



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Química Farmacéutico Biológica

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
HPLC-UV PARA CUANTIFICAR 4-METILAMINOANTIPIRINA
(METABOLITO ACTIVO DE METAMIZOL) EN PLASMA**

TESIS
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO
BIOLÓGO**

PRESENTA:
ERICKCEN GARCÍA LUNA

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN F. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

ASESOR INTERNO:
DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2015



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.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a los compañeros del área analítica de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica (IFaB) que compartieron conmigo parte de sus amplios conocimientos y de su valioso tiempo en la capacitación que recibí para poder realizar este trabajo.

Le estoy sumamente agradecido al Mtro. Luis Jesús García, quien dirigió mi tesis por el apoyo, tiempo, conocimientos, profesionalismo y experiencia que me aportó para este trabajo, a su esposa la Mtra. Liz Janette Medina por las facilidades que me brindó para incursionar en IFaB y desarrollar este trabajo.

Gracias al Dr. Vicente Jesús Hernández Abad por su apoyo y tiempo en la revisión de este trabajo y los valiosos conocimientos y consejos que en su momento me ha brindado.

Le agradezco también a los profesores: Dr. Juan Carlos Vazquez, Dr. Elizabeth Sánchez y la M. en C. Gloria Velásquez; quienes fueron asignados como sinodales por el tiempo que se han tomado para mejorar este trabajo.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la UNAM que en conjunto de la FES Zaragoza me permitieron forjarme en sus aulas, laboratorios, bibliotecas, e instalaciones deportivas que me brindaron experiencias muy agradables y que formaran parte de toda mi vida.

Dedicatoria

“Toda dadiva y todo don perfecto es de arriba, por que desciende del Padre...”
(Santiago 1:17) es por eso que le agradezco en primer lugar a **Jehová** mi Dios a quien amo con todo mi corazón y toda mi mente y toda mi alma, es el que me dio el entendimiento y las habilidades necesarias en todo momento y nunca me ha abandonado.

En segundo lugar a mis padres Enrique y Maribel a quienes amo muchísimo y siempre han buscado darme lo mejor de si, la guía necesaria para salir adelante, sin dejar de mencionar el apoyo en todos los ámbitos para superarme, siempre les estaré agradecido ya que sin ustedes todo esto no hubiera sido posible.

A mi esposa Paty, a quien amo con todo mi corazón y siempre me ha mostrado su inigualable apoyo y ha estado dándome esa motivación de salir adelante, te agradezco por ser como eres y darme también un ejemplo a seguir no solo como profesional, también como persona con esas cualidades tan hermosas que me enamoran de ti.

Para cerrar con broche de oro agradezco mucho a mis amigos que siempre me dieron ánimos apoyo para terminar la parte académica pero sobre todo me han brindado su valiosa amistad, Noemí Ponce de León quien me incentivo a ser mejor y ha superarme, también Lesli Islas quien siempre me animo a dar hasta el último esfuerzo, Dulce Chávez que me brindo experiencia, conocimientos, ayuda y momentos divertidos en IFaB, Isabel Maciel con quien aprendí muchas cosas referentes a este trabajo y quien también me ayudo durante este trabajo en IFaB, Isabel Garcia siempre positiva y compartiéndome sus conocimientos, Juan Hidalgo dándome buenos consejos. Algunos profesores que me brindaron consejo y apoyo en la facultad como Oscar Gonzáles Moreno, Enriqueta Castrejón. Gracias a todas las personas que me han brindado un poco o mucho de si aunque el espacio no me permite ser mas detallado les estoy muy agradecido.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	3
3.2 Validación de métodos analíticos	7
3.3 Aspectos Farmacocinéticos de la Dipirona	9
3.4 Cromatógrafo y detector ultravioleta (UV)	10
3.5 Técnicas de extracción para la preparación de muestras plasmáticas	12
4. Planteamiento del problema	13
5. Objetivos	13
6. Materiales y Métodos	12
6.1 Equipos	12
6.2 Materiales	13
6.3 Métodos	14
6.4 Preparación de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma con CPDA	16
6.5 Condiciones cromatográficas	17
6.6 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma humano fresco con CPDA como anticoagulante	18
6.7 Extracción de la muestra	18
7. Resultados	24
7.1 Adecuabilidad del sistema	24
7.2 Selectividad a la matriz biológica	24
7.3 Selectividad a fármacos de uso común y concomitante	26
7.4 Acarreamiento (prueba de arrastre)	27
7.5 Curva de calibración	28
7.6 Precisión y exactitud	30
7.6.1 Repetibilidad.....	30
7.6.2 Reproducibilidad	30
7.7 Recobro (porcentaje de recuperación)	31
7.8 Reproducibilidad de la reinyección	33
7.9 Estabilidad	33
7.9.1 Estabilidad de la muestra en la matriz biológica	33
7.9.2 Estabilidad de la muestra procesada.....	34
7.9.3 Ciclos de congelación-descongelación	35
7.9.4 Estabilidad en solución	35
8. Discusión de resultados	38
9. Conclusiones	39
10. Perspectivas	40
11. Referencias	41
12. Anexos	46

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura química y biotransformación de la dipirona. MET: metamizol, MAA, AA: 4-aminoantipirina, EAA: 4-formilaminoantipirina, AAA: 4-acetilaminoantipirina.	10
Figura 2. Curvas de calibración para cuantificar MAA en plasma.	29

Índice de tablas

Tabla 1. Requerimientos para la validación métodos bioanalíticos	8
Tabla 2. Condiciones cromatográficas	17
Tabla 3. Curva de calibración y muestras Control de Calidad	18
Tabla 4. Selectividad a la matriz biológica para MAA	25
Tabla 5. Selectividad a la matriz biológica para meloxicam (E.I.)	25
Tabla 6. Selectividad a fármacos de uso común concomitantes para MAA	26
Tabla 7. Selectividad a fármacos de uso común concomitantes para meloxicam (E.I.)	26
Tabla 8. Acarreamiento para MAA	27
Tabla 9. Acarreamiento para meloxicam (E.I).	27
Tabla 10. Error relativo global de los diferentes arreglos matemáticos para cuantificar MAA en plasma	28
Tabla 11. Resultados de las curvas de calibración del método analítico para cuantificar MAA en plasma (concentración recuperada)	28
Tabla 12. Parámetros de las curvas de calibración del método analítico para cuantificar MAA en plasma	29
Tabla 13. Repetibilidad del método analítico para cuantificar MAA en plasma	30
Tabla 14. Reproducibilidad (3 días) del método analítico para cuantificar MAA en plasma para el investigador 1	31
Tabla 15. Reproducibilidad (3 días) del método analítico para cuantificar MAA en plasma para el investigador 2	31
Tabla 16. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar MAA en plasma	32
Tabla 17. Recobro absoluto de meloxicam (E.I.) en plasma	32
Tabla 18. Reproducibilidad de la reinyección	33
Tabla 19. Estabilidad de MAA en plasma	34
Tabla 20. Estabilidad de MAA en muestra procesada en automuestreador	34
Tabla 21. Estabilidad de MAA en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 25.9 horas	35
Tabla 22. Estabilidad de MAA cuatro ciclos de congelación-descongelación (-70±10 °C)	35
Tabla 23. Estabilidad de la solución estándar principal A de MAA (498.5 µg/mL) A	36
Tabla 24. Estabilidad de la solución estándar principal I de meloxicam (99.9 µg/ml)	36

Tabla 25. Resultados y dictamen de las pruebas para la validación del método analítico para cuantificar MAA en plasma con CPDA..... 37

Lista de abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
MDD	Millones de Dólares.
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
PP	Precipitación de proteínas.
CP	Estándar de Calibración a una concentración plasmática determinada.
LIC	Límite Inferior de Cuantificación.
LSC	Límite Superior de Cuantificación.
CCB	Muestras Control de Calidad Nivel Bajo.
CCBB	Muestras Control de Calidad Nivel Bajo B.
CCM	Muestras Control de Calidad Nivel Medio.
CCD	Muestras Control de Calidad Nivel Diluido.
CCA	Muestras Control de Calidad Nivel Alto.
Conc.	Concentración
MAA	4-metilamino antipirina
E.I	Estándar interno
min.	minutos
C _{max}	Concentración maxima
ng	nanogramos
pg	picogramos
µg	microgramos
mL	mililitros
h	horas

1. Resumen

Para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de patente y genéricos es necesario que la COFEPRIS otorgue un registro sanitario. Para otorgar este registro sanitario es necesario que se de evidencia de que los medicamentos genéricos en particular, cuenten con las pruebas de intercambiabilidad que se realizaron entre el medicamento de prueba y el de referencia.

Estas pruebas de intercambiabilidad o bioequivalencia deben de cumplir con los lineamientos descritos en la NOM-177-SSA1-2013. Esta norma establece que antes de iniciar el análisis de las muestras durante un estudio de bioequivalencia se debe contar con la validación completa del método analítico como es el caso del estudio de bioequivalencia de la dipirona fármaco de interés para el presente proyecto.

La dipirona o metamizol, es un profármaco que después de su administración oral es hidrolizado en el intestino a 4-metilaminoantipirina o MAA.

Se utilizó un cromatografo de líquidos de alta resolución con un detector UV con el objetivo de realizar la determinación y cuantificación de MAA y se lograron obtener los resultados de las pruebas exigidas por la normatividad vigente los cuales cumplen y ademas el método optimizado puede ser utilizado para su aplicación en estudios de bioequivalencia.

2. Introducción

Para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de patente y genéricos es necesario que la COFEPRIS otorgue un registro sanitario. Esta entidad establece los criterios para llevar a cabo el registro de los medicamentos, mismo que permitirá su comercialización en el territorio mexicano. Para otorgar este registro sanitario es necesario que se demuestre evidencia de que los medicamentos genéricos en particular, cuenten con las pruebas de intercambiabilidad que se realizaron entre el medicamento de prueba y el de referencia.

Un medicamento genérico, según lo establecido por la Ley General de Salud, es aquel que se vende bajo la denominación del ingrediente activo que incorpora, siendo bioequivalente a un medicamento de referencia si la biodisponibilidad es estadísticamente semejante entre sí, después de administrar una misma forma farmacéutica, ingrediente activo, y tipo de sal y dosis.

Estas pruebas de intercambiabilidad o bioequivalencia deben de cumplir con los lineamientos descritos en la NOM-177-SSA1-2013. Esta norma establece que antes de iniciar el análisis de las muestras durante un estudio de bioequivalencia se debe contar con la validación completa del método analítico como es el caso del estudio de bioequivalencia de la dipirona.

La dipirona o metamizol, es un profármaco que después de su administración oral es hidrolizado en el intestino a 4-metilaminoantipirina o MAA (su metabolito principal) y este ejerce la acción terapéutica, el metamizol es utilizado como un analgésico efectivo, antipirético y antiinflamatorio.

Durante este trabajo se utilizó un cromatografo de líquidos de alta resolución con un detector UV con el objetivo de realizar la determinación y cuantificación de MAA.

3. Marco Teórico

3.1 Marco Regulatorio.

La declaración Universal de los Derechos Humanos (1948) establece en su artículo 25, que toda persona tiene derecho a un nivel de vida adecuado que le asegure, así como a su familia, la salud y el bienestar, en especial la alimentación, el vestido, la vivienda, la asistencia médica y los servicios sociales necesarios, entre otros¹.

De acuerdo con la OMS, el derecho a la salud significa que los gobiernos deben crear las condiciones que permitan a todas las personas vivir lo más saludablemente posible. Esas condiciones incluyen la disponibilidad garantizada de servicios de salud. Para aclarar y hacer efectivas estas medidas el Comité de Derechos Económicos, Sociales y Culturales de las Naciones Unidas, que supervisa el cumplimiento del Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales, adoptó en 2000 una Observación general sobre el derecho a la salud.

Según la Observación general, el derecho a la salud abarca cuatro elementos:

1. Disponibilidad. Se deberá contar con un número suficiente de establecimientos, bienes y servicios públicos de salud, así como de programas de salud.
2. Accesibilidad. Los establecimientos, bienes y servicios de salud deben ser accesibles a todos. La accesibilidad presenta cuatro dimensiones superpuestas:
 - no discriminación;
 - accesibilidad física;
 - accesibilidad económica (asequibilidad);
 - acceso a la información.

3. Aceptabilidad. Todos los establecimientos, bienes y servicios de salud deberán ser respetuosos de la ética médica y culturalmente apropiados, a la par que sensibles a los requisitos del género y el ciclo de vida.
4. Calidad. Los establecimientos, bienes y servicios de salud deberán ser apropiados desde el punto de vista científico y médico y ser de buena calidad².

En México, el derecho a la salud es una garantía constitucional declarada en el tercer párrafo del artículo 4, y debe ser ejercido con base en los principios de la igualdad y no discriminación³. Fue elevado a rango constitucional en febrero de 1983: “Toda persona tiene derecho a la protección de la salud. La ley definirá las bases y modalidades para el acceso a los servicios de la salud y establecerá la concurrencia de la federación y las entidades federativas en materia de salubridad general, conforme a lo que dispone la fracción XVI del artículo 73 de esta constitución”, este artículo es reglamentado a través de la Ley General de Salud⁴.

La salud es un tema fundamental en la política pública no solo del país sino del mundo entero, ya que a pesar de los esfuerzos que se hacen en la materia, persisten retos de gran importancia que impiden garantizar el derecho de todos y todas a la salud. Por parte del sector salud, está presente el tema del desabasto, en el país sobresale la falta de cobertura total de medicamentos.

Ante estos retos un sector importante se está enfrentando diariamente invirtiendo recursos materiales y humanos para desarrollar u optimizar productos, hablamos de la Industria Farmacéutica, que se mantiene debatiendo entre las patentes y la propiedad intelectual, condiciones para la competitividad y el marco regulatorio nacional e internacional.

En México (2012) hay un consumo de 13,663 MDD en medicamentos, de acuerdo con la OECD. El gasto farmacéutico coloca en penúltimo lugar a México (32 de 33) de los países de la OECD el gasto equivale al 6.8%, el cual está por debajo del

promedio de los países de la OECD (15.9%), El gasto público deja a México en antepenúltimo lugar con el 50.6% comparado con los demás países que en promedio gastan un 72.3%, esto contrasta con los pagos por cuenta propia para el cuidado de la salud, en dicho rubro México ocupa el primer lugar con un 45.2%, siendo que en promedio los demás países de la OECD gastan un 19%, esto indica que en México existe un serio problema en desabasto de medicamentos por parte del sector salud y la constante necesidad que tiene la población de satisfacer con un derecho universal como es el de la salud⁴.

Establecidos estos puntos, el gobierno mexicano debe de permitir que en el sector salud predomine la inversión farmacéutica y aunado a ello se debe comprender la estrecha relación que guarda la industria farmacéutica con la economía y la salud. El gasto per cápita en México es menor que el de los demás países de la OECD siendo este de 1048 \$ comparado con el promedio que es de 3484 \$ (E.E.UU \$ PPP). Lo anterior parece estar asociado con una combinación de un bajo nivel de consumo per cápita y altos precios de los medicamentos, el gasto público en medicamentos aumentó en un 63% entre 2005 y 2010.

El hecho de que los precios de los medicamentos en México son excepcionalmente altos, se debe en parte a la débil competencia en el sector farmacéutico. Éste es un problema para la salud y las finanzas públicas. El aumento de la transparencia en los procedimientos de adquisiciones públicas es clave para fortalecer la competencia en el sector farmacéutico. El Instituto Mexicano del Seguro Social, la Comisión Federal de Competencia y la OECD acordaron colaborar para fomentar este cambio. A partir de 2011, el IMSS realiza todas sus compras, incluyendo las de medicamentos, por medio de subastas en reversa, que limitarán en gran medida el margen para la corrupción y reducen las posibilidades de colusión entre empresas farmacéuticas. La competencia en este sector también podría fortalecerse al simplificar las estrictas restricciones para la venta de medicamentos genéricos. El gobierno está inmerso en una serie de esfuerzos en este sentido, con el propósito de dejar sólo a los genéricos que

cumplan con los requisitos de bioequivalencia, la realización de campañas informativas y de promoción para fomentar la prescripción y el uso adecuado de los medicamentos genéricos, y una revisión del marco conceptual de la propiedad intelectual para detectar renglones de posible mejoría^{4,5}.

Para que un medicamento pueda ser comercializado en territorio mexicano debe de contar el registro sanitario, para ello es necesario cumplir con el siguiente marco legal:

- a) Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.
- b) Ley General de Salud.
- c) Ley Federal de Procesos Administrativos.
- d) Ley Federal de Derechos.
- e) Reglamento de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios.
- f) Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
- g) Reglamento de Insumos para la Salud.
- h) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Edición reciente.
- i) Normas Oficiales Mexicanas (Las más importantes).
 - Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, 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 de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2013, Buenas prácticas de

fabricación para fármacos.

- Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y operación de la farmacovigilancia.

j) Registro ante COFEPRIS^{6,7}.

De este hecho se concluye la importancia de tener un método analítico validado para el análisis de muestras biológicas antes de iniciar un estudio de bioequivalencia, lo anterior con la finalidad de garantizar la calidad de los resultados obtenidos en términos de concentración plasmática, que derivará en un comparativo estadístico de los perfiles farmacocinéticos y posterior registro del producto ante un cumplimiento de los requisitos establecidos por ley.

3.2 Validación de métodos analíticos

Como se ha demostrado, esta es una parte fundamental durante el desarrollo de la investigación, ya que esta serie de pruebas y análisis, permite que el investigador determine si el método en cuestión cumple con los propósitos para los que fue diseñado.

En este contexto se considera, la validación de un método analítico como el proceso por el cual queda establecido, por los estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

En el ámbito internacional la validación de un método bioanalítico está sustentada por distintas organizaciones, como lo son la FDA, ANVISA EMA etc., de las cuales podemos observar muchas similitudes con la NOM-177-SSA1-2013, ya que en se evalúan aspectos como la selectividad, acarreamiento, límite inferior de cuantificación, curva de calibración, precisión, exactitud, efecto matriz, estabilidad (Tabla 1)⁸⁻¹⁷.

Tabla 1. Requerimientos para la validación métodos bioanalíticos				
Parámetros	FDA	EMA	ANVISA	NOM-177
Selectividad	√	√	√	√
Acarreamiento		√	√	√
Especificidad				
Sensibilidad	√			
Exactitud	√	√	√	√
Precisión	√	√	√	√
Curva de calibración	√	√	√	√
Recobro	√			
Límite mas bajo de cuantificación	√	√		√
Integridad de la dilución		√		
Efecto matriz		√	√	√
Estabilidad	√	√	√	√

La validación de métodos bioanalíticos y el análisis de muestras para estudio para pruebas en humanos deben de estar diseñadas siguiendo las Buenas Prácticas Clínicas (GCP)⁸.

Estas medidas permiten un importante paso a favor de la salud pública ya que al tener medicamentos que demuestran que cumplen con los rubros expedidos por la

autoridad sanitaria:

- Dan certeza al consumidor y profesionales de la salud sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos que se comercializan en el país.
- En el caso de los medicamentos, se impulsa el mercado de los productos genéricos a través de la homologación de las condiciones para adquirir un registro sanitario.
- Existe una mayor competitividad en el sector farmacéutico, lo cual permite medicamentos de calidad a menor costo y de mayor acceso a la población de escasos recursos, beneficiando incluso a los hospitales del sector público, dado el problema del desabasto que se genera por el alto costo de los medicamentos⁷.

3.3 Aspectos Farmacocinéticos de la Dipirona.

La Dipirona o metamizol, es un profármaco que después de su administración oral es hidrolizado¹⁸ en el intestino a MAA (metabolito principal), este ejerce la acción terapéutica. El metamizol es utilizado como un analgésico efectivo, antipirético y antiinflamatorio. Después de su administración oral la MAA es casi completamente absorbida alcanzando su nivel máximo entre 1-2 h, permitiendo ser detectada en sangre. La MAA es metabolizada a 4-formilaminoantipirina y 4-aminoantipirina, esta última es acetilada a 4-acetilaminoantipirina (ver figura 1), después de administración vía oral de una tableta de 480 mg se alcanza una $C_{max} = 13.4 \pm 1.8$ $\mu\text{g/mL}$ entre 30 y 120 min, presenta una absorción rápida y una baja unión a proteínas plasmáticas que depende principalmente de la concentración de sus metabolitos, la MAA se une en un 57.6 % a proteínas^{19,20}, esta mayor afinidad se debe a la liposolubilidad de MAA. La vida media de eliminación de MAA después de la administración de una dosis única vía oral es de 2.7 h²¹⁻²³.

El metamizol es un analgésico no narcótico que ejerce acciones analgésica, antipirética, antiinflamatoria y antiespasmódica, obteniéndose el efecto analgésico máximo después de la primera hora de la administración²⁵⁻²⁹. Se ha demostrado

que la MAA es inhibidora de la síntesis de prostaglandinas en forma clara y persistente^{20,24,29,30}. La Dipirona es un fármaco de uso común en México empleado como analgésico, antipirético y antiinflamatorio, se encuentra dentro de los principales 10 analgésicos que consumen los mexicanos^{31,33,36,37}.

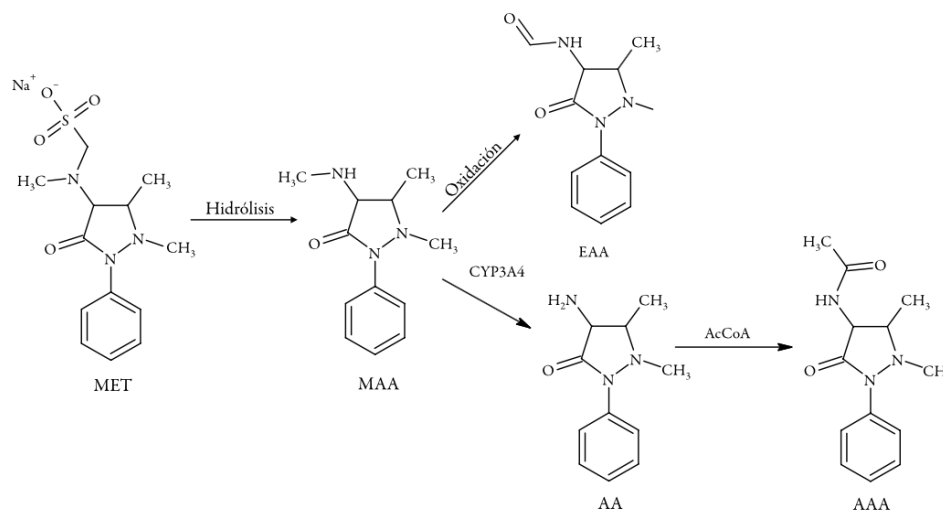


Figura 1 Estructura química y biotransformación de la dipirona. MET: metamizol, MAA, AA: 4-aminoantipirina, EAA: 4-formilaminoantipirina, AAA: 4-acetilaminoantipirina. (Tomado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v43n1/v43n1a12.pdf>).

3.4 Cromatógrafo y detector ultravioleta (UV)

En este trabajo se emplea la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector UV como el método idóneo para la determinación y cuantificación de MAA.

HPLC es una técnica basada en la interacción de un soluto con dos fases, una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se logra por procesos de reparto, adsorción o intercambio iónico, afinidad, hidrofobicidad, acomplejación (entre otros), según la fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente empleadas son la sílice modificada, y las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando cadenas alifáticas o aromáticas³².

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes.

Las columnas cromatográficas pueden ser de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento y poliméricas rellenas con fase estacionaria. La longitud y diámetro interno de la columna afectan la separación^{33,34,35}.

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.

Un detector en HPLC es un instrumento que permite medir la concentración (o la masa) de los analitos que eluyen monitoreando alguna de sus propiedades tales como la absorbancia UV. Un detector puede ser universal para todos los analitos o específico para particulares especies de analitos, los detectores UV/visible son específicos para especies cromóforas UV y tienen una sensibilidad de ng e incluso pg.

El detector de UV/visible monitorea la absorción de luz ultravioleta o luz visible en eluyente del HPLC, es considerado el más versátil, económico y sensible para muchos analitos de interés.

Un detector de UV/visible consiste de: dos lámparas de deuterio, monocromador y una pequeña celda de flujo. El monocromador consiste de una rejilla móvil o de un prisma que permite la elección de una longitud de onda específica para que pase a través de la abertura de salida y se obtiene un diseño de doble haz, aquí la fuente de luz es dividida entre la muestra y el haz de referencia y la intensidad de cada haz es monitoreada por un fotodiodo, solamente el haz³⁸.

El principio para la absorción por UV/visible es la ley de Lambert y Beer: “la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración”, tomando en cuenta que no e cambie la celda de flujo.

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Donde:

A= Absorbancia

ϵ = Absortividad molar

b= Longitud de la trayectoria

c= Concentración³⁹

3.5 Técnicas de extracción para la preparación de muestras plasmáticas

La preparación de muestras plasmáticas permite eliminar interferencias causadas por las proteínas u otros componentes de la muestra biológica antes de su inyección al cromatógrafo. De esta “limpieza” de las muestras depende la confiabilidad de los resultados que se obtienen al inyectar al equipo cromatográfico. Para una correcta elección el método de extracción debe de considerarse la posible cantidad de muestras biológicas que pueden llegar a procesarse durante un estudio de bioequivalencia, el tiempo que este proceso implica y el gasto en materiales y reactivos derivados del proceso.

También es importante buscar que la técnica elegida se mantenga consistente durante la corrida analítica y permita mantener la sensibilidad, selectividad y el rendimiento del equipo. Existen por lo menos cuatro técnicas para la preparación de muestras plasmáticas las cuales son:

- 1) Diluir e inyectar
- 2) Extracción líquido-líquido
- 3) Precipitación de proteínas
- 4) Extracción sólido-líquido

La técnica de extracción elegida para MAA es la de precipitación de proteínas. La PP tiene como objetivo la eliminación de proteínas de las muestras de plasma,

esto se logra mediante la adición de un disolvente orgánico y el precipitado resultante se elimina por centrifugación o filtración⁴⁰.

Ventajas:

- Eliminación eficaz de proteínas.
- Alto rendimiento y fácil automatización.
- Se aplica a todo tipo de plasma.

Limitaciones:

- Las sales y los lípidos no se eliminan.
- Contaminación de columna e instrumento.

4. Planteamiento del problema

Se requiere de la validación de un método bioanalítico con la sensibilidad suficiente para caracterizar un perfil farmacocinético de MAA (metabolito principal de metamizol/dipirona) en plasma con CPDA como anticoagulante, en consecuencia se permitirá el cumplimiento de un rubro importante ante la autoridad sanitaria para poder llevar a cabo un estudio de bioequivalencia^{40,41}.

Para ello es necesario evaluar si las condiciones cromatográficas propuestas en el presente proyecto son las adecuadas y en caso contrario determinar las condiciones óptimas.

5. Objetivos

- Optimizar la técnica de extracción para mejorar la economía en la aplicación del método bioanalítico.
- Validar un método analítico por HPLC acoplado a un detector ultravioleta, para cuantificar MAA (metabolito activo de metamizol) en plasma con CPDA como anticoagulante.
- Evaluar el desempeño del método analítico en cumplimiento a la regulación

nacional e internacional en la materia (NOM-177-SSA1-2013, ANVISA, RESOLUÇÃO - RDC No 27).

-

6. Materiales y Métodos

6.1 Equipos

- HPLC

Componente	Marca	Modelo	Número de serie
Módulo de separaciones	WATERS	2690D	A99SM8085N
Detector de UV-VIS	WATERS	486	MX4MM7122M

- Balanza analítica marca Ohaus, modelo EP214C, No. de serie 1239 1125333712P.
- Balanza analítica marca Ohaus, modelo EP21AC, No. de serie K2191127243741.
- Balanza Granataria marca Ohaus , modelo Adventurer PRO, No. de serie 8027491132.
- Agitador Vortex Marca Scientific Industries, modelo G560, Numero de serie 2-411483.
- Agitador vórtex multi-tubo marca VWR, Modelo 945063, No. de serie 101104004.
- Agitador vórtex multi-tubo marca VWR, Modelo DVX-2500, No. de serie 120723001.
- Ultra congelador marca REVCO, modelo ULT2186-5-A40, No. de serie Z01R-2358885-ZR.
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf, Modelo Multipette plus, No. de serie 3888379.
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 µL marca Hirschmann Laborgeräte, Modelo Labopette, No. de serie 6097032.

- Micropipeta de volumen de volumen fijo de 200 μL marca Hirschmann Laborgeräte, Modelo Labopette, No. de serie 6051859.
- Micropipeta de volumen variable de 10-100 μL marca Eppendorf, Modelo Research plus, No. de serie 415038^a.
- Refrigerador marca Tor Rey, modelo R-16, No de serie 106-0983.
- Centrifuga marca Hettich, modelo Rotanta 460, No. de serie 0000291-04-01.
- Centrifuga marca Hettich, modelo Rotanta 460, No. de serie 0000292-04-01.
- Centrifuga marca Hettich, modelo Rotanta 460R, No. de serie 0000300-04-01.
- Centrifuga marca Hettich, modelo Rotanta No. de serie 126.
- Potenciómetro marca Thermo Scientific, modelo ORION STAR A221, No. de serie X03816.
- Baño de ultrasonido marca Crest ultrasonics, modelo 1875TA, No. de serie 18TS0417B.

6.2 Materiales

- Matraces volumétricos clase A: 10, 20, 25, 50, 500, 1000 y 2000 mL.
- Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL.
- Puntas para pipeta repetidora.
- Viales para automuestreador de 2mL.
- Insertos de polipropileno de 200 μL .
- Pipetas pasteur.
- Vasos de precipitados de vidrio: 100, 250 y 1000 mL.
- Vasos de polipropileno: 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Gradillas.
- Microtubos de 2 mL.
- Puntas para micropipeta 100-1000 μL .
- Puntas para micropipeta 200 μL .

- Espátula.
- Charola para pesar.
- Guantes de nitrilo.
- Guantes de vinil.

Sustancias de referencia

- MAA Sustancia de Referencia Primaria, FEUM, lote 140296, potencia 99.7%.
- Meloxicam (EI) sustancia de Referencia Primaria, USP, lote H0J100, potencia 99.9%.

Reactivos y disolventes

- Agua grado cromatográfico, (H₂O, HPLC), CAS AH365-4 Honeywell.
- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (C₂H₃N, HPLC), CAS 75-05-8, J.T.Baker.
- Metanol grado cromatográfico (HPLC), (MeOH),(CH₃OH) CAS 67-56-1, J.T.Baker.
- Acetato de sodio trihidratado grado reactivo (CH₃COONa3H₂O) CAS 6131-90-4, J.T. Baker.
- Ácido acético glacial (CH₃COOH), grado reactivo, CAS 64-19-7, J.T.Baker.

6.3 Métodos

Preparación de soluciones:

- Solución amortiguadora de acetato de sodio trihidratado 10 mM pH 5.5 en agua grado cromatográfico (componente acuoso de la fase móvil). Se pesó 1.36 g de acetato de sodio trihidratado y se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L, se disolvió y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico. Se ajustó a pH de 5.5 con ácido acético glacial concentrado. Se filtró y desgasificó en baño de ultrasonido durante 15 min.

- Disolvente acetonitrilo grado cromatográfico (componente orgánico de la fase móvil). Se transfirió 1 L de ACN grado cromatográfico a un frasco con tapón de rosca de 1 L. Se filtró y desgasificó en baño ultrasónico durante 15 min.
- Solución de lavado; metanol grado cromatográfico: agua grado cromatográfico (80:20 v/v). Se midió en una probeta graduada 100 mL de agua grado cromatográfico y 400 mL de metanol grado cromatográfico y se transfirió a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 500 mL y se mezcló homogéneamente.
- Solución reactivo 1: agua grado cromatográfico: ACN grado cromatográfico 33:67 v/v. Se transfirieron 33 mL agua grado cromatográfico a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico y se mezcló homogéneamente.
- Solución reactivo 2: agua grado cromatográfico:metanol grado cromatográfico 50:50 v/v. Se transfirió cuantitativamente 100 mL de agua grado cromatográfico a un matraz de 200 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico y se mezcló homogéneamente.
- Solución estándar principal de MAA (500µg/mL) Solución A. Se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de sustancia de referencia de 4-metilaminoantipirina y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico: metanol grado cromatográfico 50:50 v/v
- Solución estándar de trabajo de 4 MAA (50 µg/mL) Solución B. Se transfirió cuantitativamente 2 mL de solución A (500 µg/mL) de MAA a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico: metanol grado cromatográfico 50:50 v/v
- Solución estándar principal de meloxicam E.I. (100 µg/mL) solución 1. Se pesó el equivalente a 2 mg de muestra de referencia de meloxicam (E.I) y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, se disolvió y llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- Solución para la adecuabilidad del sistema (MAA 3.125 µg/mL, Meloxicam E.I. 5 µg/mL) solución AD1. Se transfirió cuantitativamente 0.125 mL de la solución A (500 µg/mL) de MAA y 1 mL de la solución I (100 µg/mL) de meloxicam (E.I.) a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con agua:ACN 33:67 v/v. Se transfirió la solución en alícuotas de 1 mL en microtubos de 2 mL y almacenarlas a -70 ± 10 °C. Se descongeló un tubo cada día de trabajo a temperatura ambiente.

6.4 Preparación de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma con CPDA.

- Se prepararon cada uno de los estándares de la curva de calibración y las muestras control de calidad en sistema. Posteriormente se tomó una alícuota de 50 µL y se adicionaron 950 µL de plasma humano fresco con CPDA como anticoagulante en microtubos de 2 mL tal y como se muestra en la tabla 3.
- Se agitó en vortex multitubo por un minuto a 2500 rpm.
- Se procesaron cada una de las muestras tal y como se describe en el inciso 5.7 Extracción de la muestra.

6.5 Condiciones cromatográficas

Después de revisar la bibliografía sobre la cuantificación de MAA por HPLC^{30,42-49} y sus propiedades fisicoquímicas en conjunto con el estándar interno⁵⁰⁻⁵² (MAA pKa calculado de 1.26 y -4.36, log P 0.77 y Meloxicam pKa 4.47, log P 2.28), se estableció la siguiente configuración de análisis cromatográfico.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas	
Cromatógrafo	WATERS 2690D
Detector UV	WATERS 486
Columna	Polaris C18 A 4,6 x 150mm 5µm
Longitud de onda nm(λ)	254
Fase móvil	Solución amortiguadora de acetato de sodio trihidratado en agua grado cromatográfico; acetonitrilo: 78:22 v/v
pH de la fase móvil	5.5
Fase de lavado	Metanol grado cromatográfico:agua grado cromatográfico (80:20 v/v)
Velocidad de flujo (mL/min)	1.2
Volumen de inyección (µL)	10
Temperatura de la columna (°C)	35
Temperatura del automuestreador (°C)	15
Tiempo de retención aproximado (min)	4-metilaminoantipirina 3.7 Meloxicam (E.I): 7.4
Tiempo de analisis de la muestra (min)	9.5

6.6 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma humano fresco con CPDA como anticoagulante.

Tabla 3. Curva de calibración y muestras Control de Calidad							
MAA Solución B (50 µg/mL)	MAA Solución A (500µg/mL)	Volumen de metanol: agua 50:50 v/v (µL)	Conc. en sistema MAA (µg/mL)	Alicuota de muestra en Sistema (µg/mL)	Volumen en plasma (µL)	Conc. en plasma (µg/mL)	Nivel
80	-----	920	4.0	50	950	0.200	CP1 ó LIC
160	-----	840	8.0	50	950	0.400	CP2
240	-----	760	12.0	50	950	0.600	CCB
300	-----	700	15.0	50	950	0.750	CP3
400	-----	600	20.0	50	950	1.000	CP4
600	-----	400	30.0	50	950	1.500	CCBB
-----	100	900	50.0	50	950	2.500	CP5
-----	200	800	100.0	50	950	5.000	CP6
-----	350	650	175.0	50	950	8.750	CCM
-----	450	550	225.0	50	950	11.250	CP7
-----	550	450	275.0	50	950	13.750	CP8
-----	600	400	300.0	50	950	15.000	CCA
-----	700	300	350.0	50	950	17.500	CP9
-----	800	200	400.0	50	950	20.000	CP10 ó LSC
-----	1000	0	500.0	50	950	25.000	CCD

La evaluación de la muestra CCBB tiene el propósito de ser empleada durante el estudio de análisis de muestras de voluntarios de tal manera que existan al menos dos concentraciones de muestras control de calidad por debajo de la concentración máxima esperada de MAA (metabolito activo de metamizol).

6.7 Extracción de la muestra

La cuantificación de MAA se realiza haciendo uso de las condiciones cromatográficas antes mencionadas y se utiliza el método de extracción que se describe a continuación.

- Blanco de reactivos: Se transfirieron 200 μL a vial con inserto de acetonitrilo grado cromatográfico al 100 % y se inyectó 10 μL al sistema cromatográfico.
 - Doble blanco: Se colocaron 200 μL de una mezcla de plasmas (mínimo 6 folios) libre de analito en microtubo de 2 mL y se procedió como se describe en el punto “b”.
 - Blanco: Se colocaron 200 μL de una mezcla de plasmas (mínimo 6 folios) libre de analito en microtubo de 2 mL y se procedio como se describe en el punto “a”.
 - Muestras de curva de calibración y control de calidad (Tabla 3): Se prepararon las muestras plasmáticas de acuerdo al inciso 5.6 y se colocaron 200 μL de muestra plasmática en microtubo de 2 mL, y se procedió como se describe en el punto “a”.
- a. Se agregaron 30 μL de la solución I (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de meloxicam (E.I).
 - b. Se adicionaron 400 μL de la solución de ACN grado cromatográfico al 100%.
 - c. Se agitó en vortex multi-tubo durante 1 min a 2500 rpm.
 - d. Se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min a temperatura de 4 °C.
 - e. Se transfirió el sobrenadante a viales con inserto e inyectar 10 μL al sistema cromatográfico.

6.8 Pruebas para la validación del método analítico para cuantificar MAA en plasma con CPDA.

- Adecuabilidad del sistema: Durante todas las corridas analíticas de la validación se evaluó la adecuabilidad del sistema mediante inyecciones

consecutivas de una solución que contenía 3.125 µg/mL de MAA y 5 µg/mL de meloxicam (E.I.).

- Selectividad a la matriz biológica: La selectividad del método fue determinada analizando seis fuentes individuales de plasma con CPDA como anticoagulante (F-1845, F-1846, F-1847, F-1848, F-1849, F-1850) una fuente de plasma hemolizado (F-1689) y una fuente de plasma lipémico (F-1693) evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de MAA y meloxicam (E.I.). Los resultados fueron comparados con la respuesta promedio de cinco réplicas de muestras preparadas del LIC (límite inferior de cuantificación).
- Selectividad a fármacos de uso común y concomitante: Se evaluó la selectividad del método a fármacos de uso común contra posibles interferencias en el tiempo de retención de MAA y meloxicam (E.I) analizando muestras doble blanco adicionadas de soluciones preparadas a concentraciones reportadas de los siguientes analitos: paracetamol (20 µg/mL), naproxeno (50 µg/mL), ácido salicílico (300 µg/mL), cafeína (4 µg/mL) y nicotina (50 ng/mL). Los resultados fueron comparados con la respuesta promedio de cinco réplicas de muestras preparadas del LIC (límite inferior de cuantificación).
- Acarreamiento (Prueba de arrastre): Para evaluar la prueba de acarreamiento se realizaron tres inyecciones de una muestra doble blanco siendo una antes y dos después de una muestra a una concentración equivalente al LSC .Los resultados fueron comparados respecto a la respuesta de cinco réplicas de muestras preparadas a la concentración del LIC.
- Curva de calibración: Se prepararon y procesaron tres curvas de calibración incluyendo una muestra doble blanco y una muestra blanco para cada

curva de calibración. Cada nivel de concentración fue procesado a partir de la misma muestra o dilución (ver Figura 2).

Para cada curva de calibración se calculó el error relativo global ($\sum ER\%$) de tres ponderaciones diferentes y adicionales al arreglo matemático más simple (sin ponderación), se eligió el que mejor representó la relación analítica del instrumento con respecto a las concentraciones conocidas de MAA en la calibración.

Con las curvas de calibración de recién preparación se realizó la interpolación de las concentraciones en las distintas evaluaciones durante la validación del método analítico.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en la curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ajuste $1/x^2$ donde la variable “y” es la respuesta analítica (relación de áreas de MAA/meloxicam (E.I.)) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de MAA.

- Precisión y exactitud.
 - Repetibilidad: Se preparó, procesó y analizó en el mismo día de trabajo cinco réplicas a concentraciones diferentes de MAA: LIC, CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD Para evaluar la precisión y exactitud intradía (repetibilidad) de las muestras control de calidad diluidas se preparó una muestra a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. De la cual se tomó únicamente 100 μL de muestra y se completó el volumen a 200 μL con matriz biológica libre de fármaco. Por lo cual, se considera un factor de dilución de 2, para poder ser utilizado durante el análisis de muestras de voluntarios.

- Reproducibilidad: Se prepararon y analizaron cinco réplicas a concentraciones diferentes de MAA: LIC, CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD en tres días de trabajo, provenientes de diferentes soluciones estándar principales o de una misma solución (en caso de haberse demostrado estabilidad previamente). Para evaluar la precisión y exactitud interdía (reproducibilidad) de las muestras control diluidas se preparó una muestra a una concentración de 25 µg /mL. De la cual se tomó únicamente 100 µL de muestra y se completó el volumen a 200 µL con matriz biológica libre de fármaco. Por lo cual, se considera un factor de dilución de 2, para poder ser utilizado durante el análisis de muestras de voluntarios.
- Recobro (porcentaje de recuperación): El recobro fue definido como el cociente de la respuesta de MAA (área de MAA obtenida después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico), entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (se inyectaron cinco replicas).
- Reproducibilidad de la reinyección: La evaluación de la reproducibilidad de la reinyección se llevó a cabo reinyectando una curva de calibración y muestras control de calidad (CCB, CCM y CCA) por quintuplicado después de permanecer en el automuestreador (15 °C) al menos durante un tiempo equivalente a la duración de una corrida analítica durante en el análisis de muestras de voluntario, el tiempo de estabilidad comprobado fue de 32.8 horas.
- Estabilidad: La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, entre otros, en las que el fármaco permanece estable, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico.

Para lo cual se evalúa la concentración recuperada del compuesto por analizar en muestras CCB y CCA preparadas por triplicado y habiendo sido sometidas a las distintas condiciones de almacenamiento por un tiempo igual o mayor al que serán sometidas las muestras del estudio en cuestión. Las muestras control de calidad fueron interpoladas en todos los casos en una curva de calibración de reciente preparación.

- ✓ Estabilidad en el instrumento/automuestreador: Para evaluar la estabilidad de MAA en la muestra procesada en el automuestreador (15 °C), se prepararon muestras control de calidad por triplicado conteniendo MAA en plasma a dos niveles de concentración (CCB y CCA) las cuales fueron procesadas y almacenadas en la condición indicada previamente.
- ✓ Estabilidad en refrigeración: Para evaluar la estabilidad de MAA en la muestra procesada en refrigeración 2-8 °C, se prepararon muestras control de calidad por triplicado conteniendo MAA en plasma a dos niveles de concentración (CCB y CCA) las cuales fueron procesadas y almacenadas en la condición indicada previamente.
- ✓ Ciclos de congelación-descongelación: Para evaluar la estabilidad de MAA a ciclos de congelación-descongelación, se prepararon muestras control de calidad por triplicado conteniendo MAA en plasma a dos niveles de concentración (CCB y CCA) las cuales fueron almacenadas en congelación -70 ± 10 °C y sometidas a cuatro ciclos de congelación-descongelación, con un periodo mínimo de 12 horas entre cada ciclo. Una vez sometidas las muestras al cuarto ciclo de congelación-descongelación fueron procesadas e inyectadas al sistema cromatográfico.
- ✓ Estabilidad en solución: Para evaluar la estabilidad de la solución estándar principal A (500 µg/mL) y la solución estándar de trabajo B (50 µg/mL) de MAA , así como la solución estándar principal I (100 µg/mL) de meloxicam (E.I.) se prepararon las diluciones que a continuación se indican a partir de las soluciones estándar principal y

de trabajo para MAA y de la solución estándar principal de meloxicam (E.I.) de reciente preparación y de aquellas que fueron almacenadas en refrigeración (2-8°C), temperatura ambiente (15-30 °C) y congelación (-70 ± 10 °C).

Las soluciones se prepararon conforme a lo establecido en el apartado 5.3. Los valores promedio de la respuesta analítica del instrumento provenientes de las soluciones de estabilidad, se comprobaron con los valores promedio de las obtenidas con las soluciones recién preparadas de MAA.

7. Resultados

7.1 Adecuabilidad del sistema

En las corridas analíticas se demostró que los parámetros fundamentales en cromatografía establecidos (ensayo para idoneidad del sistema) no excedieron los límites establecidos en el protocolo de validación para la adecuabilidad del sistema, es decir, coeficiente de variación obtenido para la respuesta no mayor al 2%, resolución ≥ 1.5 , simetría de pico ≤ 2.0 , k' con valores mayores de una unidad y menores a 10 unidades y el valor promedio de los platos teóricos ≥ 2000 (ver anexo 1 figura 1).

7.2 Selectividad a la matriz biológica

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados de la prueba de selectividad a la matriz biológica para MAA y meloxicam (E.I.), respectivamente en donde se puede observar que las interferencias próximas al tiempo de retención de MAA fueron menores al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno (ver anexo 1 Figuras 2-10).

Tabla 4. Selectividad a la matriz biológica para MAA					
Límite inferior de cuantificación		Folios individuales, plasma hemolizado y plasma lipémico		%	DICTÁMEN CUMPLE (SI/NO)
Muestra	Respuesta Meloxicam (E.I.)	Muestra	Respuesta MAA		
74_V2_MAA_S2_LICR_1	1263.500	74_V2_MAA_S2_FR_1845	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_2	1440.000	74_V2_MAA_S2_FR_1846	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_3	1151.000	74_V2_MAA_S2_FR_1847	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_4	1125.500	74_V2_MAA_S2_FR_1848	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_5	1193.000	74_V2_MAA_S2_FR_1849	0.000	0.000	SI
Promedio	1234.600	74_V2_MAA_S2_FR_1850	0.000	0.000	SI
		74_V12_MAA_S2_HR_1689	0.000	0.000	SI
		74_V2_MAA_S2_LR_1693	0.000	0.000	SI

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del LIC , (S2) Selectividad a la matriz biológica, (F) Folio de plasma, (H) Plasma hemolizado (R) Reinyección de la muestra

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

Tabla 5. Selectividad a la matriz biológica para meloxicam (E.I.)					
Límite inferior de cuantificación		Folios individuales, plasma hemolizado y plasma lipémico		%	DICTÁMEN CUMPLE (SI/NO)
Muestra	Respuesta Meloxicam (E.I.)	Muestra	Respuesta Meloxicam (E.I.)		
74_V2_MAA_S2_LICR_1	79843.000	74_V2_MAA_S2_FR_1845	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_2	98496.000	74_V2_MAA_S2_FR_1846	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_3	72704.000	74_V2_MAA_S2_FR_1847	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_4	81878.500	74_V2_MAA_S2_FR_1848	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S2_LICR_5	78640.000	74_V2_MAA_S2_FR_1849	0.000	0.000	SI
Promedio	82312.300	74_V2_MAA_S2_FR_1850	0.000	0.000	SI
		74_V12_MAA_S2_HR_1689	816.000	0.991	SI
		74_V2_MAA_S2_LR_1693	0.000	0.000	SI

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del LIC, (S2) Selectividad a la matriz biológica, (F) Folio de plasma, (H) Plasma hemolizado (R) Reinyección de la muestra Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.3 Selectividad a fármacos de uso común y concomitante

En las tablas 6 y 7 se muestran los resultados de la selectividad a fármacos de uso común y concomitantes para MAA y meloxicam (E.I.), respectivamente, en donde se puede observar que las interferencias próximas al tiempo de retención de MAA es menor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno (ver anexo 1 figuras 11-16).

Tabla 6. Selectividad a fármacos de uso común concomitantes para MAA					
LIC		Fármacos de uso común y concomitantes		%	DICTÁMEN CUMPLE SI/NO
MUESTRA	RESPUESTA MAA	FÁRMACO	RESPUESTA MAA		
74_V2_MAA_S3_LICR_1	1202.000	ÁCIDO SALICÍLICO	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_2	1300.000	PARACETAMOL	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_3	1289.500	NAPROXENO	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_4	1170.000	CAFEÍNA	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_5	1283.000	NICOTINA	0.000	0.000	SI
PROMEDIO	1248.900				

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC), MAA, (S3) Selectividad a fármacos de uso común y concomitantes. (R) Reinyección de la muestra

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

Tabla 7. Selectividad a fármacos de uso común concomitantes para meloxicam (E.I)					
LIC		Fármacos de uso común y concomitantes		%	DICTÁMEN CUMPLE SI/NO
MUESTRA	RESPUESTA MELOXICAM	FÁRMACO	RESPUESTA MAA		
74_V2_MAA_S3_LICR_1	71051.000	ÁCIDO SALICÍLICO	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_2	72080.500	PARACETAMOL	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_3	72490.000	NAPROXENO	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_4	74979.500	CAFEÍNA	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_S3_LICR_5	79027.000	NICOTINA	0.000	0.000	SI
PROMEDIO	73925.600				

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC), MAA, (S3) Selectividad a fármacos de uso común y concomitantes. (R) Reinyección de la muestra

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.4 Acarreamiento (prueba de arrastre)

En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados de la prueba de arrastre para MAA y meloxicam respectivamente, en donde se puede observar que las interferencias próximas al tiempo de retención de MAA es menor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno (ver anexo 1 figuras 17-21).

LIC		Muestra Doble Blanco		%	DICTÁMEN CUMPLE (SI/NO)
Muestra	Respuesta MAA	Muestra	Respuesta MAA		
74_V2_MAA_AC_LIC_1	1184.500	74_V2_MAA_AC_DB_1	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_2	2348.000	74_V2_MAA_AC_LSC_1	105457.000	NA	NA
74_V2_MAA_AC_LIC_3	1204.000	74_V2_MAA_AC_DB_2	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_4	1164.000	74_V2_MAA_AC_DB_3	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_5	1162.000				
Promedio	1412.500				

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC), (AC) Acarreamiento, (DB) Doble blanco, (LSC) Límite superior de cuantificación, No aplica (N/A).

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

LIC		Muestra Doble Blanco		%	DICTÁMEN CUMPLE (SI/NO)
Muestra	Respuesta Meloxicam	Muestra	Respuesta Meloxicam		
74_V2_MAA_AC_LIC_1	82137.000	74_V2_MAA_AC_DB_1	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_2	123465.000	74_V2_MAA_AC_LSC_1	71934.000	N/A	N/A
74_V2_MAA_AC_LIC_3	74775.500	74_V2_MAA_AC_DB_2	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_4	86107.500	74_V2_MAA_AC_DB_3	0.000	0.000	SI
74_V2_MAA_AC_LIC_5	80858.000				
Promedio	89468.600				

(%) Porcentaje de la interferencia de la muestra respecto al promedio de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC), (AC) Acarreamiento, (DB) Doble blanco, (LSC) Límite superior de cuantificación No aplica (N/A).

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.5 Curva de calibración

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de error relativo de los arreglos matemáticos en la cuantificación de la MAA en plasma.

Ponderación	$\Sigma ER\%$
Ninguna	106.925
1/x	75.095
1/x ²	70.331
1/y	75.170

En las tablas 11 y 12 se observa que el método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.2-20 µg/mL. En todos los estándares que constituyeron la curva de calibración se dio cumplimiento a la desviación porcentual (bondad de ajuste) de la concentración recuperada (experimental) con respecto a la nominal (adicionada) menor o igual al 15% y 20% para el límite inferior de cuantificación.

Concentración teórica (µg/mL)	0.199	0.399	0.748	0.997	2.493	4.985	11.216	13.709	17.448	19.940
Curva 1	0.199	0.407	0.709	1.004	2.532	4.894	11.733	13.200	17.668	20.042
Curva 2	0.195	0.420	0.716	1.007	2.616	4.927	11.157	13.114	17.991	19.538
Curva 3	0.200	0.402	0.734	0.987	2.431	5.216	11.158	13.390	17.124	20.803
Promedio	0.198	0.410	0.720	0.999	2.526	5.012	11.349	13.235	17.594	20.128
D.E.	0.003	0.009	0.013	0.011	0.093	0.177	0.332	0.141	0.438	0.637
C. V. (%)	1.336	2.268	1.792	1.079	3.667	3.534	2.982	1.067	2.490	3.164
Desv. Abs. (%)	0.503	2.673	3.788	0.234	1.337	0.548	1.189	3.460	0.839	0.941

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

Tabla 12. Parámetros de las curvas de calibración del método analítico para cuantificar MAA en plasma			
Curva/parametros	Pendiente	ordenada	r
Curva 1	0.078096	-0.000492	0.9994
Curva 2	0.076226	0.000269	0.9992
Curva 3	0.077199	-0.001173	0.9995
Promedio	0.077174		
D. E.	0.001		
C. V. (%)	1.212		

Todos los resultados reportados en la tabla 12 se obtuvieron de los datos generados por el paquete computacional Empower® de Waters con un ajuste $1/x^2$.

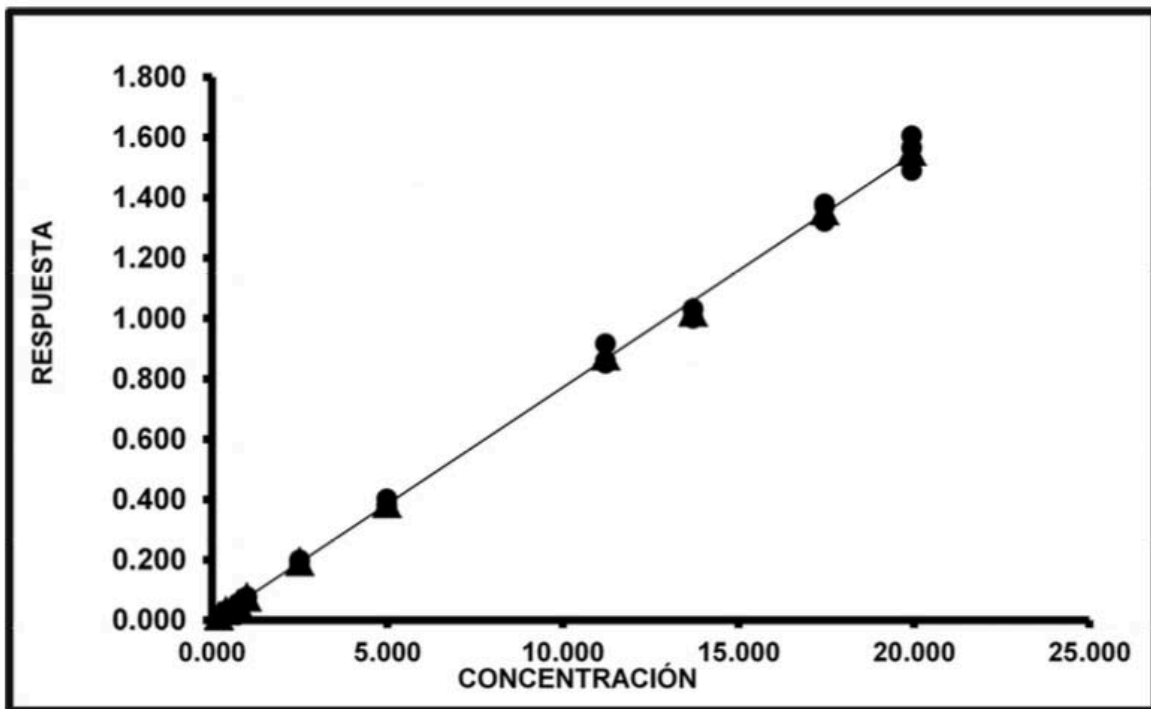


Figura 2 Curvas de calibración para cuantificar MAA en plasma.

7.6 Precisión y exactitud

7.6.1 Repetibilidad

En la tabla 13 se muestran los resultados correspondientes a la precisión y exactitud intradía del LIC y muestras control de calidad (CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD) para el investigador 1 en el equipo cromatográfico, en donde se puede observar que el coeficiente de variación (CV %) y la desviación absoluta (Desv. Abs %) en cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen al presentar valores menores al 15% (20 % para el límite inferior de cuantificación).

Muestra	LIC (0.199 µg/mL)	CCB (0.598 µg/mL)	CCBB (1.496 µg/mL)	CCM (8.724 µg/mL)	CCA (14.955 µg/mL)	CCD (24.925 µg/mL)
1	0.195	0.574	1.385	8.450	13.344	21.611
2	0.208	0.573	1.377	8.678	14.053	22.020
3	0.217	0.551	1.362	7.921	12.941	22.417
4	0.217	0.495	1.395	8.353	13.323	22.073
5	0.178	0.549	1.322	8.339	13.390	21.988
Promedio	0.203	0.568	1.368	8.348	13.410	22.022
D.E.	0.017	0.019	0.029	0.275	0.402	0.287
C.V. (%)	8.191	3.337	2.084	3.290	2.996	1.302
Desv. Abs. (%)	2.010	4.950	8.543	4.308	10.330	11.648

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.6.2 Reproducibilidad

En la tabla 14 se muestran los resultados correspondientes a la precisión y exactitud interdía LIC y muestras control (CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD) del investigador 1 en el equipo EQS-043 en donde se puede observar que el coeficiente de variación (CV %) y la desviación absoluta (Desv. Abs %) en cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen al presentar valores menores al 15% y del 20 % para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 14. Reproducibilidad (3 días) del método analítico para cuantificar MAA en plasma para el investigador 1						
Muestra	LIC (0.199 µg/mL)	CCB (0.598 µg/mL)	CCBB (1.496 µg/mL)	CCM (8.724 µg/mL)	CCA (14.955 µg/mL)	CCD (24.925 µg/mL)
Promedio	0.200	0.575	1.399	8.117	14.312	23.127
D.E.	0.016	0.018	0.040	0.479	0.0726	1.776
C.V. (%)	7.975	3.153	2.853	5.904	5.071	7.678
Desv. Abs. (%)	0.469	3.891	6.480	6.958	4.300	7.212

En la tabla 15 se muestran los resultados correspondientes a la precisión y exactitud interdía del LIC y muestras control (CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD) del investigador 2 en el equipo EQS-043, en donde se puede observar que el coeficiente de variación (CV %) y la desviación absoluta (Desv. Abs %) en cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen al presentar valores menores al 15% y del 20 % para el límite inferior de cuantificación (ver anexo 1 figuras 22-27).

Tabla 15. Reproducibilidad (3 días) del método analítico para cuantificar MAA en plasma para el investigador 2						
Muestra	LIC (0.199 µg/mL)	CCB (0.598 µg/mL)	CCBB (1.496 µg/mL)	CCM (8.724 µg/mL)	CCA (14.955 µg/mL)	CCD (24.925 µg/mL)
Promedio	0.209	0.547	1.504	8.631	15.593	25.117
D.E.	0.023	0.037	0.047	0.246	0.459	0.637
C.V. (%)	11.119	6.841	3.130	2.854	2.944	2.535
Desv. Abs. (%)	4.810	8.495	0.539	1.064	4.263	0.772

7.7 Recobro (porcentaje de recuperación)

El recobro del método analítico para cuantificar MAA en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (CCB, CCM y CCA), presentando una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 16. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar MAA en plasma				
Nivel de concentración	Áreas		Recobro %	% Desv.
	Sistema	Método		
CCB (0.598 µg/mL)	2543.000	2943.000		
	2857.000	2656.000		
	2691.000	2941.500		
	2902.000	2343.000		
	2888.000	2885.000		
	2776.200	2753.700	99.190	1.753
CCM (8.724 µg/mL)	45080.500	44318.000		
	45653.000	44008.000		
	45863.500	46197.500		
	46665.500	45338.500		
	45960.000	44918.500		
	45844.500	44956.100	98.062	0.596
CCA (12.140 µg/mL)	78311.000	74672.000		
	78311.000	76525.000		
	77037.000	74839.000		
	81937.000	73685.000		
	77532.500	73403.000		
Promedio	78395.300	74624.800	95.190	2.349
	Promedio Global		97.481	

Nota: Las concentraciones se ajustaron a la pureza de la sustancia de referencia utilizada

Por otro lado el recobro de meloxicam (E.I.) se muestra a continuación:

Tabla 17. Recobro absoluto de meloxicam (E.I.) en plasma			
Concentración	Áreas		% de recobro
	Sistema	Método	
Concentración meloxicam (e.i.) 4.757 µg /mL	41360.000	43708.000	
	41077.000	43457.500	
	42548.000	43572.000	
	42351.000	42737.500	
	43395.500	44810.000	
	41803.500	44578.000	
	41674.500	42697.000	
	41962.000	44301.000	
	42752.000	44719.000	
	42577.500	42953.500	
	41504.000	43239.000	
	40768.000	44213.000	
	41731.000	43567.000	
	35585.000	44233.000	
	40806.000	43288.000	
Promedio	41459.667	43738.233	105.496

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.8 Reproducibilidad de la reinyección

En la tabla 18 se muestran los resultados de la prueba en donde se puede observar que cumple con los criterios de aceptación al presentar un % de desviación menor al 15% con respecto a la concentración recuperada promedio de las muestras control de calidad originales.

Tabla 18. Reproducibilidad de la reinyección			
Concentración recuperada de las muestras originales			
Muestra	CCB (0.598 µg/mL)	CCM (8.724 µg/mL)	CCA (12.140 µg/mL)
1	0.574	8.450	13.344
2	0.573	8.678	14.053
3	0.551	7.921	12.941
4	0.595	8.353	13.323
5	0.549	8.339	13.390
Promedio	0.568	8.348	13.410
D.E.	0.019	0.275	0.402
C.V. (%)	3.337	3.290	2.996
Concentración recuperada de las muestras inyectadas			
1	0.549	8.377	13.351
2	0.615	8.510	13.959
3	0.592	8.440	13.238
4	0.591	8.474	13.509
5	0.593	8.242	14.092
Promedio	0.588	8.409	13.630
D.E.	0.024	0.105	0.377
C.V. (%)	4.078	1.252	2.764
Desv. Abs. (%)	3.448	0.724	1.638

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.9 Estabilidad

7.9.1 Estabilidad de la muestra en la matriz biológica

7.9.1.1 Estabilidad a corto plazo

En las tabla 19 se puede observar que las muestras control de calidad almacenadas a temperatura ambiente, en refrigeración y congelación son estables durante al menos 15.3 h respectivamente, al presentar una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor nominal.

Tabla 19. Estabilidad de MAA en plasma		
Condición de temperatura a. 15 h	Desv. Abs. (%)	
	CCB (0.598 µg/mL)	CCA (12.140 µg/mL)
Temperatura ambiente 15-30°C,	2.676	1.377
Tempertura de refrigeración (2-8°C)	8.696	4.139
Temperatura de congelación (temperatura no mayor a -20 °C)	5.574	4.208

7.9.2 Estabilidad de la muestra procesada

7.9.2.1 Estabilidad en el instrumento/automuestreador

En la tabla 20 se puede observar que las muestras control de calidad procesadas y almacenadas en el automuestreador (15 °C) fueron estables durante 37.8 y 58.1 horas, respectivamente al presentar una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor nominal.

Tabla 20. Estabilidad de MAA en muestra procesada en automuestreador		
Temperatura de 15 °C Tiempo	Desv. Abs. (%)	
	CCB (0.598 µg/mL)	CCA (12.140 µg/mL)
37.8 h	2.676	0.408
58.1 h	13.545	10.665

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.9.2.2 Estabilidad en refrigeración

En la tabla 21 se puede observar que las muestras control de calidad procesadas y almacenadas en el refrigerador (2-8 °C) son estables durante al menos 25.9 h, al presentar una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor nominal.

Tabla 21. Estabilidad de MAA en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 25.9 h	
Desv. Abs (%)	
CCB (0.598 µg/mL)	CCA (12.140 µg/mL)
5.463	3.098

Nota: Las concentraciones reportadas fueron ajustadas conforme a la pureza de la sustancia de referencia utilizada.

7.9.3 Ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 22 Se muestran los resultados de la prueba en donde se puede observar que las muestras control de calidad conteniendo MAA son estables después de haber sido sometidas a cuatro ciclos de congelación-descongelación al presentar una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor nominal.

Tabla 22. Estabilidad de MAA cuatro ciclos de congelación-descongelación (-70±10 °C)	
Desv. Abs (%)	
CCB (0.598 µg/mL)	CCA (12.140 µg/mL)
0.725	7.306

7.9.4 Estabilidad en solución

En la tabla 23 se puede observar que la solución estándar principal A (500 µg/mL) de MAA fue estable a temperatura ambiente (entre 15-30 °C) durante 19.2 h, refrigeración (entre 2-8°C) durante 15.9 días y congelación (-70 ± 10°C) durante 15.9 días al obtenerse una desviación absoluta menor al 10 % entre las soluciones para evaluar la estabilidad y las de reciente preparación.

Tabla 23. Estabilidad de la solución estándar principal A de MAA (498.5 µg/mL) A			
Condición de almacenamiento	C.V. (%)		Desv. Abs. (%)
	T ₀ (tiempo cero)	Tiempo de muestreo	
Temperatura ambiente (15-30 °C)	1.157	T _{19 h} 1.950	0.297
Refrigeración (2-8 °C)	0.073	T _{15.9 días} 0.263	3.559
Congelación (-70 +/- 10 °C)	0.141	T _{15.9 días} 0.237	5.805

Para la evaluación de la estabilidad de la solución estándar de trabajo B (50µg/mL) se determina que no es estable a temperatura ambiente (entre 15-30 °C), refrigeración (entre 2-8°C) y congelación (-70 ± 10 °C), ya que se presentó una desviación mayor al 10% aún después de repetirse la prueba.

En la tabla 24 se puede observar que la solución estándar principal de meloxicam (100 µg/mL) fue estable a temperatura ambiente (entre 15-30 °C) durante 6.3 días, refrigeración (entre 2-8°C) durante 0 .8 días y congelación (-70 ± 10°C) durante 0.8 días al obtenerse una desviación absoluta menor al 10 % entre las soluciones para evaluar la estabilidad y las de reciente preparación.

Tabla 24. Estabilidad de la solución estándar principal I de meloxicam (99.9 µg/ml)			
Condición de almacenamiento	C.V. (%)		Desv. Abs. (%)
	T ₀ (tiempo cero)	Tiempo de muestreo	
Temperatura ambiente (15-30 °C)	0.784	T _{6.3 días} 1.672	3.120
Refrigeración (2-8 °C)	0.637	T _{19 h} 0.828	2.276
Congelación (-70 +/- 10 °C)	1.859	T _{19 h} 0.996	1.266

En la siguiente tabla se muestran los resultados de todas las pruebas realizadas durante la validación.

Tabla 25. Resultados y dictamen de las pruebas para la validación del método analítico para cuantificar MAA en plasma con CPDA			
Prueba	Especificación	Resultado	Dictamen
Selectividad a la matriz biológica	Interferencias menores al 20 % para LIC y menor al 5 % para el E.I.	0.000 % para LIC 0.000 % para E.I.	Cumple
Selectividad a fármacos de uso común y concomitantes	Interferencias menores al 20 % para LIC y menor al 5 % para el E.I.	0.000 % para LIC 0.000 % para E.I.	Cumple
Acarreamiento	Interferencias menores al 20 % para LIC y menor al 5 % para el E.I.	0.000 % para LIC 0.000 % para E.I.	Cumple
Curva de calibración	Desv Abs menor al 15 % para la curva excepto LIC que es menor al 20 %	% entre 0.234 y 3.788 para los puntos de la curva	Cumple
Precisión y exactitud (repetibilidad)	Desv Abs y C.V. menor al 15 % (20 % para LIC)	Valores de entre 2.010 y 11.648 %	Cumple
Precisión y exactitud (reproducibilidad)	Desv Abs y C.V. menor al 15 % (20 % para LIC)	Valores de entre 0.469 y 7.212 %	Cumple
Recobro	% de Desv. Abs menor al 15 %	2.349 %	Cumple
Reproducibilidad de la inyección	% de Desv. Abs menor al 15 %	1.638 %	Cumple
Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente 15-30 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	1.377 %	Cumple
Estabilidad a corto plazo (refrigeración 2-8 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	4.139%	Cumple
Estabilidad a corto plazo (temperatura no mayor a -20 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	4.208%	Cumple
Estabilidad a largo plazo (congelación a -70 ± 10 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	44 días	Cumple
Estabilidad de la muestra procesada (automuestreador 15 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	0.408% y 10.665%	Cumple
Estabilidad de la muestra procesada (refrigeración 2-8 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	5.463% y 3.098%	Cumple
Estabilidad a ciclos de congelación descongelación (-70±10 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	0.725% y 7.306%	Cumple
Estabilidad en solución (temperatura ambiente 15-30 °C)	% de Desv Abs. menor al 10%	0.297%	Cumple
Estabilidad en solución (refrigeración 2-8 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	3.559%	Cumple
Estabilidad en solución (congelación -70 ± 10 °C)	% de Desv Abs. menor al 15 %	5.805%	Cumple

8. Discusión de resultados

Antes de cada prueba (corrida analítica) se realizó la selectividad de inicio de corrida, la cual consistió en la inyección de tres muestras en el siguiente orden: BR, DB y B, esta prueba permite determinar que entre cada corrida no hay arrastre de sustancias indeseables procedentes de corridas anteriores o incluso contaminaciones durante el procesamiento de las muestras o del material, lo cual da mayor confiabilidad a los resultados de cada una de las pruebas que se realizaron durante la validación, contrario a lo observado por otros investigadores en el cual se reportó la presencia de una señal a un tiempo de 3.3 min después de la inyección y antes de la detección de la MAA⁴⁶.

El tiempo de retención que se obtuvo para la MAA fue en promedio de 3.7 min, esto representa una optimización comparado a los reportado por otros investigadores⁴⁵⁻⁴⁸ que documentaron tiempos de 6.2 min, 5.2 min, 7.5 min y 12,95 min; esta mejora permite reducir el tiempo de corrida analítica permitiendo que durante un estudio de voluntarios el análisis de las muestras se realice con menor tiempo y a menor costo.

Otra optimización del método se vio reflejada en el volumen de inyección de las muestras el cual fue de 10 μ L, una reducción del 50 % comparado a otros autores⁴⁵ que reportan un volumen de inyección de 20 μ L, este hecho beneficia al tiempo de vida de la columna ya que al reducir el volumen de la muestra se reduce la cantidad de impurezas que llegan a permanecer y adherirse a la columna aumentando la posibilidad de contaminaciones y presurización del sistema cromatográfico, este hecho puede llevar incluso al acto de detener una corrida analítica o a rechazarla por pobre cromatografía.

El método de precipitación proteica descrito en el apartado 5.7 permitió la optimización del método que se tenía para el procesamiento de las muestras plasmáticas, la precipitación proteica a pesar de ser considerada una técnica “sucias” demostró no afectar la selectividad del método, Algunos autores reportaron

en su método de análisis la extracción líquido-líquido como técnica para extraer la MAA, el problema de este método es la cantidad de pasos, el tiempo y recursos ya que en este método se diluye la muestra se le agrega (E.I) un agente precipitante y en seguida la extracción de la MAA del plasma mediante una fase orgánica, después la fase orgánica es evaporada seguido de la reconstitución, este método es muy costoso por la cantidad de fase orgánica que llega a emplearse y la cantidad de energía para evaporar las muestras contando además la cantidad de nitrógeno para la evaporación y el tiempo que se requiere para realizarlo, o en otros casos que se reporta haber empleado la extracción sólido-líquido en el procesamiento de las muestras, este método que representa mucho tiempo de procesamiento es además muy costoso, poco práctico para poder ser utilizado en un estudio en el cual se requiere procesar muchas muestras como es el caso de los estudios en voluntarios^{25,45}.

El uso de ACN represento una ventaja ya que al poseer una densidad menor a la del metanol permitió que las corridas analíticas se realizaran sin riesgo de aumentar la presión del equipo y que este se detuviera.

Además la reducción del tiempo de procesamiento permite mantener la estabilidad de las muestras ya que como esta reportado la MAA es una molécula que sufre fotodegradación⁴⁹.

9. Conclusiones

Con base en los resultados anteriores, se considera que el Método Analítico cumple con los parámetros de validación establecidos en la norma oficial NOM-177-SSA-2013 y por lo tanto es confiable para el análisis de MAA en plasma con CPDA como anticoagulante y para su aplicación en estudios de Farmacocinética, Biodisponibilidad y/o Bioequivalencia.

10. Perspectivas

La validación de un métodos bioanalíticos seguirá teniendo un alto impacto en la normatividad internacional como hasta ahora, ya que esta metodología permite garantizar la confiabilidad de los resultados, incluso la nueva rama de los medicamentos biotecnológicos toma parte de estos parámetros de validación.

En los métodos desarrollados en sistemas cromatográficos de alta presión y ultrapresión es indispensable contar con la evidencia documentada de que los procesos realizados son confiables y pueden repetirse bajo las mismas condiciones experimentales, aunado a un sistema de calidad apegado a la normatividad, se puede dar seguridad al cumplimiento de uno de los requisitos que demanda la autoridad sanitaria y el cumplimiento de este rubro da como consecuencia la incursión al estudio de bioequivalencia o biodisponibilidad. Los resultados satisfactorios permiten a los patrocinadores el cumplimiento de el marco regulatorio y de esta manera ofrecer a la población medicamentos de buena calidad y a bajo costo.

Sin embargo, es importante destacar que nuestra normatividad vigente no hace mención de las buenas practicas cromatograficas, las cuales permiten el monitoreo continuo de la idoneidad del sistema y garantizan la confiabilidad de los resultados, seria importante llegar a establecer una guía mexicana que aborde este tema se apegue al marco internacional, a las necesidades de los terceros autorizados y a los laboratorios en general hacen uso de los equipos cromatograficos, permitiéndoles trabajar desde un inicio con la certeza de que sus resultados son confiables.

11. Referencias

- (1) Unidos por los Derechos Humanos. Declaracion Universal de los Derechos Humanos: CINU.[acceso 02-06-2015]., Disponible en: <http://www.cinu.mx/onu/documentos/declaracion-universal-de-los-d/>
- (2) Derecho a la Salud. OMS. [Publicación 2013, acceso 29-05-2015].,Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs323/es/>
- (3) Constitucion Politica de los Estados Unidos Mexicanos. Camara de Diputados: [Acceso 09-06-2015].,Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgs.htm>.
- (4) Ley general de salud. Camara de Diputados:[Acceso 02-06-2015] Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgs.htm>.
- (5) Estudios económicos de la OCDE.OECD library: [Publicado en 2011, Acceso 24-05-2015].,Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/economics/estudios-economicos-de-la-ocde-mexico-2011_9789264115934-e.
- (6) Estadísticas de la OCDE sobre la salud 2014 México en comparación. OECD:[acceso 22-06-2015].,Disponible en: <http://www.oecd.org/els/health-systems/Briefing-Note-MEXICO-2014-in-Spanish.pdf>.
- (7) Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 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 de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. 2013.
- (8) Caso P. ESQUEMA REGULATORIO DE MEDICAMENTOS EN MÉXICO; RETOS Y OPORTUNIDADES: COFEPRIS. [Acceso 13-07-2015].,disponible en:<http://www.oecd.org/gov/regulatory-policy/48658938.pdf>.
- (9) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA: publicado en 2011.
- (10) ANVISA. Guide for validation of analytical and bioanalytical methods. 2003.
- (11) Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de

medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA), RESOLUÇÃO - RDC No 27, DE 17/05/2012

- (12) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH). Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).2005
- (13) Guidance For Industry. Bioanalytical Method Validation.2001
- (14) Viswanathan C. T, et.al. Workshop/Conference Report — Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 4.
- (15) Surendra B.,et.al. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 11.
- (16) Krull I., System-Suitability Samples — What They Are, Why We Use Them, and What They Should Do. LC GC North America 2000; Advanstar.
- (17) Botergman, D., et.al. Recommendations on the Interpretation of the new European Agency Guideline on Bioanalytical Validation by Global CRO Council for Bioanalysis (GCC). [acceso 30-05-2015]., disponible en: <http://www.future-science-group.com>
- (18) Physicochemical Factors On The Hydrolysis Of Dipyrone, M. Aravind. Wiley, Clinical Pharmacology & Therapeutics.Online Library: [acceso 30-05-2015]., disponible en: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1532-6535?origin=publication_detail](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1532-6535?origin=publication_detail)
- (19) Pharmascience, Neosaldor, Pharmascience Laboratórios Ltda Comprimido revestido dipirone 300 mg, mucato de isometepteno 30 mg, cafeína 30 mg. : [acceso 30-05-2015].,Disponible en : http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7313592014&pIdAnexo=2190734.
- (20) Takeda, Neosaldina, Takeda Pharma Ltda Drágeas embalagens com 30, 100 e 200 unidades e Solução Oral (gotas) frasco com 15mL.: [acceso 30-05-2015]. Disponible en: http://www.takedabrasil.com/~-/media/Countries/br/Files/PDFs/bulas/bulas_para_profissionais_de_saude/neosaldina_bula_profissional_de_saude.pdf.
- (21) U.S.Department of Health and Human ServicesFood and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001.

- (22) Suarez Kurtz G, et.al. Limited-sampling strategy models for estimating the pharmacokinetic parameters of 4 methylaminoantipyrine, an active metabolite of dipyron. *Brazilian Journal of medical and biological research* 2001;1475-1485.
- (23) Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, et al. Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorg Med Chem* 2012; 20(1):101-107.
- (24) Burkhard H., Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic, *The FASEB Journal* • Research Communication, 2007.
- (25) Dhaneshwar S. Bioequivalence study of two oral formulations of metamizole 500 mg in healthy volunteers, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol.3, 2012
- (26) Martinez J. Riesgo de insuficiencia renal terminal asociado a la exposición crónica de analgésicos y/o aine, Departamento de Farmacología y Toxicología Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Barcelona. 2006.
- (27) Senyuva Z., et.al Validated Simple, Rapid and Accurate HPLC Methods for determination of Metamizole Sodium in Solid and Liquid Dosage Forms.
- (28) D. Flusser, et.al. Influence of Food on the Pharmacokinetics of Dipyron *European Journal of Clinical Pharmacology*, (1988) 34:105-107, 1988.
- (29) L. Granit, Effect of age on the pharmacokinetics of dipyron, *European Journal of Clinical Pharmacology*., 1989.
- (30) Asmardi G, et.al. Pharmacokinetics of dipyron in man; role of the administration rute., *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* vol 10; 1985
- (31) Prodolina (metamizol sódico). Farmacia del niño: [acceso 30-05-2015]., disponible en: <http://www.farmaciasdelnino.mx/esp/item/1136/27/prodolina-metamizol-sodico-10-tab-500mg>.
- (32) Análisis Funcional Orgánico, HPLC.. [acceso 30-05-2015]., Disponible en : <http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/AFO2c2013-4A.pdf>
- (33) Senyuva Z., et.al. Rapid, simple and accurate liquid chromatography–diode array detection validated method for the determination of dipyron in solid and liquid dosage forms. *Analytica Chimica Acta* 2005; 547:73-77.

- (34) The LC Handbook. Guide to LC columns and method development. Agilent. 2011. Publication number 5990-7595EN. [acceso 20-05-2015]., Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- (35) Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires Argentina: Farro S.A; 1992, p. 359 y 360
- (36) Nieto F. Neo-Melubrina, peligroso hábito en México: revista Fortuna negocios y Finanzas. [acceso 30-05-2015]., Disponible en: <http://www.revistafortuna.com.mx/opciones/archivo/2005/julio/html/salud/neomelubrina.htm>
- (37) Taylor L., Abarca S., Henry B., et.al. Use of neomelubina, a banned antipyretic drug, in San Diego, California: A survey of patients and providers. *West J Med* 2001; 175(3):159-163.
- (38) Cromatografía. (621) Aptitud del sistema: USP. [acceso 20-05-2015]., Disponible en: <http://www.usp.org/es/search/site/USP%2032?page=107> .
- (39) Michael W.D. Modern HPLC for Practicing Scientists. U.S.A: Wiley Interscience; 2006.
- (40) Mata J. Retos y tendencias en la preparación de muestras para análisis de fluidos biológicos: Agilent Technologies. [Acceso 02-06-2015]., Disponible en: http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/5_Julian_Retos%20y%20tendencias%20en%20la%20preparaci%C3%B3n%20de%20muestras%20para%20an%C3%A1lisis%20de%20fluidos%20biol%C3%B3gicos_v2.pdf.
- (41) COFEPRIS. Registro Sanitario de Medicamentos; [Acceso 24-05-2015]., <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx>
- (42) Noralva S., et-al. Desarrollo y validación de una metodología analítica (HPLC) para cuantificar metamizol sodico y cafeina en gotas orales en presencia de isometepteno clorhidrato. Universidad Nacional de Colombia, departamneto de Farmacia. Revista Colombiana de Ciencias Químicas No. 26, pp 49-53, 1997.
- (43) Carretero, Detemination of Antipyrine Metabolites in Human Plasma by Solid-Phase Extraction and Micellar Liquid Chromatography, department of analitical Chemistry., Malaga University, 1995

- (44) Metamizol Stada 575 mg cápsulas EFG resumen del estudio de bioequivalencia, STADA .[Acceso 02-06-2015]., Disponible en: http://www.stada.es/sites/default/files/productos/estudios/RESUMEN-_BIOEQUIVAL_Metamizol_110106.pdf
- (45) Melo A., Dipirona: Segurança do uso e Monitoramento da Qualidade de Comprimidos Orais, Pós- Graduação Em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde., Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
- (46) Asmardi G, et.al. High-performance liquid chromatography of dipyrone and its active metabolite in biological fluids, Journal of Chromatography, 277 183-189, 1983.
- (47) Geisslinger G, et.al. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Dypirone Metabolites to Study Their Formation in Human Liver Microsomes, Pharmaceutical Research, Vol. 13 No. 8, 1996.
- (48) Domínguez A, et.al. High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 71,173–178, 2012
- (49) Gómez M, Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products WATER RESEARCH 42, 2698– 2706, 2008
- (50) Chemspider. Royal Society of Chemistry. [Acceso 15-10-2015].,Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10173.html?rid=e87003cd-a6d8-4420-82f3-a1bfff9f8c8e>.
- (51) chemicalize.org. ChemAxon. [Acceso 15-10-2015].,Disponible en: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Cc1c%28c%28%3DO%29n%28n1C%29c2ccccc2%29NC&source=fp>.
- (52) Drug Bank. [Acceso 15-10-2015, última actualización 09-11-2013].,Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00814>.

12. Anexos

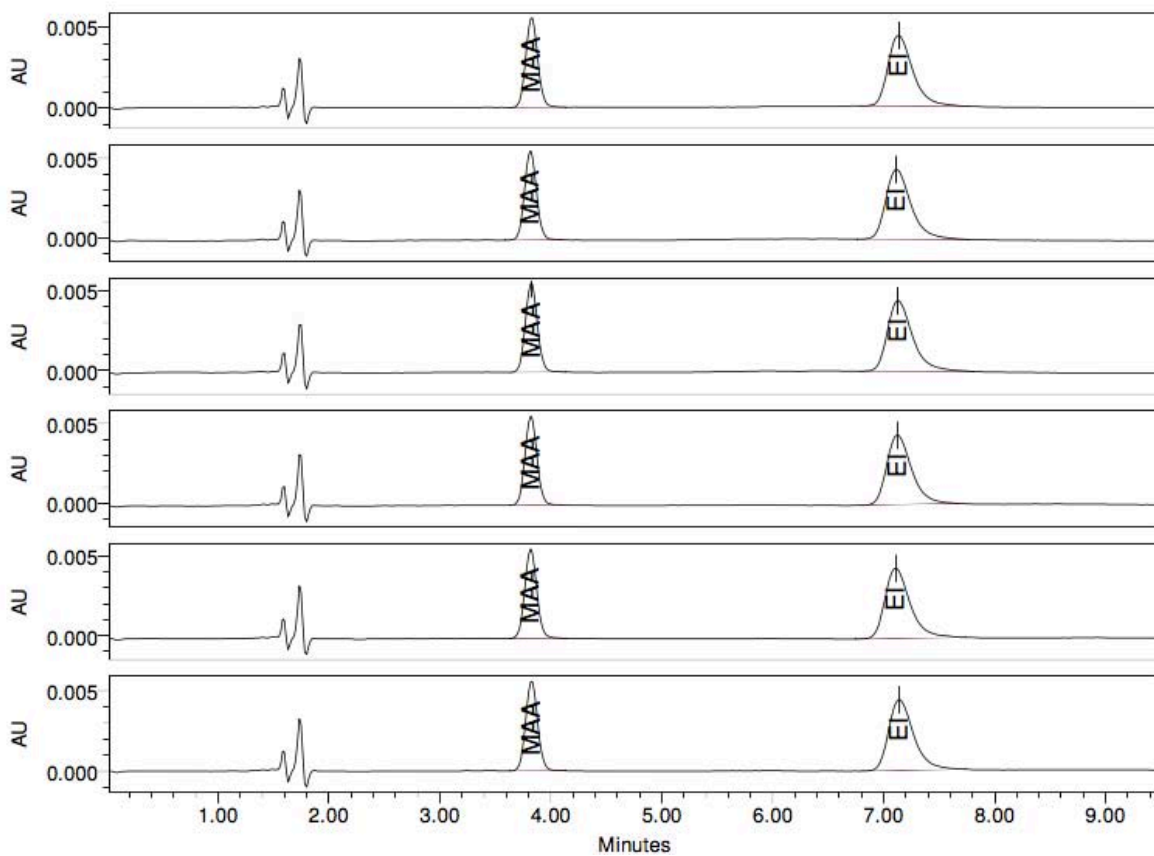


Figura 1. Cromatogramas de la prueba de adecuabilidad del sistema.

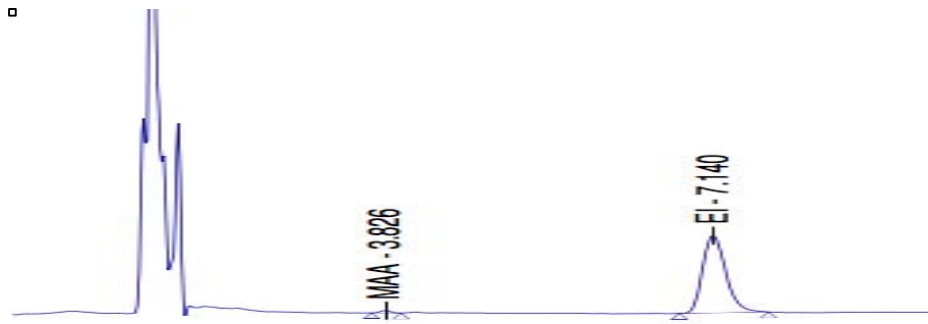


Fig. 2 Cromatograma del LIC para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam



Fig. 3 Cromatograma del plasma con folio 1845 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam



Fig. 4 Cromatograma del plasma con folio 1846 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam

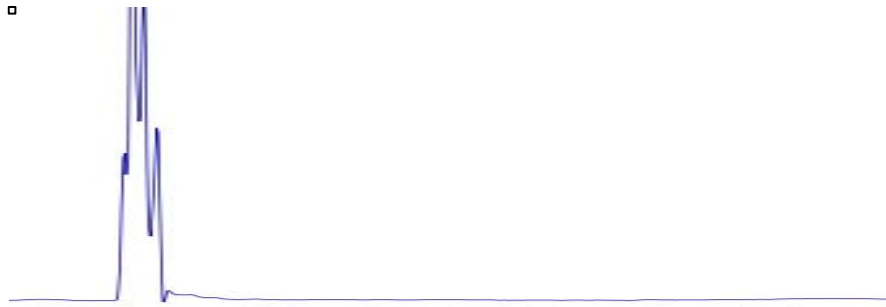


Fig. 5 Cromatograma del plasma con folio 1847 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam

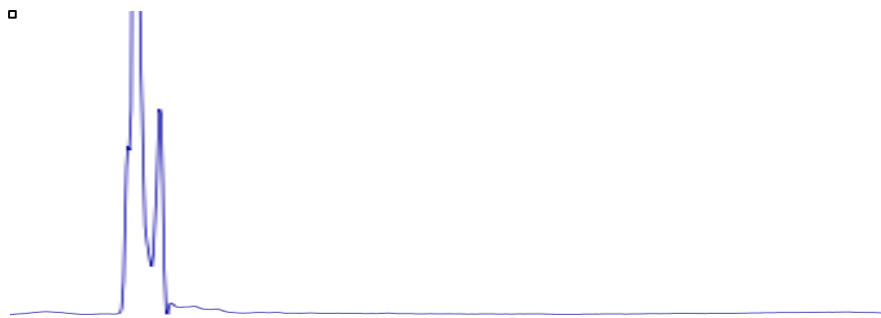


Fig. 6 Cromatograma del plasma con folio 1848 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam.

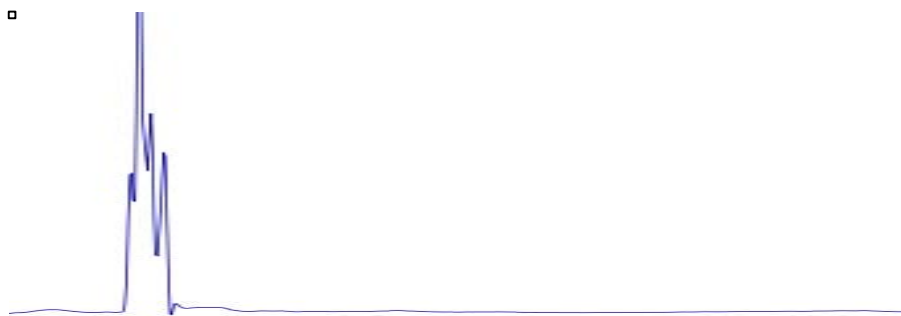


Fig. 7 Cromatograma del plasma con folio 1849 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam.

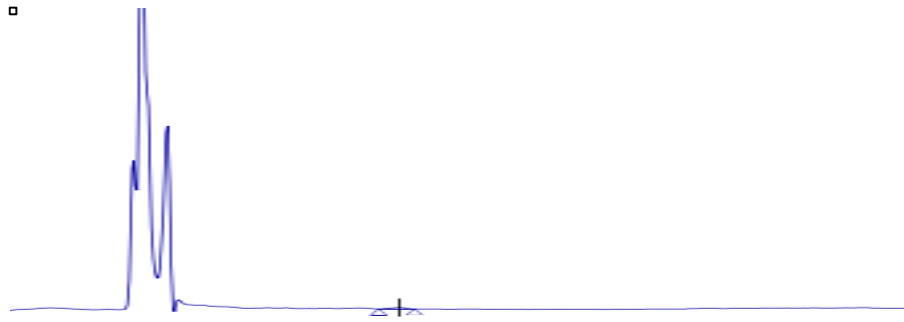


Fig. 8 Cromatograma del plasma con folio 1850 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam.

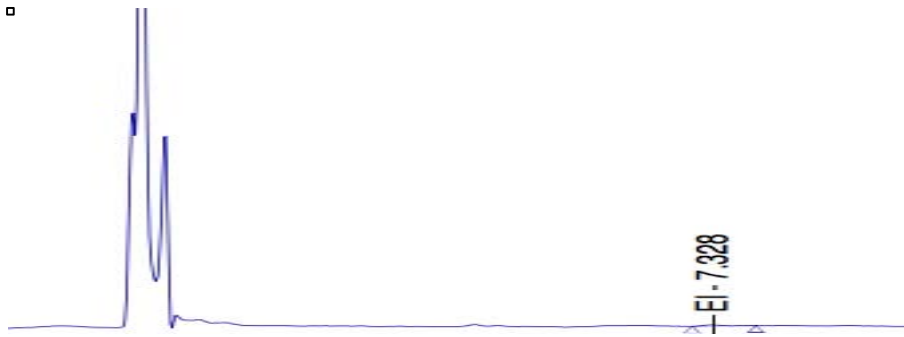


Fig. 9 Cromatograma del plasma heparinizado con folio 1689 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam.



Fig. 10 Cromatograma del plasma lipemico con folio 1693 para selectividad a la matriz biológica MAA/meloxicam.

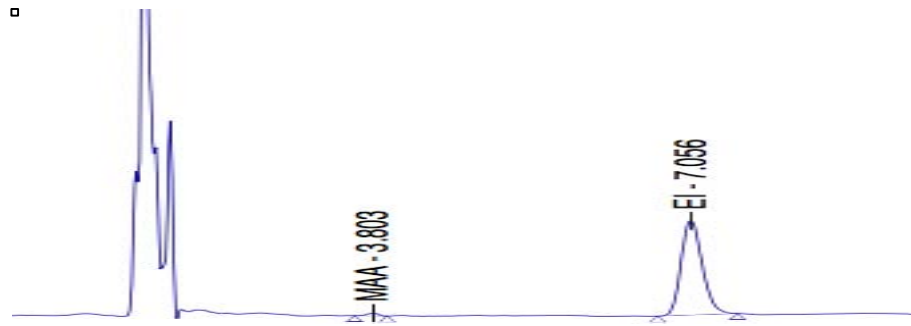


Fig. 11 Cromatograma del LIC de la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam.



Fig. 12 Cromatograma del Ácido Salicílico de la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam.

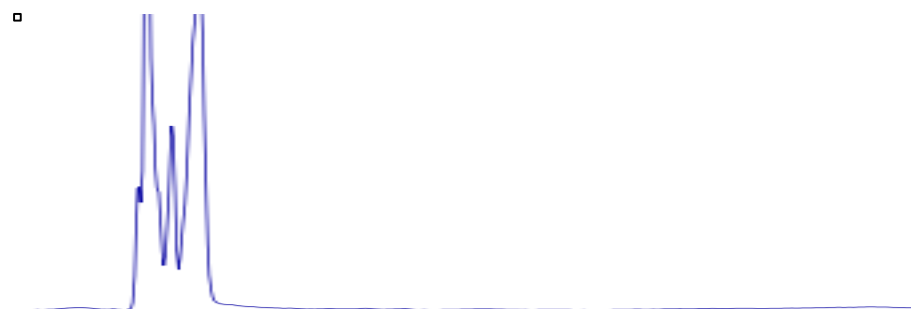


Fig. 13 Cromatograma del paracetamol de la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam.



Fig. 14 Cromatograma del Naproxeno de la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam.



Fig. 15 Cromatograma de la Cafeína de la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam



Fig. 16 Cromatograma de la Nicotina para la prueba de selectividad de fármacos de uso común y concomitantes para MAA/meloxicam.

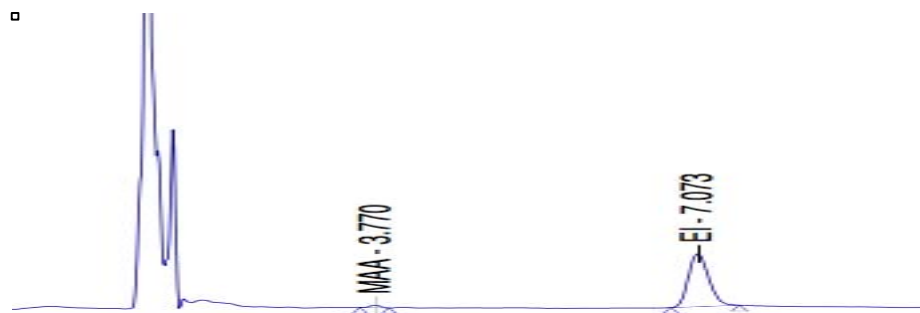


Fig. 17 Cromatograma del LIC para la prueba de acarreamiento para MAA/meloxicam.



Fig. 18 Cromatograma del primer Doble blanco para la prueba de acarreamiento para MAA/meloxicam.

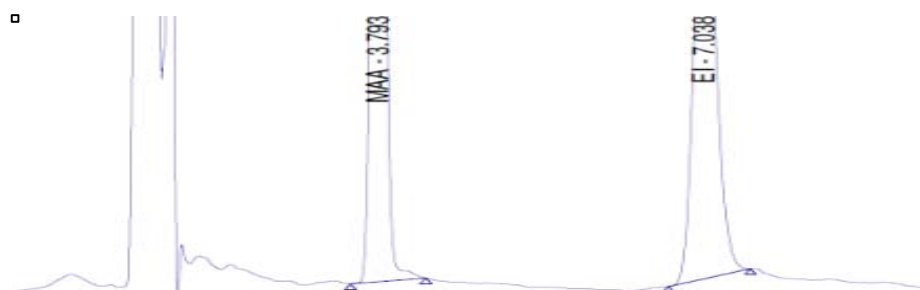


Fig. 19 Cromatograma del LSC para la prueba de acarreamiento para MAA/meloxicam.



Fig. 20 Cromatograma del segundo Doble blanco para la prueba de acarreamiento para MAA/meloxicam.



Fig. 21 Cromatograma del tercer Doble blanco para la prueba de acarreamiento para MAA/meloxicam.



Fig. 22 Cromatograma LIC para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.

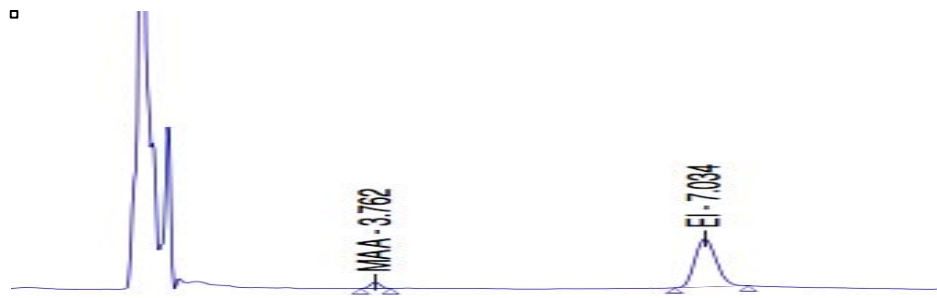


Fig. 23 Cromatograma CCB para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.

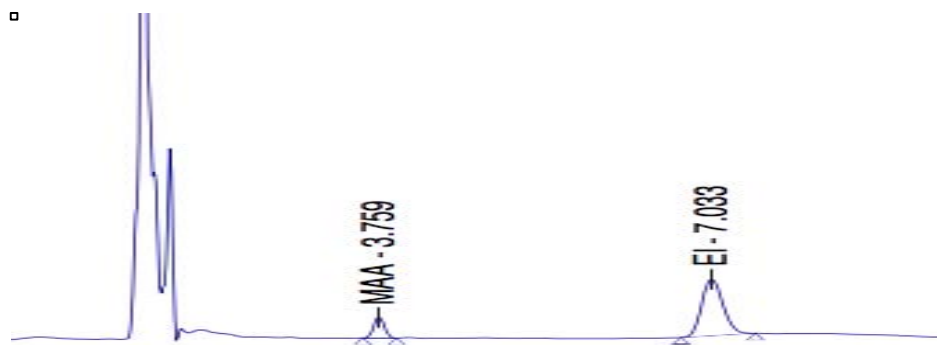


Fig. 24 Cromatograma CCB para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.

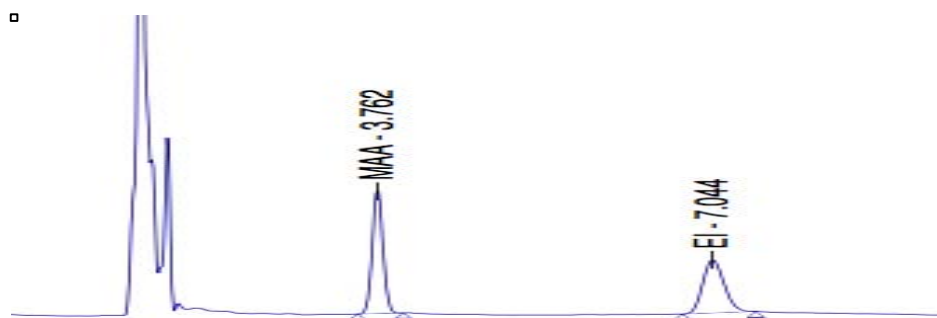


Fig. 25 Cromatograma CCM para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.

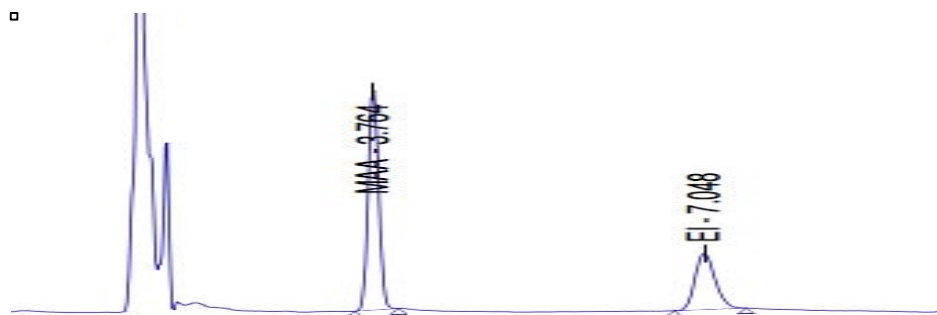


Fig. 26 Cromatograma CCA para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.

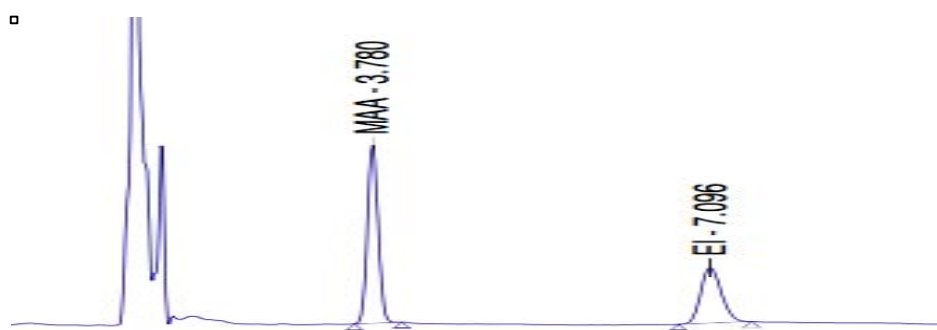


Fig. 27 Cromatograma CCD para la prueba precisión y exactitud para MAA/meloxicam.