



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE 2 PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO  
DE BETAHISTINA) MEDIANTE HPLC ACOPLADO A UN DETECTOR  
MASAS - MASAS.**

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN  
CONTINUA**

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

**CLAUDIA LIZBETH RIVERA MUÑOZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2017**



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:** INES FUENTES NORIEGA  
**VOCAL:** JUAN MANUEL RODRÍGUEZ  
**SECRETARIO:** MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ  
**1er. SUPLENTE:** LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE  
**2° SUPLENTE:** KENNETH RUBIO CARRASCO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO UNIDAD ANALÍTICA DE BIODEXTRA S.A. DE C.V.

---

**M. EN C. MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ  
ASESORA DEL TEMA:**

---

**CLAUDIA LIZBETH RIVERA MUÑOZ  
SUSTENTANTE:**

## AGRADECIMIENTOS:

## ABREVIATURAS

%C.V.	Por ciento de coeficiente de variación
%v/v	Por ciento volumen/volumen
±	Más, menos
°C	Grados Celsius
2-PAA	2- Piridil ácido acético
ADHD	Desorden hiperactivo de déficit de atención
$C_{max}$	Concentración plasmática máxima
D.E.	Desviación estándar
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
g/mol	Gramos / mol
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
h	horas
H3R	Receptor de histamina 3
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
mg	Miligramos
mg / kg	Miligramos / kilogramo
mg / kg / día	Miligramos / kilogramo / Día
mL	Mililitros
mm	milímetros
mM	Milimolar
ng*mL <sup>-1</sup>	Nanogramos por mililitro
ng/mL	Nanogramos/mililitro
NOM	Norma Oficial Mexicana
pKa	Constante de acidez
SSA	Secretaria de Salud

T max	Tiempo máximo
TRC	Toronto Research Chemicals
USP	United States Pharmacopeial
<b>µg/mL</b>	Microgramos/mililitro
m	Pendiente
b	Ordenada al origen
r	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
DES ABS	Desviación absoluta
LIC	Límite inferior de cuantificación

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b>	Dosificación de la betahistina.....	3
<b>Tabla 2.</b>	Parámetros farmacocinéticos de 2-PAA en plasma.....	4
<b>Tabla 3.</b>	Preparación de muestras en matriz biológica de 2-PAA.....	23
<b>Tabla 4.</b>	Concentración final de las muestras en matriz biológica.....	24
<b>Tabla 5.</b>	Concentración de 2-PAA en plasma y solución para la evaluación del recobro.....	34
<b>Tabla 6.</b>	Resultados de la adecuabilidad a lo largo de la validación.....	39
<b>Tabla 7.</b>	Resultados de la adecuabilidad a lo largo de la validación.....	40
<b>Tabla 8.</b>	Resultados de la linealidad del método analítico.....	44
<b>Tabla 9.</b>	Límite de cuantificación.....	46
<b>Tabla 10.</b>	Límite de detección para el 2-PAA.....	47
<b>Tabla 11.</b>	Respuestas para la repetibilidad del método.....	48
<b>Tabla 12.</b>	Concentraciones calculadas para la repetibilidad del método.....	48
<b>Tabla 13.</b>	Concentraciones calculadas de 2-PAA para la evaluación de la reproducibilidad intralaboratorio.....	49
<b>Tabla 14.</b>	Resultados del efecto de la re-inyección.....	50
<b>Tabla 15.</b>	Resultados del efecto de la dilución. Muestras sin diluir.....	51
<b>Tabla 16.</b>	Resultados del efecto de la dilución. Muestras diluidas 1:1.....	52

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 17.</b> Resultados del efecto de la dilución. Muestras diluidas 1:3.....	53
<b>Tabla 18.</b> Resultados de la estabilidad de las muestras control a tres ciclos de congelación- descongelación.....	54
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.....	55
<b>Tabla 20.</b> Resultados de la estabilidad de la muestra en automuestreador en 24 horas.....	56
<b>Tabla 21.</b> Resultados de la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración tiempo inicial.....	57
<b>Tabla 22.</b> Resultados de la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración 24 horas.....	58
<b>Tabla 23.</b> Resultados de la evaluación del recobro en la matriz biológica y en solución.....	59
<b>Tabla 24.</b> Recobro promedio del método analítico.....	60
<b>Tabla 25.</b> Concentraciones calculadas en la tolerancia 1.....	61
<b>Tabla 26.</b> Exactitud de la tolerancia 1.....	62
<b>Tabla 27.</b> Concentraciones calculadas en la tolerancia 2.....	62
<b>Tabla 28.</b> Exactitud de la tolerancia 2.....	63
<b>Tabla 29.</b> Concentraciones calculadas en la tolerancia 3.....	63
<b>Tabla 30.</b> Exactitud de la tolerancia 3.....	64
<b>Tabla 31.</b> Concentraciones calculadas en la tolerancia 4.....	64
<b>Tabla 32.</b> Exactitud de la tolerancia 4.....	65
<b>Tabla 33.</b> Resultados de la estabilidad a largo plazo durante 35 días en congelación.....	66
<b>Tabla 34.</b> Resultados de la estabilidad a largo plazo durante 70 días en congelación.....	67

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Metabolismo de la betahistina.....	2
<b>Figura 2.</b>	Estructura química diclorhidrato de betahistina.....	6
<b>Figura 3.</b>	Estructura química de betahistina.....	6
<b>Figura 4</b>	Estructura química del clorhidrato de 2-piridil ácido acético.....	7
<b>Figura 5.</b>	Estructura química del 2-piridil ácido acético.....	7
<b>Figura 6.</b>	Espectro de masas correspondiente al ion padre del 2-piridil ácido acético.....	36
<b>Figura 7.</b>	Espectro de masas correspondiente al ion hijo del 2-piridil ácido acético.....	36
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma de blanco de fase móvil.....	37
<b>Figura 9.</b>	Cromatograma de matriz biológica.....	37
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma de blanco de reactivos.....	38
<b>Figura 11.</b>	Cromatograma de mezcla de seis fuentes de plasma humano.....	40
<b>Figura 12.</b>	Cromatograma de la muestra plasmática extraída correspondiente al LIC de 2-PAA.....	41
<b>Figura 13.</b>	Cromatograma de plasma lipémico extraído.....	41
<b>Figura 14.</b>	Cromatograma de plasma hemolizado extraído....	42
<b>Figura 15.</b>	Cromatograma de plasma extraído conteniendo heparina.....	42
<b>Figura 16.</b>	Cromatograma de plasma extraído conteniendo EDTA.....	43
<b>Figura 17.</b>	Cromatograma de plasma conteniendo Betahistina.....	43

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 18.</b>	Curva de calibración promedio de las respuestas obtenidas.....	45
<b>Figura 19.</b>	Curva de calibración promedio de las concentraciones medidas.....	45

<b>INDICE</b>	<b>Páginas</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1</b> Metabolismo de betahistina.....	2
<b>1.2</b> Reacciones adversas.....	4
<b>1.3</b> Toxicidad.....	4
<b>1.3.1</b> Toxicidad aguda.....	4
<b>1.3.2</b> Toxicidad a largo plazo.....	5
<b>1.4</b> Mutagénesis y carcinogénesis.....	5
<b>1.5</b> Propiedades fisicoquímicas de Betahistina.....	6
<b>1.6</b> Propiedades fisicoquímicas del 2- piridil ácido acético (metabolito de betahistina).....	7
<b>2.</b> La importancia de validar un método analítico.....	8
<b>2.1</b> Los parámetros esenciales para asegurar la confiabilidad en el desempeño de un método bioanalítico.....	9
<b>2.1.1</b> Rango.....	9
<b>2.1.2</b> Recuperación absoluta.....	9
<b>2.1.3</b> Linealidad.....	9
<b>2.1.4</b> Sensibilidad.....	10
<b>2.1.5</b> Precisión y exactitud.....	10
<b>2.1.6</b> Estabilidad.....	11
<b>2.1.7</b> Selectividad.....	11
<b>2.1.8</b> Limite de cuantificación.....	11
<b>2.1.9</b> Limite de detección.....	11
<b>2.1.10</b> Tolerancia.....	11
<b>II. OBJETIVO</b> .....	13
<b>III. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	13
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	14
<b>5.1</b> Equipos e instrumentos.....	14

<b>5.2</b>	Sustancias de referencia.....	15
<b>5.3</b>	Reactivos.....	15
<b>5.4</b>	Material.....	15
<b>5.5</b>	Matriz biológica.....	16
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	17
<b>6.1</b>	Preparación de soluciones.....	17
<b>6.1.1</b>	Acetato de amonio 10 mM.....	17
<b>6.1.2</b>	Solución de metanol: agua 70:30 % v/v.....	17
<b>6.1.3</b>	Solución ácida de agua: metanol 65:35 % v/v.....	17
<b>6.1.4</b>	Fase móvil.....	18
<b>6.1.5</b>	Solución de reconstitución.....	18
<b>6.1.6</b>	Solución A de 2-piridil ácido acético 1000 µg/mL.....	18
<b>6.1.7</b>	Solución B de 2-piridil ácido acético 13 µg/mL.....	19
<b>6.1.8</b>	Solución C de 2-piridil ácido acético 1.3 µg/mL.....	19
<b>6.1.9</b>	Solución para evaluar el acarreo analítico 260 ng/mL.	20
<b>6.1.10</b>	Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema 130 ng/mL.....	20
<b>6.1.11</b>	Solución A de Betahistina 500 µg/mL.....	21
<b>6.1.12</b>	Solución B de Betahistina 100 µg/mL.....	21
<b>6.1.13</b>	Solución C de Betahistina 10 µg/mL.....	22
<b>6.1.14</b>	<b>Solución de lavado</b> .....	22
<b>6.1.15</b>	Acetonitrilo frío.....	22
<b>6.1.16</b>	Blanco de fase móvil.....	22
<b>6.1.17</b>	Blanco de reactivos.....	23
<b>6.1.18</b>	Blanco de plasma.....	23
<b>6.2</b>	Preparación de muestras de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en solución.....	23
<b>6.3</b>	Preparación de muestras de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en matriz biológica.....	24

<b>VII. MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA EL 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO EN LA MATRIZ BIOLÓGICA.....</b>	25
<b>VIII. CONDICIONES CROMATOGRAFÍCAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO.....</b>	26
<b>IX. DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.....</b>	27
<b>9.1</b> Evaluación de la selectividad de la corrida analítica.....	27
<b>9.2</b> Evaluación de la adecuabilidad del sistema.....	27
<b>9.3</b> Evaluación del acarreo analítico.....	28
<b>9.4</b> Evaluación de la selectividad.....	28
<b>9.5</b> Linealidad del método.....	29
<b>9.6</b> Límite de cuantificación.....	29
<b>9.7</b> Límite de detección.....	29
<b>9.8</b> Repetibilidad.....	30
<b>9.9</b> Reproducibilidad intra-laboratorio.....	30
<b>9.10</b> Supresión iónica.....	30
<b>9.11</b> Efecto de la reinyección.....	31
<b>9.12</b> Efecto de la dilución.....	31
<b>9.13</b> Estabilidad de la muestra.....	32
<b>9.13.1</b> Ciclos de congelación-descongelación.....	32
<b>9.13.2</b> Temperatura ambiente.....	32
<b>9.13.3</b> En automuestreador.....	33
<b>9.13.4</b> Muestra procesada en refrigeración.....	33
<b>9.13.5</b> A largo plazo en congelación.....	33
<b>9.14</b> Recuperación absoluta.....	34
<b>9.15</b> Tolerancia del método.....	35
<b>X. RESULTADOS.....</b>	36
<b>10.1</b> Ionización del 2-piridil ácido acético.....	36
<b>10.2</b> Selectividad de la corrida analítica.....	37
<b>10.3</b> Adecuabilidad del sistema.....	39

<b>10.3.1</b>	Adecuabilidad del sistema.....	40
<b>10.4</b>	Selectividad del método.....	40
<b>10.5</b>	Linealidad del método.....	44
<b>10.6</b>	Límite de cuantificación.....	46
<b>10.7</b>	Límite de detección.....	47
<b>10.8</b>	Precisión y exactitud.....	48
<b>10.9</b>	Reproducibilidad del método.....	49
<b>10.10</b>	Evaluación del efecto de la reinyección.....	50
<b>10.11</b>	Efecto de la dilución.....	51
<b>10.12</b>	Estabilidad de la muestra.....	54
<b>10.12.1</b>	3 Ciclos de congelación-descongelación.....	54
<b>10.12.2</b>	A temperatura ambiente. Sin procesar.....	55
<b>10.12.3</b>	En automuestreador a 4° C.....	56
<b>10.12.4</b>	Muestra procesada en refrigeración.....	57
<b>10.13</b>	Recuperación total.....	59
<b>10.14</b>	Tolerancias del método analítico.....	61
<b>10.14.1</b>	Cambio en la proporción de fase móvil acuoso: orgánico 65: 35 v/v.....	61
<b>10.14.2</b>	Cambio en la proporción de fase móvil acuoso: orgánico 61: 39 v/v.....	62
<b>10.14.3</b>	Cambio en la temperatura de columna a 52° C.....	63
<b>10.14.4</b>	Cambio en la temperatura de columna a 48° C.....	64
<b>10.15</b>	Estabilidad a largo plazo en congelación a -70° C.....	66
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>XII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	71

# **VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE 2 PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA) MEDIANTE HPLC ACOPLADO A UN DETECTOR MASAS - MASAS.**

## **I. INTRODUCCIÓN**

Betahistina, un análogo estructural de la histamina, es un antagonista potente H3R (receptor de histamina 3) [1,2].

La Betahistina es un fármaco utilizado ampliamente en la enfermedad de Meniere y en el tratamiento del vértigo con origen vestibular periférico. Los estudios preclínicos utilizando un antagonista del H3R para el tratamiento de una variedad de trastornos cognitivos incluyendo el ADHD (desorden hiperactivo de déficit de atención), enfermedad de Alzheimer, y la esquizofrenia [3,4].

El mecanismo por el cual la betahistina presenta sus efectos terapéuticos sigue sin ser claro, pero en estudios recientes sugieren que la betahistina presenta efectos terapéuticos debido a sus propiedades antagonistas en H3R [5,6].

El receptor H3R es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y se ha localizado principalmente en el sistema nervioso central más específicamente en regiones críticas del cerebro para la cognición (corteza e hipocampo), el sueño, y la regulación homeostática (hipotálamo) [10].

Al bloquear el H3R se muestra una mejor liberación de no solo histamina sino también otros neurotransmisores tales como dopamina, norepinefrina y acetilcolina que se sabe que desempeñan un papel clave en la mejora cognición y la atención en pacientes con ADHD [11].

### 1.1 METABOLISMO DE BETAHISTINA

La betahistina es metabolizada por la enzima monoamino oxidasa en 2-piridil ácido acético (2-PAA), el cual se ha demostrado en estudios de metabolismo preclínicos en perros, ratas y conejos [8].

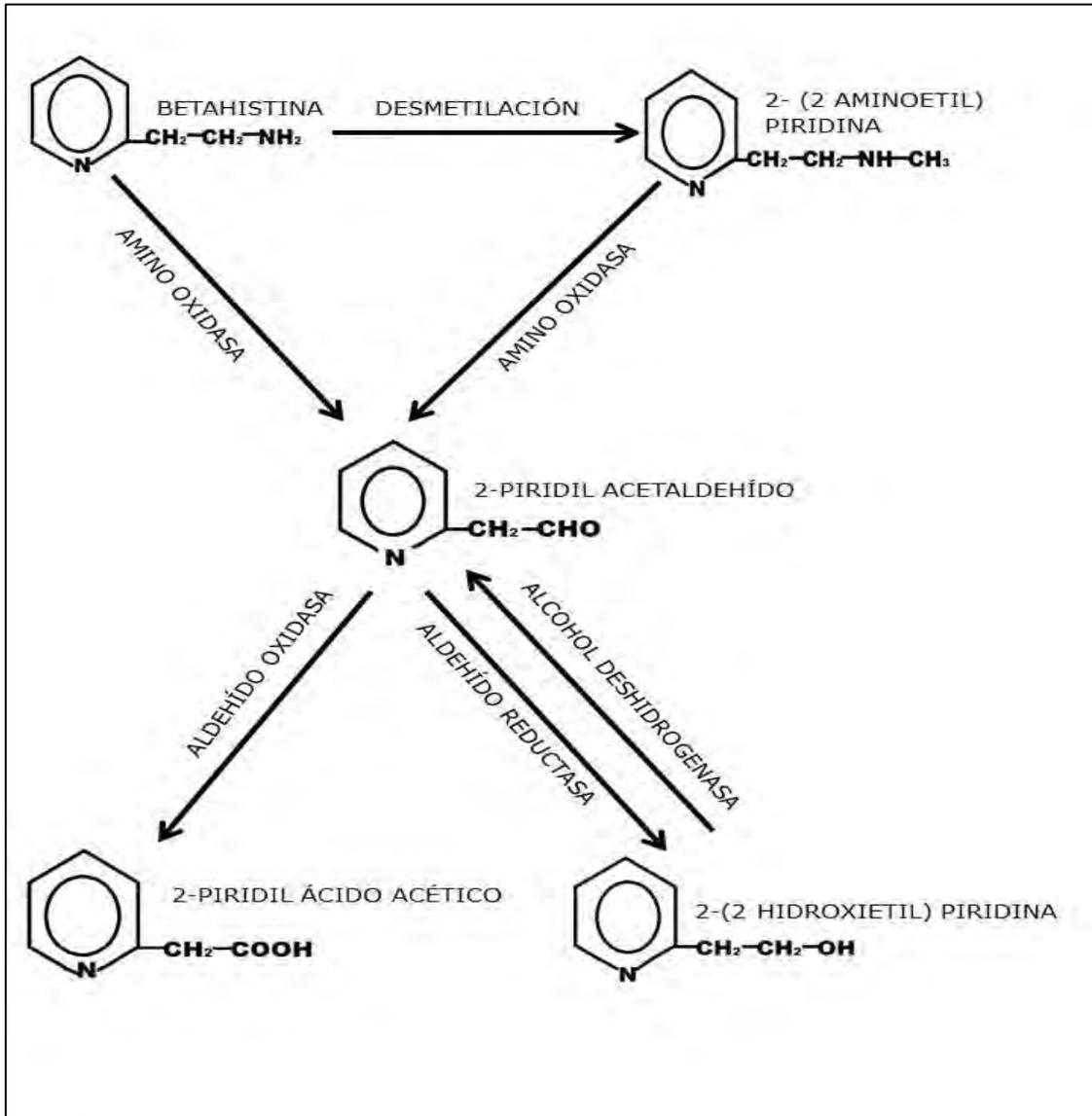


Figura 1. Ruta metabólica de Betahistina y sus metabolitos.

Otros metabolitos de betahistina, 2-(2-aminoetil) piridina y 2-(2-hidroxiethyl) piridina, fueron identificados en los estudios preclínicos en perros y conejos, ambos exhiben actividad farmacológica similar a la betahistina [7, 8 y 9].

Sin embargo, en estudios clínicos 2-PAA es el único metabolito identificado y detectado en plasma comparado con el nivel de detección de betahistina que es bajo o indetectable, lo que sugiere un metabolismo de primer paso completo [12].

La betahistina se absorbe, rápida y completamente, tras su administración por vía oral; los niveles máximos en sangre se alcanzan después de 1 hora de la administración. La vida media es aproximadamente de 3.5 horas. Se excreta, en su mayor parte, por la orina; aproximadamente el 85% es excretado en forma de un metabolito (2-piridil ácido acético) pasadas 24 horas, y la excreción es completa a las 48 horas. La tasa de eliminación de betahistina es constante, lo que indica que su farmacocinética es lineal y que la vía metabólica involucrada en la excreción no es saturable [13].

**Tabla 1.** Dosificación de la Betahistina.

<b>DOSIS</b>	<b>8mg</b>	<b>16 mg</b>	<b>24 mg</b>
<b>En niños</b>		No se recomienda su uso en menores de 18 años.	
<b>En adultos</b>	1-2 tabletas 3 veces al día	2-3 tabletas al día según tratamiento	1 tableta 2 veces al día
<b>En geriátricos</b>		No se requiere ajuste en su dosificación.	

**Tabla 2.** Parámetros farmacocinéticos de 2-piridil ácido acético en plasma humano tras la administración de diversas dosis. [19,20]

<b>Parámetros</b>	<b>16 mg</b>	<b>24 mg</b>
<b>C<sub>Max</sub> (ng*ml<sup>-1</sup>)</b>	511.00 ± 142.49	1047.70±389.70
<b>T<sub>Max</sub> (h)</b>	0.75 ± 0.32	0.93 ± 0.61

## **1.2 REACCIONES ADVERSAS.**

Frecuentes Cefaleas y náuseas.

Trastornos del sistema inmune: reacciones de hipersensibilidad (anafilaxia).

Trastornos gastrointestinales: Se han reportado molestias gástricas leves (vómito, dolor abdominal, distensión e inflamación intestinal) las cuales pueden evitarse al tomar el medicamento durante las comidas o al disminuir la dosis.

Trastornos de la piel y tejido subcutáneo: Se han reportado reacciones de hipersensibilidad como edema angioneurótico, urticaria, exantema y prurito [13].

## **1.3 TOXICIDAD.**

### **1.3.1 Toxicidad aguda.**

La DL<sub>50</sub> oral (dosis letal<sub>50</sub> es la cantidad de compuesto, dada en una dosis única, la cual causa la muerte de 50% de un grupo de animales de ensayo) para Diclorhidrato de Betahistina es 3,040 mg / kg en la rata albina. La DL<sub>50</sub> intravenosa es de 5,1 mg / kg en el conejo. Los efectos secundarios en el sistema nervioso se observaron en perros y

babuinos después de dosis intravenosas en y por encima de 120 mg / kg.

Los signos de toxicidad incluyen ataxia, salivación, inactividad, temblores, y cianosis.

Gastroenteritis severa se observó durante la patología.

### **1.3.2 Toxicidad a largo plazo.**

En rata y perro. En un estudio de seis meses, los perros recibieron dosis de hasta 25 mg / kg / día.

No se observaron anomalías en cualquiera de los parámetros evaluados. En las ratas que recibieron dosis de hasta 500 mg / kg / día durante 18 meses, no hubo alteraciones significativas observadas en cualquiera de los parámetros evaluados. La dosificación oral de y por encima de 250 mg / kg, en perros y en ratas, respectivamente, de Diclorhidrato de betahistina administrada durante 3 meses no dio lugar a efectos adversos.

En estudios de investigación con Diclorhidrato de betahistina en ratas durante 6 meses con dosis a partir de 13 mg / kg y superiores, se informó de hiperemia en algunos tejidos como el hígado, el bazo y los riñones. Los datos presentados en la literatura son limitados, por lo tanto, el impacto de este hallazgo no es claro.

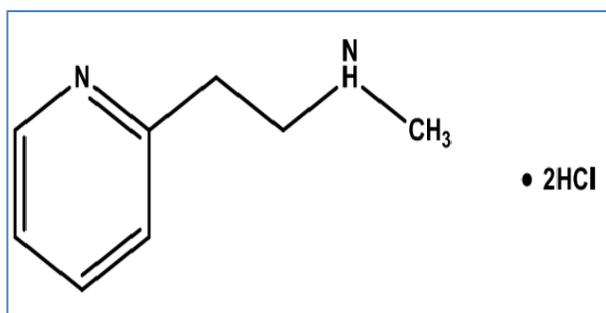
### **1.4 MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENESIS.**

En los estudios realizados con Diclorhidrato de betahistina, no han sido observados efectos mutagénicos.

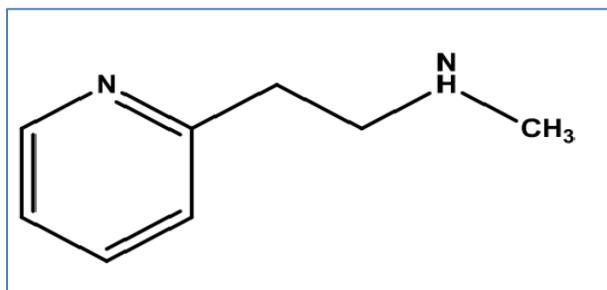
En dos estudios de toxicidad crónica a 18 meses en ratas no hubo indicios de ningún tumor, neoplasia o hiperplasia en el examen

histopatológico. Por lo tanto, Diclorhidrato de betahistina hasta una dosis de 500 mg / kg no mostró ninguna evidencia de carcinogenicidad [14].

### **1.5 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE BETAHISTINA.**



**Figura 2.** Estructura química de Diclorhidrato de Betahistina [18].



**Figura 3.** Estructura química de Betahistina.

---

DICLORHIDRATO DE  
BETAHISTINA

---

Diclorhidrato de  
2-[2(metilaminotilamino)etil]  
piridina

---

Formula química  $C_8H_{12}N_2 \cdot 2HCl$

---

Masa molecular 209.1 g/mol

---

Aspecto sólido blanco cristalino  
a blanco muy higroscópico.

---

Solubilidad, es muy soluble en  
agua, en metanol y ligeramente  
soluble en isopropanol

---

pKas son: 3.5 y 9.7

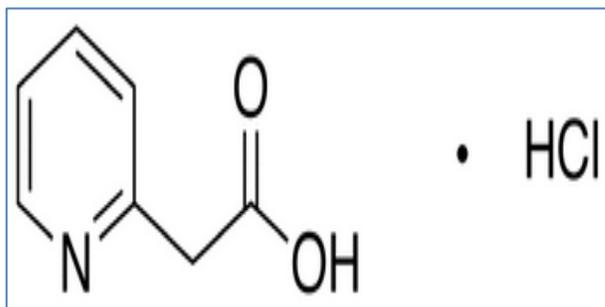
---

La sustancia se funde a unos  
152 °C

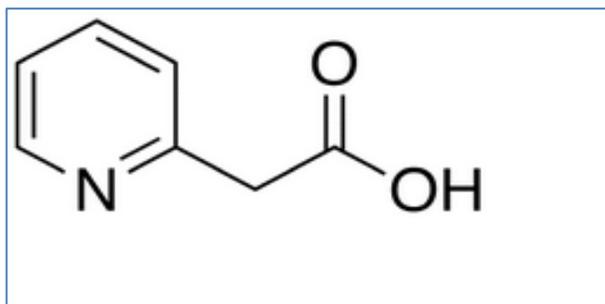
---

La solución debe protegerse de  
la luz.

## 1.6 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA)



**Figura 4.** Estructura química de Clorhidrato de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina). [17]



**Figura 5.** Estructura química del 2-piridil ácido acético.

CLORHIDRATO DE  
2-PIRIDIL ACIDO ACETICO.

2-(Piridin-2-il) ácido acético  
Hidroclorhidrato

Fórmula química  $C_7H_8ClNO_2$

Masa molecular 173.6 g/mol

Aspecto sólido blanco cristalino  
a blanco higroscópico.

Solubilidad es soluble en  
metanol

La sustancia funde a unos  
158-160°C

La solución debe protegerse de  
la luz

## **2. LA IMPORTANCIA DE VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO**

La validación de un método consiste en verificar y documentar su validez, es decir su adecuación a unos requisitos determinados, establecidos previamente por el usuario, para resolver un problema en particular.

Según la NOM 177-SSA1-1998. Norma oficial mexicana 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, numeral 9. [15], es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

Los laboratorios deben validar todos los métodos que utilicen, tanto los desarrollados en el mismo ámbito, como aquellos obtenidos de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios.

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de aplicación. La validación debe incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte, de manera de asegurar la integridad y representatividad de las muestras.

La validación de los métodos bioanalíticos es un procedimiento utilizado para demostrar que un método analítico, utilizado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica, es fiable y reproducible para lograr su propósito, o sea para cuantificar el analito con un grado de exactitud y precisión.

De acuerdo a lo establecido en la normativa, se debe hacer una descripción detallada y específica del método bioanalítico. Los parámetros de validación deben estar definidos en un protocolo, en un plan de estudio o un procedimiento normalizado de operación, junto

con los criterios de aceptación, previo a la ejecución de los experimentos: selectividad, linealidad, límite inferior de cuantificación, precisión, exactitud, reproducibilidad y la evaluación de la estabilidad de la muestra.

### **2.1 LOS PARÁMETROS ESENCIALES, PARA ASEGURAR LA CONFIABILIDAD EN EL DESEMPEÑO DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO**

**2.1.1 Rango** se define como rango de un procedimiento analítico al intervalo, entre la concentración superior e inferior del analito, para las que sea demostrado que el procedimiento analítico cumple con los requisitos de precisión, exactitud y función respuesta.

**2.1.2 Recuperación absoluta** indica la eficacia en la extracción del analito a partir de la matriz biológica. El conocimiento de la recuperación no es esencial para la validación de un método. La evaluación de este parámetro permite analizar si existen pérdidas del analito y si estas existen nos permite plantear una mejora en el método si esto es necesario.

**2.1.3 Linealidad** es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad de analito que se habrá de determinar en la muestra.

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar linealidad es el coeficiente de correlación ( $r$ ), este indica el grado de relación entra la variable concentración ( $X$ ) y la variable respuesta ( $Y$ ) de la curva de calibración.

**2.1.4 Sensibilidad** es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad del objeto de la medición. En una curva de calibración la sensibilidad corresponde a la pendiente (m).

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.

### **2.1.5 Precisión y exactitud**

La precisión de un método analítico está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia o grado de dispersión, entre los resultados del ensayo individual. En general la precisión se expresa como coeficiente de variación (C.V.), desviación estándar (D.E), varianza, desviación estándar relativa (D.E.R).

Normalmente se evalúa a dos niveles: intra-ensayo donde se evalúan estos parámetros en una serie analítica, e inter-ensayo, donde se evalúan estos parámetros con el tiempo en diferentes series analíticas y puede implicar diferentes analistas, equipos, etc.

- Repetibilidad
- Reproducibilidad

La exactitud de un método analítico expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor convencional verdadero o como un valor de referencia aceptado, y el valor obtenido al aplicar el método analítico. La exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, el valor promedio de las determinaciones entre cada nivel de concentración de

los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15 \%$  del valor nominal de concentración.

**2.1.6 Estabilidad** esta debe establecerse en la matriz biológica tanto en condiciones de almacenamiento previstas, así como operativas.

- Estabilidad de ciclos congelación-descongelación
- Estabilidad a corto plazo
- Estabilidad a largo plazo
- Estabilidad de las muestras procesadas

**2.1.7 Selectividad** se define como la capacidad del método para medir y diferenciar al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz.

Generalmente, se utiliza para un método que produce repuestas para diferentes analitos y puede distinguir entre ellos, es decir que mide exactamente un analito en presencia de interferencias.

**2.1.8 Límite de cuantificación** es la concentración más baja del analito que puede cuantificarse con la precisión y exactitud establecidas en el método.

**2.1.9 Límite de detección** es la mínima concentración de un analito que en el procedimiento bioanalítico se puede diferenciar de la línea base (ruido) de manera confiable. No necesariamente cuantificable.

**2.1.10 Tolerancia** es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal.

Una vez concluida la validación del método bioanalítico viene la entrega del informe de validación, documento donde se establece la aplicabilidad del método analítico; que consiste en una declaración de las especificaciones del rendimiento sobre el método ya sea satisfactorio y/o de advertencia sobre alguna interferencia o de la inaplicabilidad en determinadas matrices y condiciones [16].

### **II. OBJETIVO:**

Realizar la validación de un método analítico para cuantificar 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas – masas.

### **III. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Establecer las condiciones para la separación cromatográfica del 2-piridil ácido acético en la matriz biológica.

Establecer las condiciones para la extracción del 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Validar el método analítico de acuerdo a la Norma oficial mexicana NOM 177- SSA1- 1998. [15]

### **IV. JUSTIFICACIÓN:**

Contando con la validación del método analítico para la cuantificación de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en matriz biológica es posible realizar la cuantificación de este compuesto en muestras provenientes de un estudio de bioequivalencia.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS**

- Multi-tube vortexer VWR DVX-2500
- Centrifuga refrigerada HETTICH Rotina 35R
- Ultracongelador REVCO ULT2186-6-A4G
- Refrigerador TORREY VRD 18
- Agitador vórtex Maxi Mix II M37615
- Sonicador Branson Bransonic 3510R-MT
- Bomba de vacío Gast GE 6523-UV6588-DX
- Evaporador Zymarck Turbo vap LV
- Estufa de vacío Sheldon 1408
- Campana de extracción ESCO EQU/04EDFC
- Balanza analítica KERN 770-12
- Balanza granataría KERN PRJ620-3M
- Cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1290 infinity
- Bomba binaria modelo G4220A serie DE92900555
- Termostato modelo G1330B serie DEBAK02830
- Inyector modelo G4226A serie DE93000270
- Termostato de columna modelo G1316C serie DE93000568
- Detector masas-masas triple cuadrupolo modelo G6430A serie US94870347.
- Software Mass Hunter Workstation, LC/MS Data acquisition, versión B.04.01 para series triple cuadrupolo 64000
- Micropipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  Eppendorf Reference
- Micropipeta 10-100  $\mu\text{L}$  Eppendorf Reference
- Pipeta repetitiva 1-10000  $\mu\text{L}$  Multipette plus Eppendorf
- Termómetro de líquido en vidrio HB Sin modelo
- Columna cromatográfica: Zorbax SB C8 4.6x75 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula.

## **5.2 SUSTANCIAS DE REFERENCIA**

- Clorhidrato de betahistina, Procedencia USP, pureza 100%, Lote G0H384.
- Clorhidrato de 2- piridil ácido acético (metabolito de betahistina), Procedencia TRC, pureza 98.0%, Lote 12-SSR-177-1.

## **5.3 REACTIVOS**

- ❖ Agua HPLC J.T. Baker
- ❖ Ácido fórmico Reactivo Fluka
- ❖ Metanol HPLC J.T. Baker
- ❖ Hidróxido de amonio Reactivo J.T. Baker
- ❖ Acetato de amonio Reactivo J.T. Baker
- ❖ Acetonitrilo HPLC J.T. Baker

## **5.4 MATERIAL**

- Probetas graduadas de 100 y 1000 mL
- Frascos reservorios de vidrio de 100, 500 y 1000mL
- Frascos reservorios de plástico de 25 mL
- Espátula metálica
- Vasos de precipitados de 10, 100 y 1000 mL
- Unidad de ultrafiltración
- Tubos de ensayo lisos de vidrio de 13x100 mm
- Gradillas para tubos de ensayo de 13x100 mm
- Gradillas para tubos tipo eppendorf
- 5 Matraces volumétricos de 10 mL
- 3 Matraces volumétricos de 20 mL
- 1 Matraz volumétrico de 1000 mL
- Pipetas Pasteur de plástico desechable
- Papel glassil
- **Tubo de plástico tipo "Eppendorf" de 1.5 mL**

- Puntas para pipeta repetidora eppendorf de 0.5, 5 y 10 mL
- Criotubos de 50 mL
- Puntas para micropipeta de 10-100 y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Membranas de 0.45 micras para unidad de ultrafiltración
- Microviales e insertos para cromatógrafo

### **5.5 MATRIZ BIOLÓGICA**

La matriz biológica a utilizar es plasma humano. Debe obtenerse previamente una mezcla de plasma de mínimo 6 voluntarios de un banco de sangre con pruebas de bioseguridad. Se agita cada uno de los tubos con plasma de manera manual, se vierten todos en un vaso de precipitado, se mezclan, se filtran y se almacenan en criotubos de 50 mL, en el ultracongelador REVCO a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.**

#### **6.1.1 ACETATO DE AMONIO 10 mM**

Pesar 0.803 g de acetato de amonio (Lote: X34C17, pureza: 97.3 % y humedad: 1.4%) y depositarlo en un matraz volumétrico de 1000 mL el cual contiene aproximadamente 700 mL de agua grado HPLC, solubilizar y llevar a volumen con el mismo disolvente, filtrar y depositar en un frasco reservorio etiquetado de 1000 mL. Finalmente desgasificar durante 10 minutos.

Dónde:

$$1000mL \frac{0.01mol}{1000mL} \left( \frac{77.08g}{1mol} \right) \left( \frac{100\%}{100\% - 1.4\%} \right) \left( \frac{100\%}{97.3\%} \right) = 0.803g$$

Equivalente a 0.803 g de acetato de amonio

#### **6.1.2 SOLUCIÓN DE METANOL: AGUA 70:30% v/v.**

Medir 70 mL de metanol grado HPLC en una probeta graduada de 100 mL, depositar este volumen en un frasco reservorio previamente rotulado de 100 mL. Utilizando la misma probeta graduada, medir 30 mL de agua grado HPLC y depositarla en el frasco reservorio que contiene el metanol previamente medido. Finalmente mezclar.

#### **6.1.3 SOLUCIÓN ÁCIDA DE AGUA: METANOL 65:35% v/v.**

Medir 650 mL de agua grado HPLC en una probeta graduada de 1000 mL, depositar este volumen en un frasco reservorio previamente rotulado de 1000 mL. Utilizando la misma probeta graduada, medir

350 mL de metanol grado HPLC y depositarla en el frasco reservorio que contiene el agua previamente medido. Finalmente adicionar un mL de ácido fórmico concentrado y mezclar.

### **6.1.4 FASE MÓVIL.**

#### **(SOLUCIÓN ÁCIDA DE AGUA: METANOL, 65:35 v/v): ACETATO DE AMONIO 10 mM, 63:37% v/v**

Medir 630 mL de solución ácida de agua: metanol 65:35% v/v en una probeta graduada de 1000 mL, depositar este volumen en un frasco reservorio previamente rotulado de 1000 mL. Utilizando la misma probeta graduada, medir 370 mL de solución de acetato de amonio 10 Mm, depositarla en el frasco reservorio que contiene la solución ácida de agua: metanol 65:35% v/v previamente medida. Finalmente filtrar y desgasificar.

### **6.1.5 SOLUCIÓN DE RECONSTITUCIÓN.**

#### **(SOLUCIÓN ÁCIDA DE METANOL: AGUA, 80:20% v/v)**

Medir 80 mL de metanol grado HPLC en una probeta graduada de 100 mL, depositar este volumen en un frasco reservorio etiquetado de 100 mL. Utilizando la misma probeta graduada, medir 20 mL de agua grado HPLC y depositarla en el frasco reservorio que contiene el metanol previamente medido y adicionar 0.1 mL de ácido fórmico. A continuación mezclar.

### **6.1.6 SOLUCIÓN "A" DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA). CONCENTRACIÓN DE 1000 µg/mL**

Pesar 12.9 mg de clorhidrato de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), con pureza de 98.0 % (equivalente a 10 mg de 2-piridil ácido acético base), transferir a un matraz volumétrico de 10 mL,

llevar a volumen con solución de metanol: agua 70:30% v/v. Esta solución tiene una concentración de 1000 µg/mL de 2-piridil ácido acético base (metabolito de betahistina).

Datos del estándar (Los datos fueron tomados directamente del frasco contenedor). Clorhidrato 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), Marca: TRC, Lote: 12-SSR-177-1, Ensayo: 98.0 %

Dónde:

$$10mg \left( \frac{100\%}{98\%} \right) \left( \frac{173.6mg/mol}{137.14mg/mol} \right) = 12.9mg$$

Equivalente a 0.0129 g de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina)

### **6.1.7 SOLUCIÓN "B" DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA). CONCENTRACIÓN DE 13 µg/mL**

Transferir 0.260 mL de la solución "A" de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) de concentración de 1000 µg/mL, a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con la solución de metanol: agua 70:30% v/v. Esta solución tiene una concentración de 13 µg/mL de 2-piridil ácido acético base (metabolito de betahistina).

### **6.1.8 SOLUCIÓN "C" DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA). CONCENTRACIÓN DE 1.3 µg/mL**

Transferir 0.1 mL de la solución "B" de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) de concentración de 13 µg/mL, a un tubo de plástico tipo eppendorf de 1.5 mL el cual contiene 0.9 mL de solución de metanol: agua 70:30% v/v, a continuación agitar. Esta

solución tiene una concentración de 1.3 µg/mL de 2-piridil ácido acético base.

### **6.1.9 SOLUCIÓN PARA EVALUAR EL ACARREO ANALÍTICO.**

2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO CONCENTRACIÓN DE 260 ng/mL

Transferir de 0.2 mL de la solución "B" de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) de concentración de 13 µg/mL, a un matraz volumétrico de 10 mL.

Finalmente, llevar a volumen con solución ácida metanol: agua 80:20% v/v. Solución de reconstitución.

Esta solución tiene una concentración de 260 ng/mL de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Esta solución, colocarla en un frasco reservorio de plástico de 25 mL etiquetado y mantenerla en refrigeración, previamente a su utilización se coloca a temperatura ambiente.

### **6.1.10 SOLUCIÓN PARA EVALUAR LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.**

2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO CONCENTRACIÓN DE 130 ng/mL

Transferir 0.1 mL de la solución "B" de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) de concentración de 13 µg/mL, a un matraz volumétrico de 10 mL. Finalmente, llevar a volumen con solución ácida de metanol: agua 80:20% v/v. Solución de reconstitución.

Esta solución tiene una concentración de 130 ng/mL de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Esta solución, colocarla en un frasco reservorio de plástico de 25 mL etiquetado y mantenerla en refrigeración, previamente a su utilización se coloca a temperatura ambiente.

### **6.1.11 SOLUCIÓN "A" DE BETAHISTINA. CONCENTRACIÓN DE 500 µg/mL**

Pesar 15.4 mg de clorhidrato de betahistina, con pureza de 100.0 % (equivalente a 10 mg de betahistina base), previamente secada durante 4 horas a 105 °C, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con solución de metanol: agua 70:30% v/v. Esta solución tiene una concentración de 500 µg/mL de betahistina base.

**NOTA 2: Betahistina es fotosensible por lo tanto fue manipulada bajo luz ámbar.**

Datos del estándar (Los datos fueron tomados directamente del frasco contenedor). Clorhidrato de betahistina, Marca: USP, Lote: GOH384, Pureza: 100.0 %

Dónde:

$$10mg \left( \frac{209.1mg/mol}{136.2mg/mol} \right) = 15.4mg$$

Equivalente a 0.01540 g de betahistina

### **6.1.12 SOLUCIÓN "B" DE BETAHISTINA. CONCENTRACIÓN DE 100 µg/mL**

Transferir 2 mL de la solución "A" de betahistina, de concentración de 500 µg/mL, a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con solución de metanol: agua 70:30% v/v. Esta solución tiene una concentración de 100 µg/mL de betahistina base.

### **6.1.13 SOLUCIÓN "C" DE BETAHISTINA. CONCENTRACIÓN DE 10 µg/mL**

EVALUACION DE LA SELECTIVIDAD DEL METODO PARA BETAHISTINA

Transferir 0.1 mL de la solución "B" de betahistina de concentración de 100 µg/mL, a un tubo de plástico tipo eppendorf de 1.5 mL el cual contiene 0.9 mL de plasma. Esta solución tiene una concentración de 10 µg/mL de betahistina.

### **6.1.14 SOLUCIÓN DE LAVADO. (HIDRÓXIDO DE AMONIO AL 0.1% v/v)**

Medir 1000 mL de agua grado HPLC en una probeta graduada de 1000 mL, depositar este volumen en un frasco reservorio previamente rotulado de 1000 mL. Adicionar un mL de hidróxido de amonio concentrado y depositarla en el frasco reservorio que contiene el agua previamente medida. Finalmente mezclar.

### **6.1.15 ACETONITRILO FRÍO.**

En un frasco reservorio de 100 mL previamente etiquetado depositar 80 mL de acetonitrilo grado HPLC y colocarlo dentro del refrigerador por lo menos durante 3 horas antes de su empleo.

Una vez que se vaya a utilizar, mantenerlo a una temperatura de entre 2 a 8° C en baño de hielo.

### **6.1.16 BLANCO DE FASE MÓVIL**

Depositar 0.5 mL de fase móvil y transferir a un vial para cromatógrafo e inyectar. La alícuota se toma del frasco reservorio del cromatógrafo.

**6.1.17 BLANCO DE REACTIVOS**

Depositar una alícuota de 0.1 mL de la solución de reconstitución en un vial para cromatógrafo, e inyectar.

**6.1.18 BLANCO DE PLASMA**

Tomar 100 µL de plasma, a continuación someter al método de extracción de muestras biológicas, desde la adición de acetonitrilo.

**6.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA) EN SOLUCIÓN.**

Con las soluciones "B" y "C" de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) preparadas a concentraciones de 13 y 1.3 µg/mL, preparar las soluciones que se indican en la siguiente tabla llevando a un volumen final de 1000 µL

**Tabla 3.** Preparación de las muestras en solución de 2-PAA

SOLUCIÓN	ALICUOTA DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA)		ALÍCUOTA MATANOL:AGUA 70:30% V/V (µL)	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL DE 2- PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA) EN SOLUCIÓN (ng/mL)
	Solución "B" de 13 µg/mL (µL)	Solución "C" de 1.3 µg/mL (µL)			
1 (CC-1)		100	900	1000	130
2 (CC-2)		200	800		260
3 (control)		300	700		390
4 (CC-3)	100		900		1 300
5 (CC-4)	300		700		3 900
6 (control)	500		500		6 500
7 (CC-5)	600		400		7 800
8 (CC-6)	700		300		9 100
9 (control)	800		200		10 400
10 (CC-7)	1000				13 000

**6.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO EN MATRIZ BIOLÓGICA.**

A partir de las soluciones preparadas anteriormente, preparar las muestras para la curva de calibración y muestras control en plasma como sigue:

**Tabla 4.** Preparación de las muestras en matriz biológica de 2-PAA.

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>ALÍCUOTA 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA) EN SOLUCIÓN</b>	<b>ALÍCUOTA DE PLASMA (<math>\mu</math>L)</b>	<b>VOLUMEN FINAL EN PLASMA (mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO (METABOLITO DE BETAHISTINA) EN PLASMA (ng/mL)</b>
<b>CURVA DE CALIBRACIÓN</b>				
<b>1 (CC-1)</b>	100	900		13
<b>2 (CC-2)</b>	100	900		26
<b>4 (CC-3)</b>	100	900		130
<b>5 (CC-4)</b>	100	900	1000	390
<b>7 (CC-5)</b>	100	900		780
<b>8 (CC-6)</b>	100	900		910
<b>10 (CC-7)</b>	100	900		1300
<b>MUESTRAS CONTROL</b>				
<b>3 (control bajo)</b>	100	900		39
<b>6 (control medio)</b>	100	900	1000	650
<b>9 (control alto)</b>	100	900		1040

**VII. MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA EL 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO EN LA MATRIZ BIOLÓGICA.**

En un tubo de plástico tipo "eppendorf" de 1.5 mL, depositar:

- 0.1 mL de plasma humano (plasma previamente preparada 90:10 v/v plasma-solución de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina))
- Agregar 0.15 mL de acetonitrilo frío
- Agitar en multi-tube vortex a 2500 rpm por 1 minuto
- Centrifugar a 15000 rpm, a 15 °C durante 5 minutos
- Recuperar 0.2 mL del sobrenadante y transferir a un tubo de ensayo de 13x100 mm
- Evaporar bajo corriente de nitrógeno a 40 °C durante 13 minutos
- Reconstituir el residuo con 0.2 mL de solución metanol: agua 80:20 v/v y 0.1% de ácido fórmico
- Transferir 100 µL del sobrenadante a un vial con inserto
- Inyectar 3 µL al sistema cromatográfico.

**VIII. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO**

- ✓ Fase Móvil: (solución ácida de agua: metanol, 65:35 v/v): acetato de amonio 10mM, 63:37 % v/v
- ✓ Columna cromatográfica: Zorbax SB C8 4.6x75 mm, 3.5  $\mu$ m tamaño de partícula
- ✓ Precolumna cromatográfica: Phenomenex SecurityGuard Cartridges C18, 4.0 x 2.0 mm
- ✓ Temperatura de columna cromatográfica: 50° C
- ✓ Flujo de fase móvil: 0.7 mL/min
- ✓ Temperatura del autoinyector (automuestreador): 4° C
- ✓ Modo: ESI positivo
- ✓ Transición: 138.3/92.2 m/z, para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina)
- ✓ Voltaje del fragmentador: 70 V, para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina)
- ✓ **Temperatura de gas de secado: 350° C**
- ✓ Flujo de gas de secado: 12 L/min
- ✓ Presión del nebulizador: 50 psig
- ✓ Voltaje del capilar: 1500 V
- ✓ Energía de colisión: 22 V, para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina)
- ✓ Volumen de inyección: 3  $\mu$ L
- ✓ **Lavado de aguja: modo "flush" durante 10 segundos con solución de hidróxido de amonio 0.1 % (v/v)**

**IX. DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.**

**9.1. Evaluación de la selectividad de la corrida analítica (reactivos, fase móvil y matriz biológica).**

Preparar e inyectar las siguientes muestras: muestra blanco de fase móvil, muestra blanco de reactivos y muestra blanco de la mezcla de la matriz biológica.

Criterio de aceptación.

No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Si existen interferencias estas deben ser menores al 10 % de las respuestas encontradas para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), en la muestras de concentración más baja de la curva de calibración.

**9.2. Evaluación de la adecuabilidad del sistema.**

Inyectar en cada día de análisis muestras en solución que contengan 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), de la solución de concentración 130 ng/mL.

Inyectar seis inyecciones consecutivas de la solución de 130 ng/mL de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Criterio de aceptación (Ver nota 1).

Tiempo de retención % C.V.  $\leq 2.0$  %

Respuesta cromatográfica % C.V.  $\leq 7.0$

**NOTA 1. Estos valores son establecidos de manera interna en el laboratorio a realizar dicho análisis.**

### 9.3. Evaluación del acarreo analítico.

Preparar, procesar e inyectar: un blanco de sistema (fase móvil o reconstituyente), una muestra que contenga 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), a una concentración de 260 ng/mL en solución, en donde se obtenga aproximadamente la misma respuesta que se obtiene en la concentración más alta en matriz biológica de la curva de calibración, seguido de un blanco de sistema.

Evaluar la presencia de interferencias en los blancos de sistema en el tiempo de retención de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

Criterio de aceptación.

No deben observarse interferencias en los blancos de sistema, en el tiempo de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

### 9.4. Evaluación de la selectividad.

Establecer la selectividad del método analizando muestras blanco de la matriz biológica contra posibles interferencias. Con la evaluación de interferencias en plasma obtenido de una mezcla de mínimo 6 donadores, así como plasma lipémico, plasma hemolizado, posibles interferencias con heparina y EDTA y betahistina estas por duplicado.

Criterio de Aceptación.

No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina). Si existen interferencias estas deben ser menores al 10 % de las respuestas encontradas para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), en la muestras de concentración más baja de la curva de calibración en matriz biológica.

### **9.5 Linealidad del Método.**

Las curvas de calibración se establecieron en función de las concentraciones esperadas del compuesto a analizar durante el análisis de las muestras. Está constituida por siete concentraciones distintas 13, 26, 130, 390, 780, 910, 1300. La linealidad del método se definirá por el modelo matemático de  $1/y^2$ , que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración.

Criterio de Aceptación.

Los valores de exactitud obtenidos deben de estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 15%. Salvo para el límite de cuantificación que se permite hasta 20%.

### **9.6 Límite de cuantificación.**

Analizar por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración.

Criterio de Aceptación.

El valor promedio debe de estar dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 20%.

### **9.7 Límite de detección.**

Analizar por quintuplicado dos diferentes concentraciones menores al límite de cuantificación.

Criterio de Aceptación.

Se establece que el límite de detección es al menos tres veces mayor a la relación señal/ruido.

### **9.8 Repetibilidad.**

Analizar en un mismo día, por quintuplicado, tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del compuesto por analizar en la matriz biológica diferentes a las de la curva de calibración pero incluidas en el intervalo de ésta y correspondientes a 39, 650 y 1040 ng/mL.

Criterio de Aceptación.

Precisión: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

### **9.9 Reproducibilidad intralaboratorio.**

Analizar por triplicado durante tres días, tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (39, 650 y 1040 ng/mL respectivamente) del compuesto por analizar en la matriz biológica, diferentes a las de la curva de calibración pero incluidas en el intervalo.

Criterio de Aceptación.

Precisión: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Exactitud: El valor promedio de las determinaciones de cada nivel de la concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de cada concentración.

### **9.10 Supresión iónica.**

Analizar inyecciones consecutivas de solución de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) a una determinada concentración en donde se observa una respuesta cromatográfica aproximadamente igual a la obtenida en el punto alto de la curva de calibración en matriz biológica, intercaladas por un blanco de fase móvil, un blanco de reactivos, y un blanco de la matriz biológica empleada.

Criterio de Aceptación.

La línea base de todos los blancos no debe presentar inflexiones positivas ni negativas significativas en el tiempo de retención de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

### **9.11 Efecto de la re-inyección.**

Analizar por triplicado en tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (39, 650 y 1040 ng/mL respectivamente) del compuesto por analizar en la matriz biológica, diferentes a las de la curva de calibración pero incluidas en el intervalo de calibración, estas muestras son sometidas a la metodología de extracción; son inyectadas al inicio y al final de la corrida analítica.

Criterio de Aceptación.

Precisión: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Exactitud: El valor promedio de las determinaciones de cada nivel de la concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor inicial de concentración.

### **9.12 Efecto de dilución.**

Analizar por sextuplicado muestras control alto de 1040 ng/mL al doble de concentración en la matriz biológica (2080 ng/mL), diluidas en proporción 50:50 (1:1) y 25:75 (1:3) con la misma matriz biológica; estas muestras son sometidas a la metodología de extracción. Al final se calcula la concentración recuperada (concentración medida) multiplicándolas por el factor de dilución para obtener la concentración final.

Criterio de Aceptación.

Precisión: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Exactitud: El valor promedio de las determinaciones de concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

### **9.13 Estabilidad de la muestra.**

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Preparar muestras por triplicado, a tres niveles de concentración: baja, media y alta. Para esto se consideraran las siguientes condiciones:

#### **9.13.1 Condiciones de almacenamiento (Ciclos de congelación-descongelación)**

Evaluar la estabilidad del compuesto por analizar preparando al menos por triplicado muestras a tres niveles de concentración baja, media y alta. Posteriormente almacenar a la temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Transcurrido ese periodo, descongelar las muestras completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por otras 24 horas a la misma temperatura. Repetir dos veces más el ciclo congelación-descongelación y posteriormente analizar las muestras en el tercer ciclo.

#### **9.13.2 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.**

Preparar al menos por triplicado muestras de concentración conocida: baja, media y alta del rango de calibración, congelar todas las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$  y analizar para obtener el tiempo inicial. El resto de las muestras mantener a temperatura ambiente durante 24 horas, posteriormente someter al método de extracción y analizar.

### **9.13.3 Estabilidad en el automuestreador.**

Evaluar la estabilidad de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) durante el máximo tiempo que dura su análisis. Las muestras se someten a un periodo de 24, 48, 72, etc., horas dentro del automuestreador.

### **9.13.4 Estabilidad de la muestra procesada en refrigeración.**

Preparar al menos por triplicado muestras de concentración conocida: baja, media y alta del rango de calibración, someter al método de extracción hasta la evaporación del solvente orgánico, posteriormente mantener en condiciones de refrigeración. Transcurridas 24 horas, terminar el proceso de extracción (reconstitución de la muestra), transferir a un microvial e inyectar.

### **9.13.5 Estabilidad a largo plazo en congelación.**

Preparar muestra suficiente en la matriz biológica a concentraciones baja, media y alta de 2-piridil-ácido acético (metabolito de betahistina). Almacenar en el ultracongelador a -70 °C. El día de preparación, procesar y analizar un blanco de la matriz biológica, una curva de calibración y una serie de muestras control recién preparadas, a concentración baja, media y alta cada una por triplicado, para obtener el tiempo inicial (tiempo cero). A cada tiempo establecido (30 y 60 días y en caso de requerir mayor tiempo, evaluar más días), sacar una serie de muestras control del ultracongelador procesar e inyectar al cromatógrafo de líquidos, junto con un blanco de la matriz biológica y una curva de calibración del día.

Criterio de Aceptación.

Se considera que el compuesto es estable en las diferentes condiciones evaluadas si los resultados obtenidos cumplen con los criterios de:

Precisión: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Exactitud: El valor promedio de las determinaciones de cada nivel de la concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor inicial de concentración (el valor de referencia para la temperatura ambiente).

### 9.14 Recuperación absoluta (recobro).

Evaluar el recobro de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), obtenido con el método de extracción empleado. Se comparan las respuestas (áreas) obtenidas por el método de extracción con respecto a las muestras de las soluciones de estándares a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto.

**Tabla 5.** Concentración de 2-PAA en plasma y solución para la evaluación del recobro.

<b>Muestras</b>	<b>Concentración en muestras plasmáticas (ng/mL)</b>	<b>Concentración en muestras en solución (ng/mL)</b>
<b>Control Bajo</b>	39	39
<b>Control Medio</b>	650	650
<b>Control Alto</b>	1040	1040

Criterio de Aceptación.

El recobro no deberá de ser de 100% necesariamente, sin embargo debe de cumplir con los criterios de exactitud de  $\pm 15\%$  y precisión  $\leq 15\%$ .

### 9.15 Tolerancia del Método.

Evaluar la tolerancia del método analítico ante cambios deliberados en la proporción de la fase móvil y la temperatura de la columna cromatográfica.

Criterio de Aceptación.

El método es tolerable a dichos cambios si cumple con:

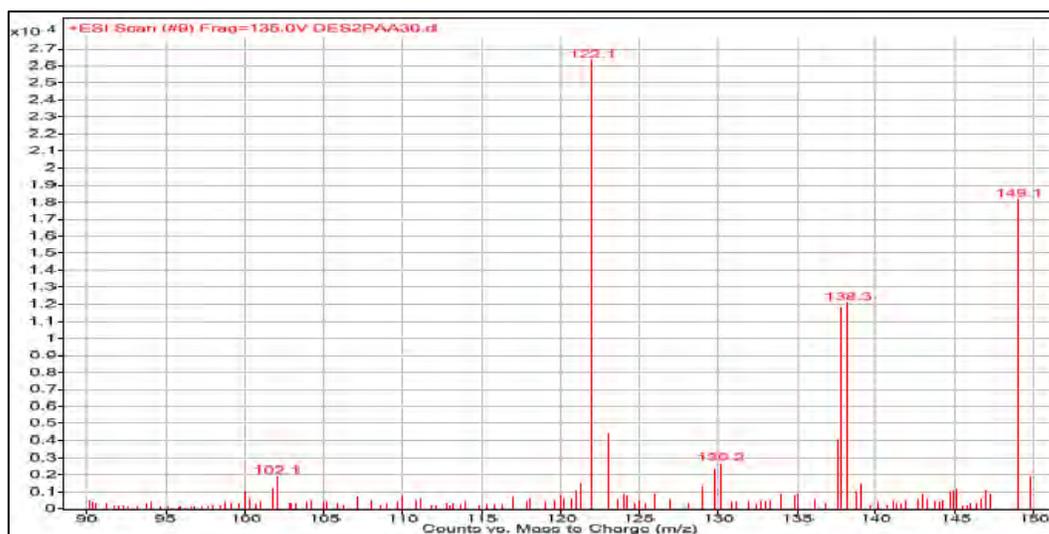
Precisión: el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

Exactitud: El valor promedio de las determinaciones de cada nivel de la concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

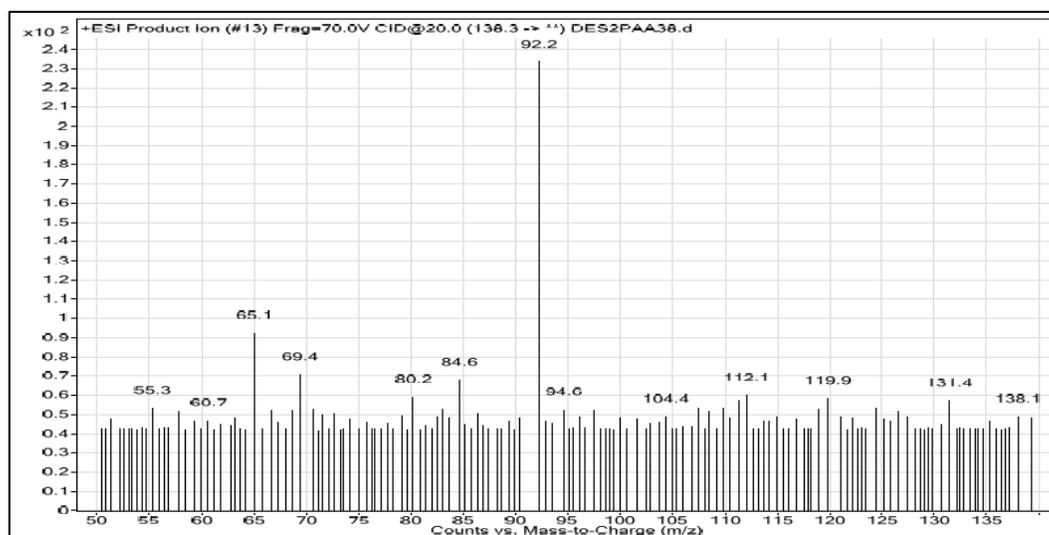
## X. RESULTADOS:

### 10.1 IONIZACIÓN DEL 2-PIRIDIL ÁCIDO ACÉTICO.

Espectro de masas obtenido en la ionización del compuesto de interés. Mediante la ionización por Electro spray en modo positivo.



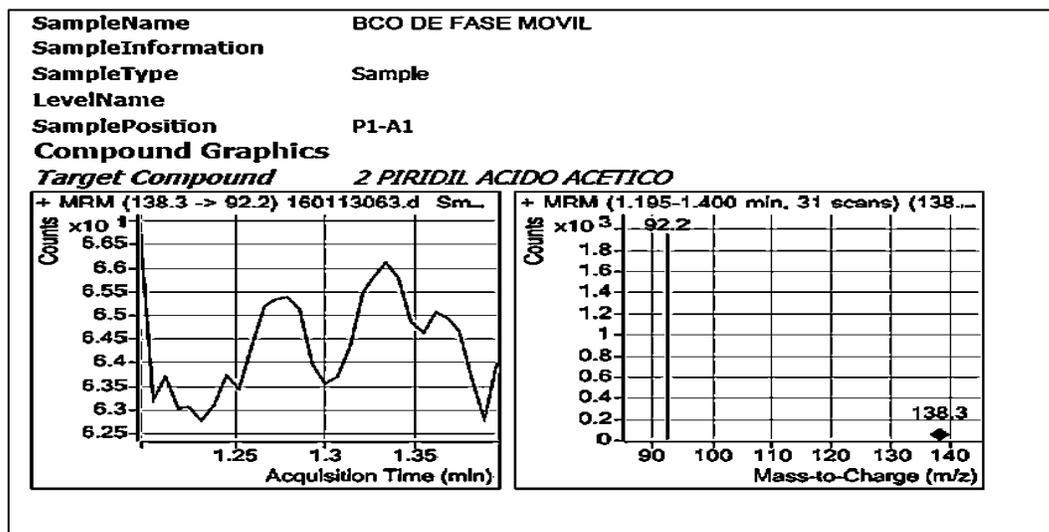
**Figura 6.** Espectro de masas correspondiente al ion padre de 138.3 m/z obtenido mediante un *Scan* con una solución de [500 ng/mL] de 2-piridil ácido acético.



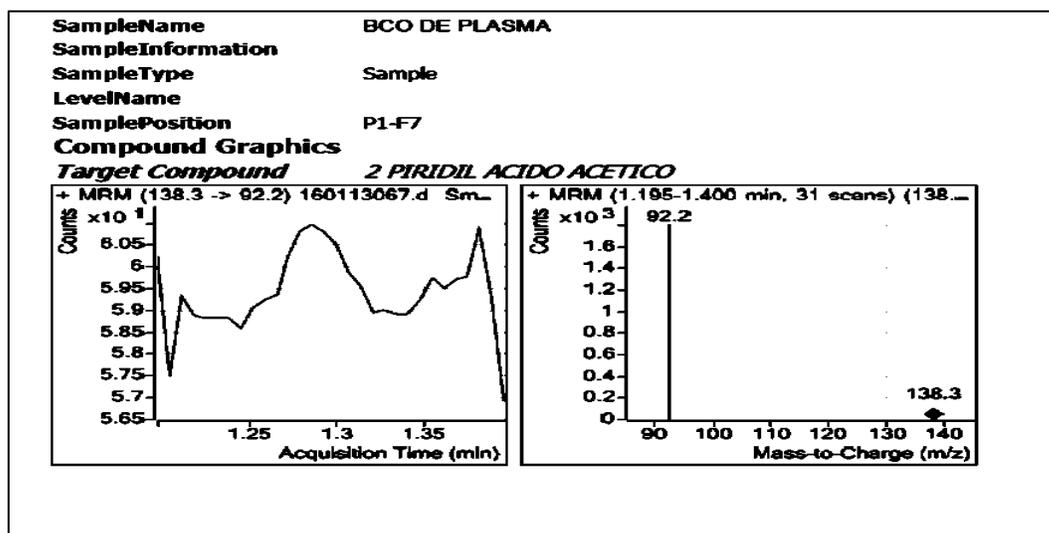
**Figura 7.** Espectro de masas correspondiente al ion hijo de 92.2 m/z obtenido mediante un modo *Ion Produc* con una solución de [500

ng/mL] de 2-piridil ácido acético. Por lo tanto la transición de 2-PAA es de 138.3 a 92.2 m/z.

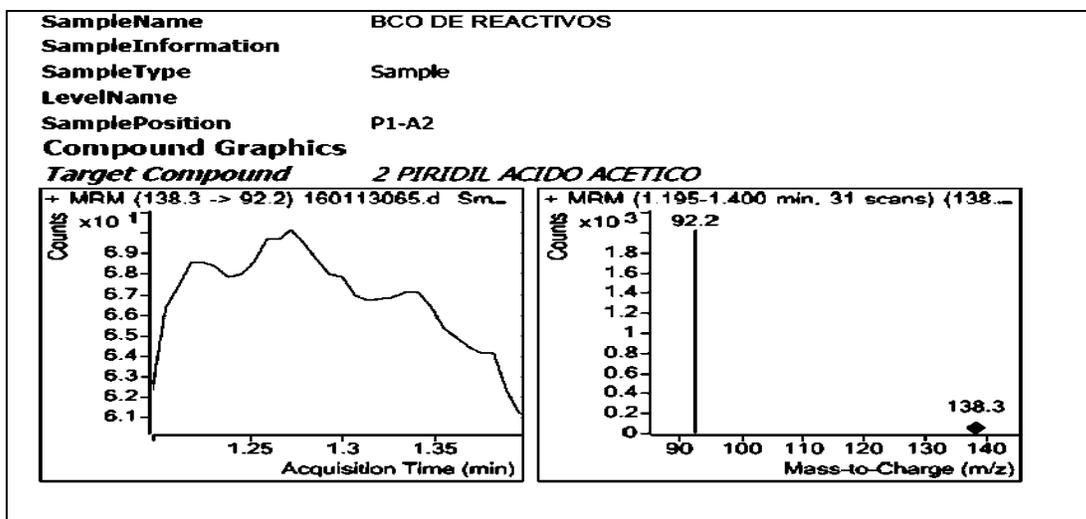
### 10.2 SELECTIVIDAD DE LA CORRIDA ANALÍTICA.



**Figura 8.** Cromatograma para la evaluación de posibles interferencias en el blanco de fase móvil.



**Figura 9.** Cromatograma para la evaluación de posibles interferencias en el blanco de matriz biológica.



**Figura 10.** Cromatograma para la evaluación de posibles interferencias en el blanco de reactivos.

**10.3 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.**

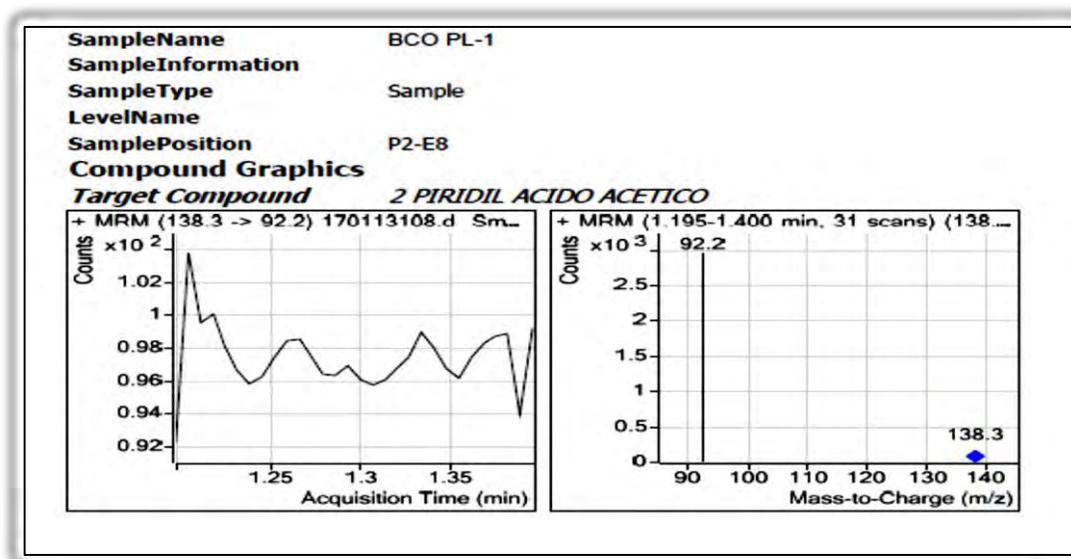
**Tabla 6.** Resultados de la adecuabilidad del sistema a lo largo de la validación.

No		1	2	3	4	5	6	PROMEDIO	D.E.	C.V.
REPETICIÓN										
DÍA 1	T.	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.29	0.00	0.00
	RETENCIÓN									
	AREA	11493	11544	11434	11534	11525	11527	11509.50	40.77	0.35
DÍA 2	T.	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.29	0.00	0.00
	RETENCIÓN									
	AREA	14109	14217	14436	14379	14136	14438	14285.83	150.23	1.05
DÍA 3	T.	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.29	0.00	0.00
	RETENCIÓN									
	AREA	15265	15175	15042	14903	15005	15123	15085.50	129.09	0.86
DÍA 4	T.	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.30	0.00	0.00
	RETENCIÓN									
	AREA	11263	11559	11584	11348	11419	11335	11418.00	129.04	1.13

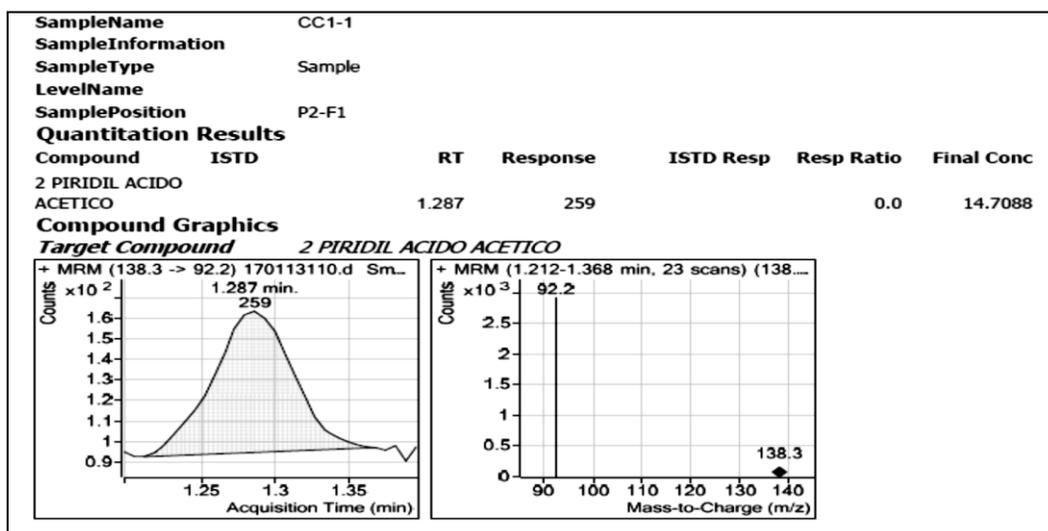
**Tabla 7.** Resultados de la adecuabilidad del sistema a lo largo de la validación.

No	1	2	3	4	5	6	PROMEDIO	D.E.	C.V.	
<b>REPETICIÓN</b>										
<b>DÍA</b>	T.	1.293	1.293	1.287	1.287	1.293	1.287	1.29	0.00	0.25
<b>5</b>	<b>RETENCIÓN</b>									
	AREA	13238	13569	13207	13221	13703	13088	13337.67	240.81	1.81
<b>DÍA</b>	T.	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.287	1.29	0.00	0.00
<b>6</b>	<b>RETENCIÓN</b>									
	AREA	10634	10830	10667	10701	10809	10863	10750.67	95.28	0.89

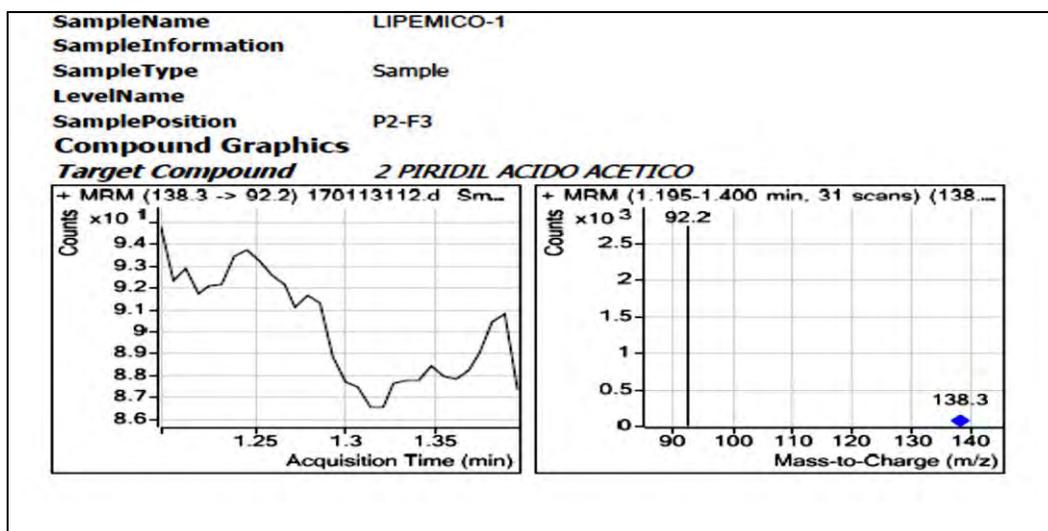
**10.4 SELECTIVIDAD DEL METODO.**



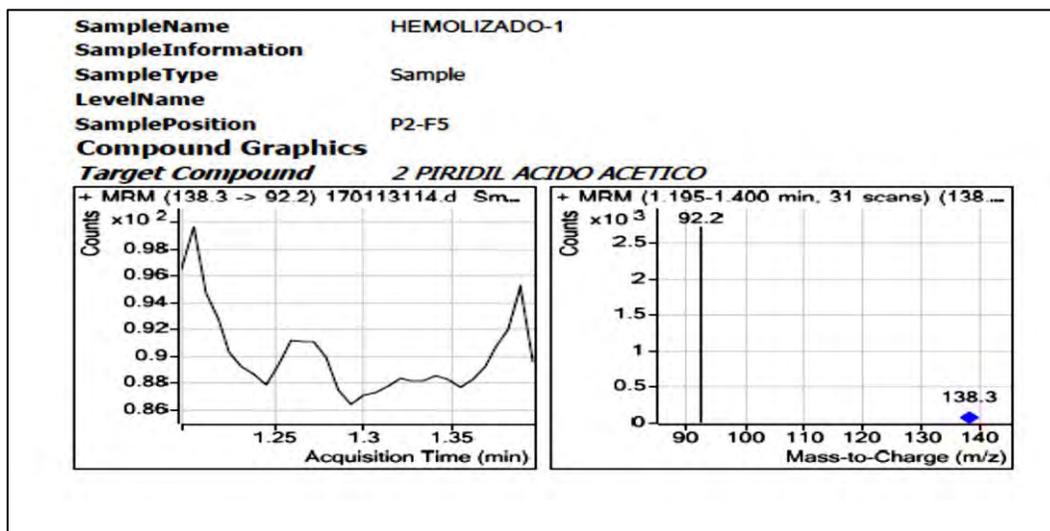
**Figura 11.** Cromatograma de una mezcla de seis fuentes de plasma humano.



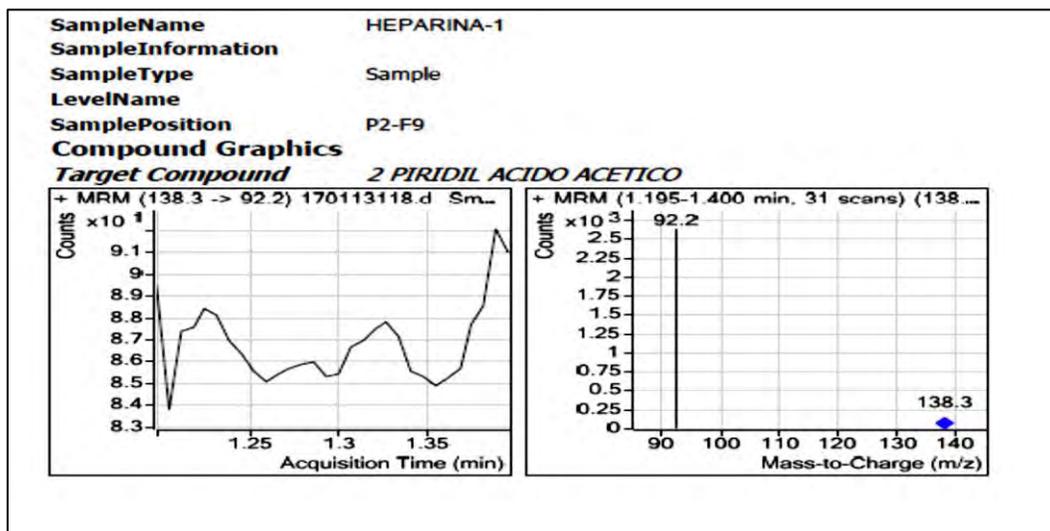
**Figura 12.** Muestra plasmática extraída correspondiente al límite de cuantificación para 2-Piridil ácido acético (metabolito de Betahistina).



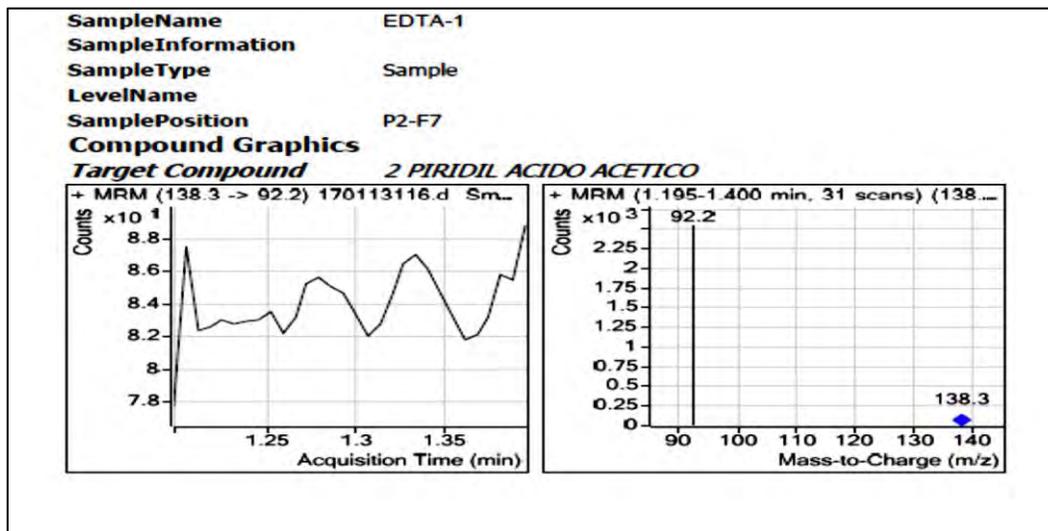
**Figura 13.** Cromatograma de plasma lipémico extraído.



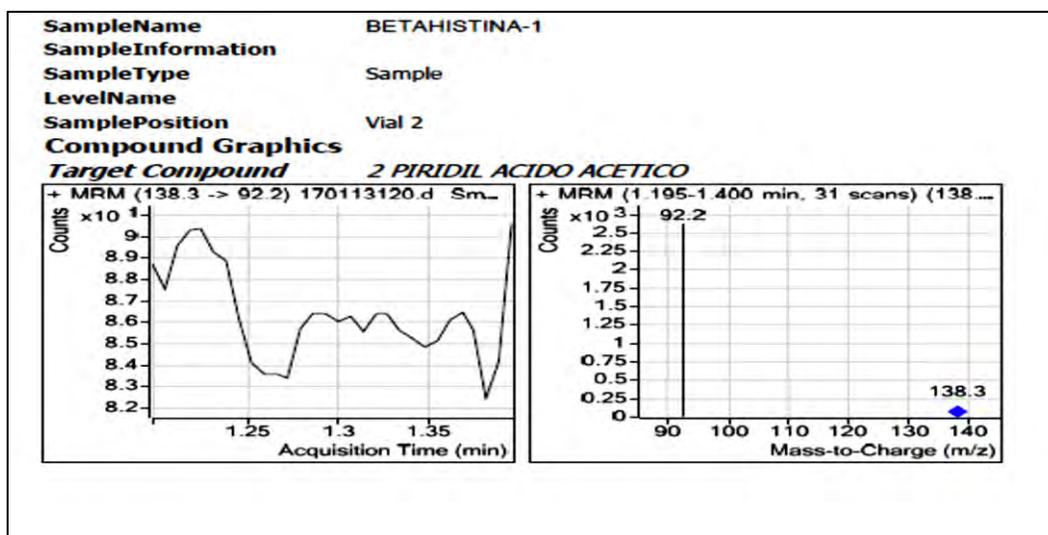
**Figura 14.** Cromatograma de plasma hemolizado extraído.



**Figura 15.** Cromatograma de plasma extraído conteniendo heparina.



**Figura 16.** Cromatograma de plasma extraído conteniendo EDTA.

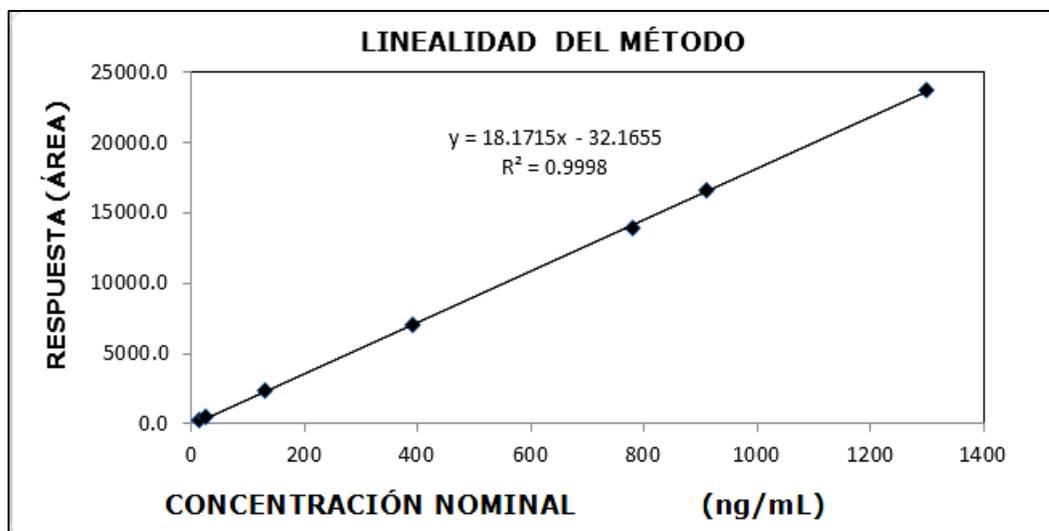


**Figura 17.** Cromatograma de plasma extraído conteniendo Betahistina. Con una concentración de 1 µg/mL de Betahistina.

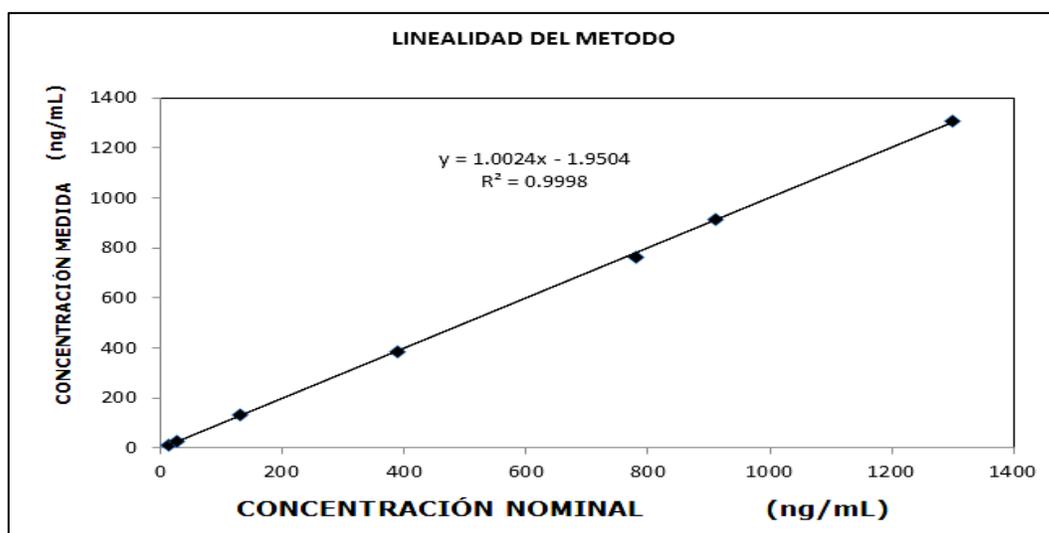
**10.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

**Tabla 8.** Concentración calculada de las curvas de calibración en plasma para evaluar la linealidad del método analítico. Con ponderación de  $1/y^2$ .

CONC. NOMINAL (ng/mL)	CONCENTRACIÓN CALCULADA (ng/mL)			PROMEDIO	D.E.	C.V. (%)	Exactitud (%)	Desv. Valor Teórico (%)
	CC1	CC2	CC3					
13	12.978	12.833	12.836	12.882	0.08	0.64	99.09	-0.91
26	26.048	26.638	26.720	26.469	0.37	1.38	101.80	1.80
130	131.168	133.862	130.962	131.998	1.62	1.23	101.54	1.54
390	387.378	379.194	389.861	385.478	5.58	1.45	98.84	-1.16
780	783.116	751.176	759.999	764.764	16.49	2.16	98.05	-1.95
910	903.932	924.153	914.600	914.228	10.12	1.11	100.46	0.46
1300	1300.842	1321.345	1302.424	1308.204	11.41	0.87	100.63	0.63
m	0.9993	1.0096	0.9985	1.0024	0.01	0.62		
b	-0.1420	-4.8298	-0.8794	-1.9504	2.52	-129.24		
r <sup>2</sup>	1.0000	0.9990	0.9997	0.9998	0.00	0.05		
r	1.0000	0.9995	0.9999	0.9999	0.00	0.02		



**Figura 18.** Curva de calibración promedio de las respuestas obtenidas, para cada concentración del rango de calibración. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.



**Figura 19.** Curva de calibración promedio de las concentraciones medidas para cada concentración del rango de calibración. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

## 10.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

**Tabla 9.** Límite de cuantificación para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>				
<b>CONC. NOMINAL</b>	<b>RESPUESTA</b>	<b>CONC.</b>	<b>EXACTITUD</b>	<b>DESV.</b>
<b>(ng/mL)</b>	<b>(AREA)</b>	<b>CALCULADA</b>	<b>(%)</b>	<b>ABS.</b>
		<b>(ng/mL)</b>		<b>(%)</b>
<b>13</b>	223	12.725	97.89	2.11
	242	13.772	105.94	5.94
	240	13.662	105.09	5.09
	226	12.891	99.16	0.84
	229	13.056	100.43	0.43
<b>Promedio</b>	232	13.221	101.70	1.70
<b>D.E.</b>	8.51	0.47	3.61	
<b>C.V. (%)</b>	3.67	3.55	3.55	

**10.7 LÍMITE DE DETECCIÓN.**

**Tabla 10.** Límites de detección para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) evaluados.

<b>LÍMITE DE DETECCIÓN 1</b>		<b>LÍMITE DE DETECCIÓN 2</b>	
<b>CONC. NOMINAL</b> <b>(ng/mL)</b>	RELACIÓN SEÑAL- RUIDO	<b>CONC. NOMINAL</b> <b>ng/mL</b>	RELACIÓN SEÑAL- RUIDO
<b>6.50</b>	3.80	<b>3.25</b>	1.69
	3.06		1.42
	3.79		1.61
	3.78		1.78
	3.69		1.82
<b>Promedio</b>	3.62	<b>Promedio</b>	1.66
<b>D.E.</b>	0.32	<b>D.E.</b>	0.16
<b>C.V. (%)</b>	8.78	<b>C.V. (%)</b>	9.55

**10.8 PRECISIÓN Y EXACTITUD.**

**Tabla 11.** Respuestas de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la repetibilidad.

<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA (AREA)</b>					<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V. (%)</b>
<b>39</b>	868	848	835	852	797	840.00	26.77	3.19
<b>650</b>	13864	14206	13807	13925	13792	13919.00	168.90	1.21
<b>1040</b>	22365	22696	21784	23733	22277	22571.00	727.00	3.22

**Tabla 12.** Concentraciones de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la repetibilidad.

<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>					<b>PROMEDIO</b>		<b>D.E.</b>	<b>CV (%)</b>
						<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>	<b>% EXACTITUD</b>		
<b>39</b>	42.430	41.447	40.807	41.643	38.939	41.053	105.26	1.32	3.21
<b>650</b>	681.287	698.099	678.485	684.286	677.748	683.981	105.23	8.30	1.21
<b>1040</b>	1099.179	1115.450	1070.618	1166.427	1094.853	1109.306	106.66	35.74	3.22

**10.9 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.**

**Tabla 13.** Concentraciones calculadas de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la reproducibilidad intralaboratorio del método, para un químico investigador.

<b>CONC. NOMINAL</b>		<b>CONCENTRACIÓN CALCULADA</b>		
(ng/mL)		(ng/mL)		
<b>DÍA 1</b>	39	42.863	39.723	40.880
	650	622.368	636.858	581.652
	1040	976.638	991.294	1014.765
<b>DÍA 2</b>	39	38.743	37.514	36.924
	650	662.705	661.034	659.707
	1040	1096.082	1106.553	1090.232
<b>DÍA 3</b>	39	35.055	40.437	40.629
	650	636.013	681.032	687.566
	1040	1058.913	1036.187	1071.885
<b>PROMEDIO</b>				
<b>CONC. NOMINAL</b>	<b>CONCENTRACION CALCULADA</b>	<b>% EXACTITUD</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V. (%)</b>
(ng/mL)	(ng/mL)			
<b>39</b>	39.196	100.50	2.38	6.08
<b>650</b>	647.660	99.64	32.60	5.03
<b>1040</b>	1049.172	100.88	47.10	4.49

**10.10 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA REINYECCIÓN.**

**Tabla 14.** Evaluación del efecto de la re-inyección para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>REPLICA</b>	<b>AREA</b>	<b>CONC. CALCULADA 39 (ng/mL)</b>	<b>AREA</b>	<b>CONC. CALCULADA 650 (ng/mL)</b>	<b>AREA</b>	<b>CONC. CALCULADA 1040 (ng/mL)</b>
<b>INYECCION INICIAL</b>						
<b>1</b>	793	38.743	13486	662.705	22302	1096.082
<b>2</b>	768	37.514	13452	661.034	22515	1106.553
<b>3</b>	756	36.924	13425	659.707	22183	1090.232
<b>Promedio</b>		37.727		661.149		1097.622
<b>D.E.</b>		0.93		1.5		8.27
<b>C.V. (%)</b>		2.46		0.23		0.75
<b>RE-INYECCIÓN</b>						
<b>1</b>	823	40.218	13639	670.226	23067	1133.688
<b>2</b>	772	37.711	13958	685.908	23024	1131.574
<b>3</b>	780	38.104	14076	691.708	22992	1130.001
<b>Promedio</b>		38.677		682.614		1131.754
<b>D.E.</b>		1.35		11.11		1.85
<b>C.V. (%)</b>		3.49		1.63		0.16
<b>% DES. ABS.</b>		<b>2.52</b>		<b>3.25</b>		<b>3.11</b>

**10.11 EFECTO DE LA DILUCIÓN.**

**Tabla 15.** Evaluación del efecto de la dilución para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina). Muestras sin diluir.

<b>NIVEL ALTO SIN DILUIR</b>					
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA (C.I. AREA)</b>	<b>FACTOR DE DILUCION</b>	<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>	<b>DESV. ABS. (%)</b>
<b>1040</b>	23236	1.0	1141.996	109.81	9.81
	22062	1.0	1084.284	104.26	4.26
	20496	1.0	1007.303	96.86	3.14
	21948	1.0	1078.680	103.72	3.72
	22446	1.0	1103.161	106.07	6.07
	22288	1.0	1095.394	105.33	5.33
<b>Promedio</b>	22079		1085.136	104.34	4.34
<b>D.E.</b>	898.93		44.19	4.25	
<b>C.V. (%)</b>	4.07		4.07	4.07	

**Tabla 16.** Evaluación del efecto de la dilución 1:1, para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>NIVEL ALTO. DILUCIÓN 1 : 1</b>					
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	RESPUESTA (AREA)	FACTOR DE DILUCIÓN	CONC. CALCULADA (ng/mL)	EXACTITUD (%)	DESV. ABS. (%)
<b>2080</b>	23765	2.0	2336.000	112.31	12.31
	24255	2.0	2384.175	114.62	14.62
	23800	2.0	2339.441	112.47	12.47
	21957	2.0	2158.245	103.76	3.76
	23880	2.0	2347.307	112.85	12.85
	24080	2.0	2366.970	113.80	13.80
<b>Promedio</b>	23623		2322.023	111.64	11.64
<b>D.E.</b>	836.82		82.27	3.96	
<b>C.V. (%)</b>	3.54		3.54	3.54	

**Tabla 17.** Evaluación del efecto de la dilución 1:3, para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>NIVEL ALTO. DILUCIÓN 1 : 3</b>					
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA ( AREA)</b>	<b>FACTOR DE DILUCIÓN</b>	<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>	<b>DESV. ABS. (%)</b>
<b>2080</b>	11690	4.0	2297.670	110.46	10.46
	12348	4.0	2427.054	116.69	16.69
	12271	4.0	2411.913	115.96	15.96
	12452	4.0	2447.503	117.67	17.67
	12283	4.0	2414.273	116.07	16.07
	9229	4.0	1813.759	87.20	12.80
<b>Promedio</b>	11712		2302.029	110.67	10.67
<b>D.E.</b>	1245.50		244.91	11.77	
<b>C.V. (%)</b>	10.63		10.64	10.64	

**10.12 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.**

**10.12.1 3 CICLOS DE CONGELACIÓN- DESCONGELACIÓN.**

**Tabla 18.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de las muestras que contenían 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación.

REPLICA	AREA	CONC. CALCULADA		CONC. CALCULADA		CONC. CALCULADA	
		39 (ng/mL)	AREA	650 (ng/mL)	AREA	1040 (ng/mL)	
<b>ESTABILIDAD INICIAL (TIEMPO CERO)</b>							
<b>1</b>	770	42.863	11288	622.368	17718	976.638	
<b>2</b>	713	39.723	11551	636.858	17984	991.294	
<b>3</b>	734	40.88	10549	581.652	18410	1014.765	
<b>Promedio</b>		41.155		613.626		994.233	
<b>D.E.</b>		1.59		28.62		19.23	
<b>C.V. (%)</b>		3.86		4.66		1.93	
<b>TERCER CICLO CONGELACION-DESCONGELACION</b>							
<b>1</b>	688	41.238	11239	694.958	18563	1148.739	
<b>2</b>	671	40.185	11261	696.321	18389	1137.958	
<b>3</b>	698	41.858	11174	690.931	17861	1105.245	
<b>Promedio</b>		41.093		694.07		1130.647	
<b>D.E.</b>		0.85		2.8		22.65	
<b>C.V. (%)</b>		2.06		0.40		2.00	
<b>%DES.ABS.</b>		<b>0.15</b>		<b>13.11</b>		<b>13.72</b>	

**10.12.2 A TEMPERATURA AMBIENTE 24 HORAS. SIN PROCESAR.**

**Tabla 19.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de las muestras que contenían 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) sometida 24 horas a temperatura ambiente.

REPLICA	AREA	CONC. CALCULADA NIVEL BAJO 39 (ng/mL)		CONC. CALCULADA NIVEL MEDIO 650 (ng/mL)		CONC. CALCULADA NIVEL ALTO 1040 (ng/mL)
		AREA	AREA	AREA	AREA	
<b>MUESTRAS DE REFERENCIA (TIEMPO INICIAL)</b>						
<b>1</b>	814	39.775	12238	601.356	22944	1127.642
<b>2</b>	802	39.185	14358	705.571	23276	1143.962
<b>3</b>	871	42.577	13436	660.247	22729	1117.073
<b>Promedio</b>		40.513		655.725		1129.559
<b>D.E.</b>		1.81		52.25		13.55
<b>C.V. (%)</b>		4.47		7.97		1.20
<b>MUESTRAS DE PRUEBA (24 HORAS)</b>						
<b>1</b>	888	40.725	13658	654.271	22022	1056.126
<b>2</b>	925	42.503	13780	660.132	22911	1098.839
<b>3</b>	907	41.638	13129	628.854	22384	1073.519
<b>Promedio</b>		41.622		647.752		1076.162
<b>D.E.</b>		0.89		16.63		21.48
<b>C.V. (%)</b>		2.14		2.57		2.00
<b>% DES. ABS.</b>		<b>2.74</b>		<b>1.22</b>		<b>4.73</b>

**10.12.3 ESTABILIDAD EN AUTOMUESTREADOR A 4 °C.**

**Tabla 20.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en el automuestreador por un periodo de 24 horas.

REPLICA	AREA	CONC. CALCULADA NIVEL BAJO		CONC. CALCULADA NIVEL MEDIO		CONC. CALCULADA NIVEL ALTO	
		39 (ng/mL)	AREA	650 (ng/mL)	AREA	1040 (ng/mL)	AREA
<b>ESTABILIDAD INICIAL (TIEMPO CERO)</b>							
<b>1</b>	770	42.863	11288	622.368	17718	976.638	
<b>2</b>	713	39.723	11551	636.858	17984	991.294	
<b>3</b>	734	40.880	10549	581.652	18410	1014.765	
<b>Promedio</b>		41.155		613.626		994.233	
<b>D.E.</b>		1.59		28.62		19.23	
<b>C.V. (%)</b>		3.86		4.66		1.93	
<b>ESTABILIDAD 24 HORAS</b>							
<b>1</b>	870	42.528	12882	633.014	21001	1032.128	
<b>2</b>	889	43.462	13628	669.686	20283	996.832	
<b>3</b>	795	38.841	13655	671.013	21608	1061.966	
<b>Promedio</b>		41.610		657.904		1030.309	
<b>D.E.</b>		2.44		21.57		32.61	
<b>C.V. (%)</b>		5.87		3.28		3.16	
<b>% DES. ABS.</b>		<b>1.11</b>		<b>7.22</b>		<b>3.63</b>	

**10.12.4 MUESTRA PROCESADA EN REFRIGERACIÓN.**

**Tabla 21.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración tiempo inicial (t=0) para 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>NIVEL BAJO</b>				
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA (AREA)</b>	<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>	<b>DESV. ABS. (%)</b>
<b>39</b>	770	42.863	109.91	9.91
	713	39.723	101.85	1.85
	734	40.880	104.82	4.82
<b>Promedio</b>	739	41.155	105.53	5.53
<b>D.E.</b>	28.83	1.59	4.07	
<b>C.V. (%)</b>	3.90	3.86	3.86	
<b>NIVEL MEDIO</b>				
<b>650</b>	11288	622.368	95.75	4.25
	11551	636.858	97.98	2.02
	10549	581.652	89.48	10.52
<b>Promedio</b>	11129	613.626	94.40	5.60
<b>D.E.</b>	519.50	28.62	4.40	
<b>C.V. (%)</b>	4.67	4.66	4.66	
<b>NIVEL ALTO</b>				
<b>1040</b>	17718	976.638	93.91	6.09
	17984	991.294	95.32	4.68
	18410	1014.765	97.57	2.43
<b>Promedio</b>	18037	994.233	95.60	4.40
<b>D.E.</b>	349.07	19.23	1.85	
<b>C.V. (%)</b>	1.94	1.93	1.93	

**Tabla 22.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración durante 24 horas para el 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina).

<b>NIVEL BAJO</b>				
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA (AREA)</b>	<b>CONC. CALCULADA (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>	<b>DESV. ABS. (%)</b>
<b>39</b>	846	41.348	106.02	6.02
	859	41.987	107.66	7.66
	919	44.937	115.22	15.22
<b>Promedio</b>	875	42.757	109.63	9.63
<b>D.E.</b>	38.94	1.91	4.91	
<b>C.V. (%)</b>	4.45	4.48	4.48	
<b>NIVEL MEDIO</b>				
<b>650</b>	13157	646.532	99.47	0.53
	13767	676.519	104.08	4.08
	13763	676.322	104.05	4.05
<b>Promedio</b>	13562	666.458	102.53	2.53
<b>D.E.</b>	351.03	17.26	2.65	
<b>C.V. (%)</b>	2.59	2.59	2.59	
<b>NIVEL ALTO</b>				
<b>1040</b>	21401	1051.791	101.13	1.13
	20325	998.897	96.05	3.95
	22329	1097.409	105.52	5.52
<b>Promedio</b>	21352	1049.366	100.90	0.90
<b>D.E.</b>	1002.91	49.30	4.74	
<b>C.V. (%)</b>	4.70	4.70	4.70	

**10.13 RECUPERACION TOTAL (RECOBRO).**

**Tabla 23.** Evaluación del recobro de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), aplicando el método analítico.

<b>NIVEL BAJO</b>			
<b>CONC. NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>RESPUESTA (AREA)</b>		<b>RECOBRO (%)</b>
	<b>SOLUCIÓN</b>	<b>PLASMA</b>	
<b>39</b>	827	868	104.96
	748	848	113.37
	791	835	105.56
	791	852	107.71
	822	797	96.96
<b>Promedio</b>	796	840	105.71
<b>D.E.</b>	31.59	26.77	5.91
<b>C.V. (%)</b>	3.97	3.19	5.59
<b>NIVEL MEDIO</b>			
<b>650</b>	12472	13864	111.16
	12850	14206	110.55
	12968	13807	106.47
	12631	13925	110.24
	12532	13792	110.05
<b>Promedio</b>	12691	13919	109.70
<b>D.E.</b>	211.45	168.90	1.85
<b>C.V. (%)</b>	1.67	1.21	1.69

Continuación de la Tabla 23. Evaluación del recobro de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), aplicando el método analítico.

<b>NIVEL ALTO</b>			
<b>1040</b>	20401	22365	109.63
	20498	22696	110.72
	20813	21784	104.67
	23543	23733	100.81
	20539	22277	108.46
<b>Promedio</b>	21159	22571	106.86
<b>D.E.</b>	1341.55	727.00	4.08
<b>C.V. (%)</b>	6.34	3.22	3.82

**Tabla 24.** Evaluación del recobro de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina), aplicando el método analítico.

<b>RECOBRO PROMEDIO</b>	
<b>NIVEL</b>	RECOBRO (%) PROMEDIO
<b>BAJO</b>	105.71
<b>MEDIO</b>	109.70
<b>ALTO</b>	106.86
<b>Promedio</b>	<b>107.42</b>
<b>D.E.</b>	2.05
<b>C.V. (%)</b>	1.91

**10.14 TOLERANCIAS DEL METODO ANALITICO.**

**10.14.1 CAMBIO EN LA PROPORCIÓN DE FASE MÓVIL ACUOSO: ORGÁNICO 65:35 V/V.**

**Tabla 25.** Concentraciones de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la proporción de la fase móvil acuoso: orgánico, 65:35 v/v.

<b>FASE MÓVIL = (SOLUCIÓN ÁCIDA DE AGUA: METANOL, 65:35 v/v) ACETATO DE AMONIO 10 mM, 65:35 v/v, TEMPERATURA DE COLUMNA = 50° C</b>							
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN CALCULADA (ng/mL)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			
<b>BAJO</b>	39	39.890	39.992	40.094	39.99	0.10	0.25
<b>MEDIO</b>	650	694.141	690.015	686.500	690.21	3.82	0.55
<b>ALTO</b>	1040	1061.507	1053.866	1060.794	1058.72	4.22	0.40

**Tabla 26.** Exactitud de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenida durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la proporción de la fase móvil a acuoso: orgánico 65:35 v/v.

<b>MODIFICACIÓN DEL MÉTODO (TOLERANCIA 1)</b>								
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V (%)</b>	<b>PROM V.N.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>BAJO</b>	39	102.28	102.54	102.81	102.54	0.26	0.25	2.54
<b>MEDIO</b>	650	106.79	106.16	105.62	106.19	0.59	0.55	6.19
<b>ALTO</b>	1040	102.07	101.33	102.00	101.80	0.41	0.40	1.80

**10.14.2 CAMBIO EN LA PROPORCIÓN DE FASE MÓVIL ACUOSO: ORGÁNICO 61:39 V/V.**

**Tabla 27.** Concentraciones de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la proporción de la fase móvil a acuoso: orgánico 61:39 v/v.

<b>FASE MÓVIL = (SOLUCIÓN ÁCIDA DE AGUA: METANOL, 67:33 v/v): ACETATO DE AMONIO 10 mM, 61:39 v/v, TEMPERATURA DE COLUMNA = 50 °C</b>							
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN CALCULADA (ng/mL)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			
<b>BAJO</b>	39	42.712	40.462	41.039	41.404	1.17	2.82
<b>MEDIO</b>	650	671.723	681.591	664.682	672.665	8.49	1.26
<b>ALTO</b>	1040	1049.821	1049.417	1020.679	1039.973	16.71	1.61

**Tabla 28.** Exactitud de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenida durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la proporción de la fase móvil a acuoso: orgánico 61:39 v/v.

<b>MODIFICACIÓN DEL MÉTODO (TOLERANCIA 2)</b>								
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V (%)</b>	<b>PROM V.N.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>BAJO</b>	39	109.52	103.75	105.23	106.16	3.00	2.82	6.16
<b>MEDIO</b>	650	103.34	104.86	102.26	103.49	1.31	1.26	3.49
<b>ALTO</b>	1040	100.94	100.91	98.14	100.00	1.61	1.61	0.00

**10.14.3 CAMBIO EN LA TEMPERATURA DE COLUMNA A 52 °C.**

**Tabla 29.** Concentraciones de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la temperatura de columna a 52 °C.

<b>FASE MÓVIL = (SOLUCION ÁCIDA DE AGUA: METANOL, 65:35 v/v): ACETATO DE AMONIO 10 mM, 63:37 v/v, TEMPERATURA DE COLUMNA = 52 °C</b>							
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN CALCULADA (ng/mL)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			
<b>BAJO</b>	39	40.331	41.913	39.277	40.507	1.33	3.28
<b>MEDIO</b>	650	678.496	664.627	680.869	674.664	8.77	1.30
<b>ALTO</b>	1040	1004.883	977.671	1025.028	1002.527	23.77	2.37

**Tabla 30.** Exactitud de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenida durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la temperatura de columna a 52 °C.

<b>MODIFICACIÓN DEL MÉTODO (TOLERANCIA 3)</b>								
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V (%)</b>	<b>PROM V.N.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>BAJO</b>	39	103.41	107.47	100.71	103.86	3.40	3.28	3.86
<b>MEDIO</b>	650	104.38	102.25	104.75	103.79	1.35	1.30	3.79
<b>ALTO</b>	1040	96.62	94.01	98.56	96.40	2.29	2.37	3.60

**10.14.4 CAMBIO EN LA TEMPERATURA DE COLUMNA A 48° C**

**Tabla 31.** Concentraciones de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenidas durante la evaluación de la tolerancia al cambiar la temperatura de columna a 48 °C.

<b>FASE MÓVIL = (SOLUCIÓN ÁCIDA DE AGUA: METANOL, 65:35 v/v): ACETATO DE AMONIO 10 mM, 63:37 v/v, TEMPERATURA DE COLUMNA = 48 °C</b>							
<b>NIVEL DE CONC</b>	<b>NOMINAL (ng/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN CALCULADA (ng/mL)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V.</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			
<b>BAJO</b>	39	40.251	39.094	38.937	39.427	0.72	1.82
<b>MEDIO</b>	650	666.603	613.150	599.484	626.412	35.47	5.66
<b>ALTO</b>	1040	898.180	895.605	938.651	910.812	24.14	2.65

**Tabla 32.** Exactitud de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) obtenida durante la evaluación de la tolerancia al cambiar al cambiar la temperatura de columna a 48 °C.

<b>MODIFICACIÓN DEL MÉTODO (TOLERANCIA 4)</b>									
<b>NIVEL</b>	<b>DE</b>	<b>NOMINAL</b>	<b>EXACTITUD (%)</b>			<b>PROMEDIO</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V</b>	<b>PROM</b>
			<b>CONC</b>	<b>(ng/mL)</b>	<b>1</b>				
<b>BAJO</b>		39	103.21	100.24	99.84	101.10	1.84	1.82	1.10
<b>MEDIO</b>		650	102.55	94.33	92.23	96.37	5.46	5.66	3.63
<b>ALTO</b>		1040	86.36	86.12	90.25	87.58	2.32	2.65	12.42

**10.15 ESTABILIDAD A LARGO PLAZO EN CONGELACION A -70 °C.**

**Tabla 33.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en congelación a -70 °C durante 35 días.

REPLICA	AREA	CONC. CALCULADA NIVEL BAJO		CONC. CALCULADA NIVEL MEDIO		CONC. CALCULADA NIVEL ALTO
		39 (ng/mL)	AREA	650 (ng/mL)	AREA	1040 (ng/mL)
<b>ESTABILIDAD INICIAL</b>						
<b>1</b>	770	42.863	11288	622.368	17718	976.638
<b>2</b>	713	39.723	11551	636.858	17984	991.294
<b>3</b>	734	40.880	10549	581.652	18410	1014.765
<b>Promedio</b>		41.155		613.626		994.233
<b>D.E.</b>		1.59		28.62		19.23
<b>C.V. (%)</b>		3.86		4.66		1.93
<b>ESTABILIDAD A LOS 35 DÍAS</b>						
<b>1</b>	780	36.525	15491	719.984	22484	1044.872
<b>2</b>	913	42.704	13607	632.455	21482	998.320
<b>3</b>	835	39.080	12933	601.142	20322	944.428
<b>Promedio</b>		39.436		651.194		995.873
<b>D.E.</b>		3.10		61.60		50.27
<b>C.V. (%)</b>		7.87		9.46		5.05
<b>% DES. ABS.</b>		<b>4.18</b>		<b>6.12</b>		<b>0.17</b>

**Tabla 34.** Resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra de 2-piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en congelación a -70 °C durante 70 días.

REPLICA	AREA	CONC. CALCULADA		CONC. CALCULADA		CONC. CALCULADA	
		NIVEL BAJO	AREA	NIVEL MEDIO	AREA	NIVEL ALTO	AREA
		39 (ng/mL)		650 (ng/mL)		1040 (ng/mL)	
<b>ESTABILIDAD INICIAL</b>							
<b>1</b>	770	42.863	11288	622.368	17718	976.638	
<b>2</b>	713	39.723	11551	636.858	17984	991.294	
<b>3</b>	734	40.880	10549	581.652	18410	1014.765	
<b>Promedio</b>		41.155		613.626		994.233	
<b>D.E.</b>		1.59		28.62		19.23	
<b>C.V. (%)</b>		3.86		4.66		1.93	
<b>ESTABILIDAD A LOS 70 DÍAS</b>							
<b>1</b>	13265	38.378	13265	674.088	13265	958.794	
<b>2</b>	12973	37.294	12973	621.961	12973	937.683	
<b>3</b>	14457	36.860	14457	623.479	14457	1044.972	
<b>Promedio</b>		37.511		639.843		980.483	
<b>D.E.</b>		0.78		29.67		56.84	
<b>C.V. (%)</b>		2.08		4.64		5.80	
<b>% DES. ABS.</b>		<b>8.86</b>		<b>4.27</b>		<b>1.38</b>	

### XI. CONCLUSIONES

El método analítico que fue diseñado para la determinación de 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina) en muestras de plasma humano demostró ser selectivo, lineal, preciso y exacto.

La selectividad del método fue adecuada para el tiempo de retención de 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina), para plasma humano, plasma hemolizado, plasma lipémico, plasma con heparina, plasma con EDTA y plasma con betahistina. Asimismo no se observó supresión iónica en la metodología analítica.

El método demostró ser lineal en el intervalo de calibración de 13 a 1300 ng/mL. En dicho intervalo se obtuvieron coeficientes de correlación aceptables. El límite de cuantificación para 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina) fue de 13 ng/mL, mientras que el límite de detección fue de 6.50 ng/mL.

La evaluación de la exactitud y precisión de la repetibilidad oscilo entre 105.23 - 106.66 % y  $\leq 3.22$  %, respectivamente. Asimismo la evaluación de la exactitud y precisión de la reproducibilidad evaluada para un químico investigador, oscilo entre 99.64 - 100.88 % y  $\leq 6.08$  %, respectivamente. Con estos resultados se establece que el método analítico es exacto y preciso en el rango de concentraciones empleado.

Se demostró que las muestras plasmáticas de 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina) pueden ser re-inyectadas al final de la corrida analítica, asimismo pueden ser diluidas en proporción 1:1 pero no puede ser diluida en la proporción 1:3.

Se demostró que 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina) es estable en plasma, ya que ante los procedimientos que fueron sometidas las muestras plasmáticas que contenían dicho compuesto y su posterior análisis no se encontró diferencia significativa con respecto a los valores de referencia.

Estas condiciones comprenden tres ciclos completos de congelación-descongelación, 24 horas a temperatura ambiente, 24 horas mantenidas en el automuestreador y mantenidas en condiciones de refrigeración a 4° C durante 24 horas.

Por su parte la recuperación absoluta (recobro) promedio para 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina) fue de 107.42 %.

La tolerancia del método soportó satisfactoriamente los cambios en la temperatura de la columna cromatográfica y los cambios en la proporción de la fase móvil.

De acuerdo a los resultados obtenidos, donde las muestras sometidas a condiciones de congelación a -70° C, durante 35 días, la desviación porcentual con respecto a las muestras del tiempo inicial (tiempo cero), es menor a 6.12 %, y la exactitud oscila entre 95.76 – 101.12 %; por lo tanto se concluye que 2-piridil ácido acético (metabolito de Betahistina) es estable en plasma en condiciones de congelación a -70° C durante 35 días. Las muestras sometidas a condiciones de congelación a -70° C, durante 70 días, la desviación porcentual con respecto a las muestras del tiempo inicial (tiempo cero), es menor a 8.86 %, y la exactitud oscila entre 94.28 – 99.98 %; por lo tanto se concluye que 2-piridil ácido acético (metabolito de Betahistina) es

estable en plasma en condiciones de congelación a  $-70^{\circ}$  C durante 70 días.

Se puede concluir que el tratamiento de las muestras plasmáticas que contienen este compuesto, pueden ser manejadas de acuerdo a la metodología que se empleó sin correr el riesgo de una posible degradación del mismo.

En base a lo anterior, se concluye que la validación del método analítico para la determinación de 2-Piridil ácido acético (metabolito de betahistina), en muestras de plasma humano, cumplió con los requisitos señalados por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Finalmente, este método analítico puede ser empleado en estudios de biodisponibilidad y/o bioequivalencia de medicamentos que contengan betahistina como principio activo.

### XII. BIBLIOGRAFÍA

[1]Arrang JM, et al. Actions of betahistine at histamine receptors in the brain. *Eur J Pharmacol* 1985; 111(1): 73–84.

[2]Gbahou F, et al. Effects of betahistine at histamine H3 receptors: mixed inverse agonism/agonism in vitro and partial inverse agonism in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 334(3): 945–954.

[3]Kessler RC, et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 2006; 163(4): 716–723.

[4]Wilens TE, et al. Understanding attention deficit/hyperactivity disorder from childhood to adulthood. *Postgrad Med* 2010; 122(5): 97–109.

[5]Esbenshade TA, et al. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol* 2008; 154(6): 1166–1181.

[6]Lacour M, Sterkers O. Histamine and betahistina in the treatment of vertigo: elucidation of mechanisms of action. *CNS Drugs* 2001; 15(11): 853–870.

[7]Arrang JM, et al. Actions of betahistine at histamine receptors in the brain. *Eur J Pharmacol* 1985; 111(1): 73–84.

[8]Sternson LA, et al. The metabolism of betahistine in the rat. *Drug Metab Dispos* 1974; 2(2): 123–128.

[9]Fossati A, et al. Binding affinity profile of betahistine and its metabolites for central histamine receptors of rodents. *Pharmacol Res* 2001; 43 (4): 389–392.

[10]Esbenshade TA, et al. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. Br J Pharmacol 2008; 154(6): 1166–1181.

[11]Arrang JM, et al. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. Nature 1983; 302 (5911):832–837.

[12]Chen XY, et al. LC-MS-MS analysis of 2-pyridylacetic acid, a major metabolite of betahistine: application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. Xenobiotica 2003; 33 (12): 1261–1271.

[13]PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, Edición 61, Editorial Thomson.

[14]SERC® Product Monograph Page 1 of 19 Date of Revision: April 9, 2015 and Control No. 180426

[15]Norma oficial mexicana NOM 177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

[16]Duffau B, et al. Validación de métodos y determinación de la **incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"**. Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Diciembre 2010, pág. 1-53.

[17] Referencia electrónica <http://www.trc-canada.com/trc-certificat-e-of-analysis/?lot=12-SSR-177-1>, consultada 14 de diciembre de 2015.

[18] Referencia electrónica <http://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1065618-G0H384.pdf>, consultada 14 de diciembre de 2015.

[19] Val L, *et al.* Comparative bioavailability of betahistine tablet formulations administered in healthy subjects. *Arzneimittelforschung* 2010; 60:440-444.

[20] Cesar I.C, *et al.* Comparison of the bioequivalence between two formulations of betahistine hydrochloride 24 mg tablets in healthy volunteers after a single dose administration. *Revista Brasileira de medicina* 2012; 69:21-25