahr, G., Brendel, E. y Van Der Heiden, C. (1998). Determination of nifedipine in human plasma by flow-injection tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 710, 115–120.
- 60.-** Ozaltin, N., Yardimci, C. y Suslu, I. (2002). Determination of nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 573–582.
- 61.-** Kennerly, S. P. (1989). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Plasma Nifedipine. *Journal of Chromatography*, 495, 123-130.
- 62.-** Jakobsen, P., Pedersen, O. Lederballe. y Mikkelsen, E. (1979). Gas chromatographic determination of nifedipine and one of its metabolites using electron capture detection. *Journal of Chromatography*, 162, 81-87.
- 63.-** Bretnall, A. E. y Clarke, G. S. (1995). Investigation and optimisation of the use of micelar electrokinetic chromatography for the analysis of six cardiovascular drugs. *Journal of Chromatography A*, 700, 173-178.
- 64.-** Tulasamma, P. y Venkateswarlu, P. (2012). Spectrophotometric determination of nifedipine in pharmaceutical formulations, serum and urine samples via oxidative coupling reaction. *Arabian Journal of Chemistry*.
- 65.-** Xiaofang, H., Mingzhe, Z., Qiao, J., Sicen, W. y Langchong, H. (2009). A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography–offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7081–7087.
- 66.-** Abdel, F. M. y E. Walily. (1997). Analysis of nifedipine-acebutolol hydrochloride binary combination in tablets using UV-derivative spectroscopy, capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 21-30.
- 67.-** Nakamura, I., Takahashi, M. y Izumi, H. (1999). Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nifedipine in cat plasma following improved sample treatment. *Journal of Chromatography B*, 729, 265–270.
- 68.-** Zendelovska, D., Simeska, S., Sibirnovska, O., Kostova, E., Milosevska, K., Jakovski, K., Jovanovska, E., Kikerkov, I., Trojancanec, J. y Zafirov, D. (2006). Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 839, 85–88.

-
- 69.-** Zhiling, Q. (1995). Advances in biopharmaceutical analysis in the People's Republic of China: 1991-1993. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 13, (1), pp. 1-7.
- 70.-** Phillip, R. (1983). Determination of Nifedipine in Serum or Plasma by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Clinical Chemistry*, 29, (7), 1344-1348.
- 71.-** Vertzoni, M. V., Reppas, C. y Archontaki, H. A. (2006). Sensitive and simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of nifedipine in canine plasma. *Analytica Chimica Acta* 573–574, 298–304.
- 72.-** Yritia, M., Parra, P., Iglesias, E. y Barbanoj, J. M. (2000). Quantitation of nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870, 115–119.
- 73.-** Born, J. L. y Hadley, W. M. (1989). Isotopic Sensitivity in the Microsomal Oxidation of the Dihydropyridine Calcium Entry Blocker Nifedipine. *Chemical Research Toxicology*, 2, 57-59.
- 74.-** Shamsipur, M., Hemmateenejad, B., Akhond, M., Javidnia, K. y Miri, R. (2003). A study of the photo-degradation kinetics of nifedipine by multivariate curve resolution analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 1013-1019.
- 75.-** Vertzoni, M. V., Reppas, C. y Archontaki, H. A. (2006). Sensitive and simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of nifedipine in canine plasma. *Analytica Chimica Acta*, (573–574), 298–304.