



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE OXCARBACEPINA Y SU
METABOLITO ACTIVO. SU APLICACIÓN EN UN
ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA**

T E S I S

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

P R E S E N T A

ELVIRA NÚÑEZ ACOSTA



MÉXICO D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

VOCAL: DR. FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

1er. SUPLENTE: DRA. MARÍA EVA TRUJANO GONZÁLEZ

2° SUPLENTE: DR. ADRIAN DE SANTIAGO ZÁRATE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA: DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

SUSTENTANTE: ELVIRA NÚÑEZ ACOSTA

Agradecimientos

A mis padres, Elvira y Roberto por todo el apoyo y el empeño que me dedicaron para que llegara al cumplimiento de esta meta. A mi hermano Beto, por ser mi guía, por sus consejos cuando tengo alguna duda existencial y en las crisis con la computadora. A mi cuñada Dení, es muy bonito conocer a personas como tú, gracias por tu cariño y amistad. A mi abuela Socorro Peralta y a mi abuelo Mateo Acosta (q. e. p. d.).

A mis amigos Bolthar, hermanito te quiero mucho; Álvar, Arse, Keliza, Astrid, Abryl, Ivonne, Karla, Cinthya, Angie, Kahory, Lucía, Hamtaro, Benji, Erik, Jorgito, Ñoño, Cecy, Perla, Jacqueline, Luis Ángel, Cindy-Lu, Aldo, Juan, Jonás, Gabriel, Luis Alberto, Allan, Ale, Doña, Madame Lugo, Evelyn, Iveth, Leo, Gabo, Alys, Armando, Mamá Solecito, Erick Canales, Petite Maricela y Laura. Gracias por los momentos compartidos, ha sido un privilegio conocerlos y contar con ustedes en las buenas, en las malas y en las tupidas.

Karina, te quiero mucho aunque mates mi brazo a mordiscos, pero tu amistad es la mejor marca que puedo tener.

Luis Guillermo, gracias por tu cariño y tu paciencia, te quiero mucho.

A Julieta Acosta y Jazmín Armenta ¡las extraño mucho!

A mis compañeras de laboratorio Ana, Ceci, Miriam y Stephanie, por compartir los momentos de estrés y ocurrencias.

A la Dra. Marce y al Dr. Juan Carlos, a las enfermeras Tere y Angie, al Dr. Lugo, por su apoyo y amistad.

A Tina, Francis y David también les agradezco mucho sus enseñanzas.

A la M. en C. Ariadna Cervantes por su apoyo, consejos y por estar al pie del cañón conmigo en el laboratorio.

A la Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal y al Dr. Francisco Javier Flores Murrieta, por la confianza que depositaron en mí y el apoyo que me han brindado.

A mis sinodales, M. en C. Juan Manuel Rodríguez y el Dr. Fausto Rivero Cruz, por sus observaciones y aportaciones a este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por pertenecer a ella desde mi formación preparatoria y a la Facultad de Química, por formar parte de la mejor escuela de ciencias químicas de nuestro país.

Ahora sabes que todo merece la pena. La larga travesía por ese mundo de méritos numéricos y ausencia de reconocimiento, donde te viste obligada a arrastrar contigo al niño de papá, al tonto del haba, al inútil carne de matadero, con tal de llevar a buen término el trabajo para el que te bastabas en solitario. Has crecido y sabes que las oportunidades no estaban en los otros, sino en ti.

Ahora que miras hacia atrás con madurez, comprendes que cada vez que alguien ninguneó tu forma de ser, te insultó, te miró por encima del hombro, no hizo sino precipitar tu aprendizaje y tu lucidez. Tu certeza de ser mejor, más despierta y diferente.

Ahora sabes que la virtud, en el más hondo sentido de la palabra, está en ese aguante de tantos años, cuando cerca estuvieron de convertirte en otra. Comprendes al fin que los malos profesores son un accidente sin demasiada importancia, pues eres tú quien aprende; y la vida, incluso con sus insultos, con sus malvados, con sus tragedias, con sus reglas implacables, la que te enseña. Nadie dijo que fuera fácil.

Arturo Pérez-Reverte



CONTENIDO

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 CONCEPTOS GENERALES DE FARMACOCINÉTICA	2
2.1.1 Liberación	5
2.1.2 Absorción	7
2.1.3 Distribución	9
2.1.4 Metabolismo	10
2.1.5 Excreción	13
2.1.6 Factores que modifican la farmacocinética	15
2.2 FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	16
2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	22
2.3.1 Definiciones	22
2.4. OXCARBACEPINA Y MDH	25
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	25
2.4.2. Farmacocinética y farmacodinamia	26
2.4.3. Usos terapéuticos y dosis	28
2.4.4. Reacciones adversas	28



2.5 MÉTODOS PARA CUANTIFICAR OXC Y MDH	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1. Reactivos	31
3.2. Sustancias de referencia	31
3.3. Materiales	31
3.4. Equipos e instrumentos	31
3.5. Condiciones cromatográficas	32
3.6. Preparación de soluciones	32
3.7. Curvas de calibración y muestras de control de calidad	34
3.8. Método analítico	36
3.8.1. <i>Descripción de la muestra biológica</i>	36
3.8.2. <i>Proceso de extracción</i>	37
3.8.3. <i>Integración</i>	38
3.9. Validación del método analítico	38
3.9.1. Selectividad del método	38
3.9.2. Linealidad	38
3.9.2.1. <i>Linealidad del sistema</i>	39
3.9.2.2. <i>Linealidad del método</i>	39
3.9.3. Precisión del método	39
3.9.3.1. <i>Repetibilidad</i>	39
3.9.3.2. <i>Reproducibilidad</i>	40
3.9.4. Exactitud del método	40
3.9.5. Recobro	40



3.9.6. Límite de cuantificación	40
3.9.7. Límite de detección	41
3.9.8. Estabilidad	41
3.9.8.1 <i>Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación</i>	41
3.9.8.2 <i>Estabilidad a temperatura ambiente</i>	41
3.9.8.3 <i>Estabilidad en refrigeración</i>	42
3.9.8.4 <i>Estabilidad a largo plazo</i>	42
3.9.8.5 <i>Estabilidad de la muestra procesada</i>	42
3.9.8.6 <i>Estabilidad en solución</i>	43
3.9.9 Efecto de la dilución	43
3.9.10 Tolerancia	43
3.10 Determinación de los parámetros farmacocinéticos	44
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
4.1 Validación del método analítico	45
4.1.1 Selectividad del método	45
4.1.2 Linealidad	46
4.1.2.1 <i>Linealidad del sistema</i>	46
4.1.2.2 <i>Linealidad del método</i>	52
4.1.3 Precisión del método	59
4.1.3.1 <i>Repetibilidad</i>	59
4.1.3.2 <i>Reproducibilidad</i>	60
4.1.4 Exactitud del método	60
4.1.5 Recobro	60



Facultad de Química

Índice

4.1.6 Límite de cuantificación	61
4.1.7 Límite de detección	62
4.1.8 Estabilidad	63
4.1.9 Efecto de la dilución	64
4.1.10 Tolerancia	65
4.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN UN ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA	66
5. CONCLUSIONES	71
6. BIBLIOGRAFÍA	72



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos involucrados en el sistema LADME	3
Figura 2. Curva de concentración plasmática contra tiempo después de la administración de un fármaco por vía oral	5
Figura 3. Ciclo enterohepático	14
Figura 4. Árbol de selección de modo de separación en cromatografía	16
Figura 5. Representación esquemática del sistema HPLC	19
Figura 6. Componentes del detector de ultravioleta	20
Figura 7. Estructuras químicas de oxcarbacepina (OXC) y MDH	25
Figura 8. Cromatogramas representativos de OXC y MDH	45
Figura 9. Cromatogramas representativos de muestras plasmáticas después de su procesamiento por extracción líquido-líquido	46
Figura 10. Cromatograma representativo del límite de detección OXC y MDH	63
Figura 11. Cromatograma representativo de una muestra de un voluntario	67



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración en sistema para la determinación de MDH	47
Gráfica 2. Identidad de la recta en sistema de MDH	49
Gráfica 3. Curva de calibración en sistema para la determinación de OXC	50
Gráfica 4. Identidad de la recta en sistema de OXC	52
Gráfica 5. Curva de calibración en método para la determinación de MDH	53
Gráfica 6. Identidad de la recta en sistema de MDH	55
Gráfica 7. Curva de calibración en método para la determinación de OXC	56
Gráfica 8. Identidad de la recta en sistema de OXC	58
Gráfica 9. Curva aritmética de absorción oral de 300 mg de OXC	68
Gráfica 10. Curva logarítmica de absorción oral de 300 mg de OXC	69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fases del metabolismo de fármacos y las principales reacciones que ocurren en cada una de ellas	11
Tabla 2. Clasificación de las reacciones de biotransformación de fármacos	11
Tabla 3. Fases estacionarias empleadas en HPLC	18
Tabla 4. Esquema de dosificación de OXC en el tratamiento de la epilepsia	28
Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de OXC y MDH por RP-HPLC	32
Tabla 6. Preparación de las soluciones estándar de OXC y MDH	35
Tabla 7. Curvas de calibración y puntos control en método de OXC y MDH	36
Tabla 8. Linealidad del sistema de MDH	47
Tabla 9. Identidad de la recta de MDH en sistema.	48
Tabla 10. Linealidad de sistema de OXC	50
Tabla 11. Identidad de la recta de OXC en sistema	51
Tabla 12. Linealidad del método de MDH	53
Tabla 13. Identidad de la recta de MDH en método	54
Tabla 14. Linealidad del método de OXC	56



Tabla 15. Identidad de la recta de OXC en método	57
Tabla 16. Repetibilidad del método	59
Tabla 17. Reproducibilidad del método	60
Tabla 18. Recobro del método	61
Tabla 19. Límite de cuantificación de MDH y OXC	62
Tabla 20. Límite de detección de MDH y OXC	62
Tabla 21. Efecto de la dilución	65
Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de MDH y OXC	66



LISTA DE ABREVIATURAS

ABC_{inf}	Área bajo la curva. Cantidad total de fármaco absorbida al tiempo t.
ABC_t	Área bajo la curva. Cantidad total de fármaco absorbida al tiempo t.
Cl	Aclaramiento o depuración de un fármaco.
C_{max}	Concentración máxima de fármaco alcanzada.
C. V. (%)	Coficiente de variación expresado en porcentaje.
CYP	Citocromo.
h	Horas.
$\log P$	Coficiente de reparto.
MDH	10,11-dihidro-10-hidroxicarbamacepina. Metabolito activo de OXC.
OXC	Oxcarbacepina.
pH	Potencial de hidrógeno.
RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, por sus siglas en inglés
rpm	Revoluciones por minuto.
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media. Es el tiempo en el que el 50% del fármaco se elimina.
T_{max}	Tiempo al cual se llega a la concentración máxima de fármaco.
Vd	Volumen de distribución.



1. RESUMEN

Con el fin de obtener un conocimiento mejor de los procesos por los cuales atraviesa el fármaco cuando es administrado, se realizan los estudios de farmacocinética que nos indican las concentraciones de fármaco a través del tiempo, las cuales pueden ser medidas en muestras de sangre o plasma, principalmente. Para cuantificar de manera adecuada los fármacos en fluidos biológicos es necesario contar con los métodos analíticos que sustenten la confiabilidad de los resultados que se obtengan, para lo cual se requiere contar con la metodología previamente validada. En nuestro país, existe la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998 que establece los requerimientos para la realización adecuada de los estudios de biodisponibilidad así como los criterios para la validación de los métodos analíticos en la cual se basará este estudio.

La oxcarbacepina (OXC) es un análogo 10 ceto de la carbamacepina con efectos terapéuticos similares a ésta última en el tratamiento de la epilepsia y neuralgia del trigémino bloqueando los canales de sodio, pero con eventos adversos menores incluyendo la baja capacidad de inducir la expresión de enzimas hepáticas. La oxcarbacepina se reduce en humanos al metabolito activo 10,11-dihidro10-hidroxicarbamacepina (MDH) por las alquilceto reductasas y la mayor parte de ésta se excreta por orina como glucorónidos.

El objetivo de este trabajo fue validar un método analítico para determinar las concentraciones plasmáticas de la OXC y MDH en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) y su aplicación en un estudio de farmacocinética de ambos compuestos en la cual se calcularán los parámetros farmacocinéticos tales como concentración máxima alcanzada (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max}), el área bajo la curva (ABC) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$).

El método validado cumplió con los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-1998, por lo cual es un método adecuado para medir de manera confiable las concentraciones de OXC y MDH.



2. ANTECEDENTES

2.1 CONCEPTOS GENERALES DE FARMACOCINÉTICA.

Cuando se administra un fármaco, se espera que este actúe al alcanzar una concentración adecuada en los tejidos blanco, para lo cual se requiere que dicho fármaco se absorba hacia la circulación general, se distribuya entre los tejidos, proteínas y líquidos corporales, realice la conversión enzimática a partir de una molécula a otra diferente (metabolismo) y se elimine a través del hígado, los riñones, bilis y/o heces, se reabsorba y, en algunos casos, pase por la recirculación enterohepática (Rang et. al. 2004), todos estos procesos contribuyen al cambio a través del tiempo de las concentraciones de fármaco en la circulación sanguínea, de manera que se cuantifican como velocidades, dependiendo de la dosis que se administra así como de las características tanto del fármaco como de la forma farmacéutica, la formulación, las vías por las que transcurre a través del organismo así como otros factores que dependen de los sujetos expuestos al fármaco, tales como la genética, condiciones fisiopatológicas particulares y la administración de fármacos concomitantes. La ciencia que estudia la evolución temporal de los fármacos en el organismo es la Farmacocinética. (Gabrielsson et. al. 2009); por lo tanto la Farmacocinética estudia los procesos por los cuales pasa el fármaco en el organismo desde que se administra hasta que éste es eliminado (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación), siendo todos estos procesos dinámicos por lo cual ocurren de manera simultánea.

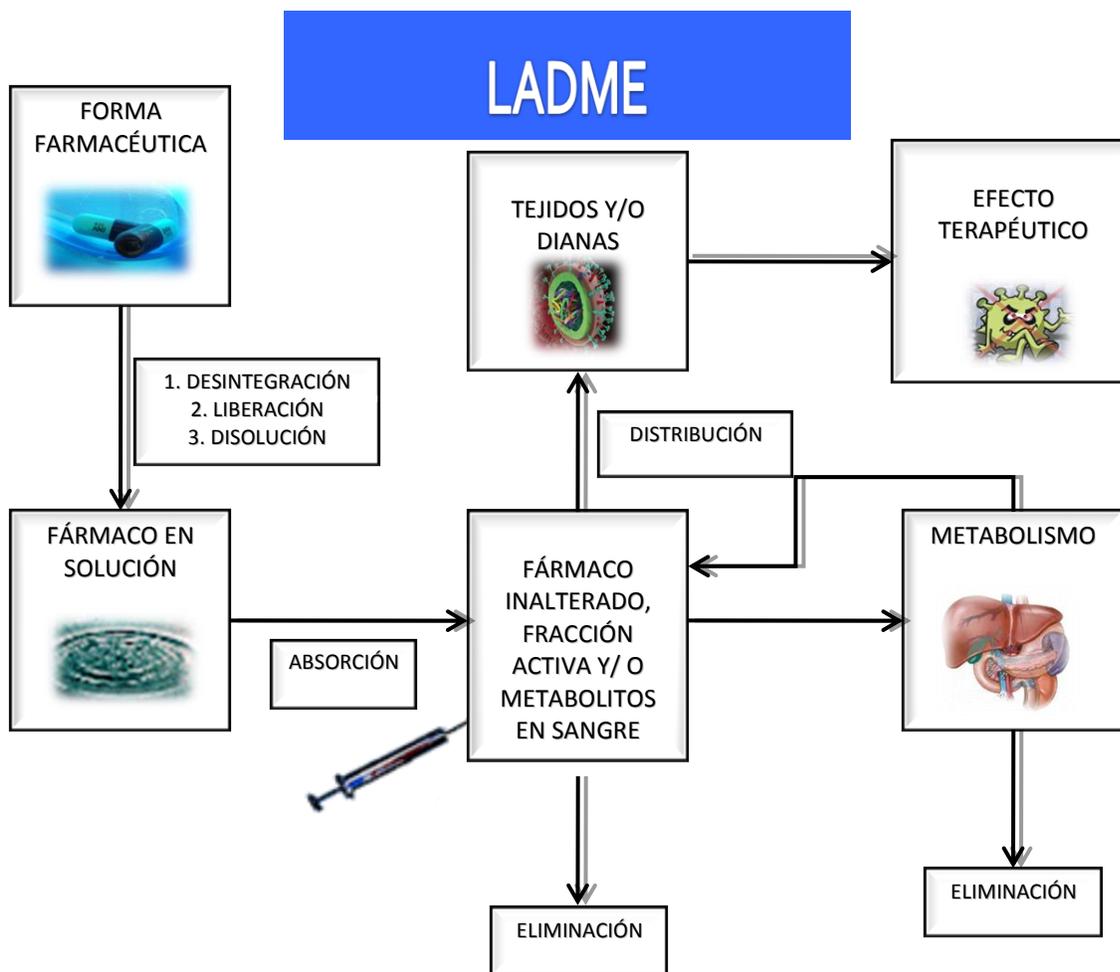


Figura 1. Procesos involucrados en el sistema LADME. (Vázquez L. L., 2011.)

El objetivo de administrar un fármaco es producir un efecto terapéutico, para lo cual es de vital importancia calcular la concentración de fármaco a un tiempo en particular para así determinar la dosis, la frecuencia y la vía de administración (Gibson y Skett, 1994) apropiada del fármaco.

Dos aspectos importantes en la administración de fármacos son la intensidad y duración del efecto terapéutico, esto está relacionado con la concentración de fármaco en el sitio de acción y el tiempo durante el cual el fármaco alcanza dicha concentración, (Gibson y Skett, 1994) la cual depende de la dosis administrada, la forma farmacéutica, el grado de absorción, distribución, metabolismo y excreción.



La cuantificación de los fármacos en los fluidos biológicos y su cambio de concentración con respecto al tiempo es por tanto, un importante ejercicio en la determinación de la acción de un fármaco (Gibson y Skett, 1994) y a su vez, es un indicativo del éxito o fracaso de un tratamiento.

Para interpretar los resultados obtenidos de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, se utilizan parámetros como la concentración máxima alcanzada (C_{max}), el tiempo en el que se alcanza dicha concentración (T_{max}), el área bajo la curva (ABC), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el volumen de distribución (Vd) y la depuración (Cl).

Los parámetros C_{max} y T_{max} proporcionan la velocidad de absorción, de manera que si el fármaco se absorbe más lento, se alcanzaran concentraciones menores y si se absorbe rápido, será lo contrario (Flores-Murrieta et. al. 2002). El área bajo la curva (ABC) caracteriza la absorción del fármaco en el organismo, la cual es proporcional no solo con la concentración de plasma alcanzada, sino también con el tiempo en el que dichas concentraciones persisten en la sangre (Sarfaraz, 2007), por lo tanto permite la estimación de la biodisponibilidad la cual se define como la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se define como el tiempo en el cual la concentración de fármaco disminuye en un 50%. El volumen de distribución (Vd) es una aproximación del volumen en el cual se encuentra inmerso el fármaco en el organismo y la depuración (Cl) se refiere a la cantidad de fármaco eliminada.

Para establecer una relación entre la concentración de fármaco en el organismo y el efecto, se llevan a cabo estudios en voluntarios sanos o en pacientes que reciben el fármaco por vía sistémica, a diversos tiempos se toman muestras de sangre y se mide la concentración en plasma (puede ser también en suero, sangre total u orina) y se relacionan los valores de concentración con el efecto (Flores-Murrieta et. al. 2002).

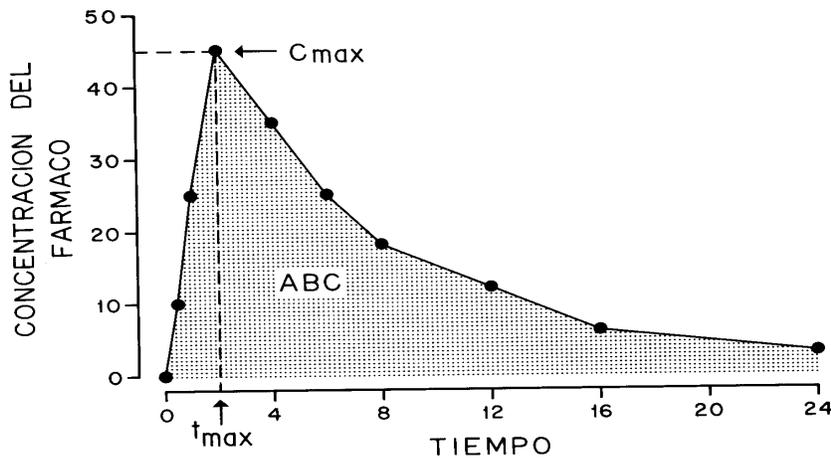


Figura 2. Curva de concentración plasmática contra tiempo después de la administración de un fármaco por vía oral. (Flores-Murrieta et. al. 2002).

2.1.1 Liberación.

Las variaciones en la biodisponibilidad de la mayoría de los fármacos son el resultado de modificaciones principalmente en la formulación de los medicamentos, con el fin de optimizar la absorción en el organismo. El propósito de las formulaciones farmacéuticas es diseñar una forma de dosificación que reúna los siguientes atributos:

- El contenido de fármaco se debe encontrar en la cantidad correcta.
- El fármaco debe estar inmerso en una matriz que le permita su liberación a la circulación general a una velocidad y en tiempo óptimos.
- Su administración debe ser posible a través de una vía adecuada y a su vez, aceptable para los pacientes.

Las características de la forma farmacéutica tales como el tamaño de partícula, la forma del cristal, el tipo de solvente y la velocidad de disolución así como los aditivos que la acompañan contribuyen al diseño de la formulación. Dichos aditivos deben ser inertes, como los aglutinantes o lubricantes pero presentan en la mayoría de los casos la



capacidad de modificar la absorción, el metabolismo, la biotransformación o la excreción de los agentes terapéuticos (Sarfraz, 2007).

Los fármacos deben estar disueltos en el organismo para poder cruzar las barreras biológicas como la mucosa gastrointestinal, sin embargo, la **disolución** por sí sola no es suficiente garantía de que el fármaco podrá ser absorbido. Las moléculas de fármaco deben tener las características necesarias para atravesar las diversas capas lipídicas o membranas celulares para finalmente llegar a la circulación general de manera que el balance entre la solubilidad de los fármacos en medios acuosos y lipoides es un paso limitante en la obtención de la concentración de fármaco para conseguir la respuesta terapéutica.

Para un fármaco que presenta baja solubilidad, cristaliza fácilmente a partir de una solución acuosa e, incluso, es muy inestable, la formulación en suspensión es una alternativa para reducir estos problemas. La utilización de suspensiones tiene ventajas en la práctica pediátrica y geriátrica donde pueden ser administrados fácilmente utilizando cucharas o bien jeringas, además de que aumentan la superficie de contacto sobre el área de administración. Las suspensiones son formas de dosificación que se han utilizado para diversas vías de administración con excepción de la administración intravascular (Sarfraz, 2007).

Las suspensiones requieren de la disolución de las partículas antes de que estas puedan ser absorbidas. El proceso de disolución presenta una velocidad limitada, dependiendo de la velocidad en medio acuoso tanto del fármaco como de los excipientes de la formulación.

**2.1.2 Absorción.**

Al administrar un fármaco por vía sistémica, éste llega a la sangre mediante el proceso llamado absorción (Flores-Murrieta et. al. 2002) y varía de acuerdo con la vía de administración, a excepción de la inyección intravenosa, debido a que el fármaco administrado por esta vía, al depositarse de forma total en circulación, no presenta el proceso de absorción. El fármaco se diluye en el plasma y de esta manera puede llegar a todos los tejidos irrigados por la circulación sanguínea.

Para que un fármaco ejerza sus efectos de manera óptima, se necesita que la formulación en la que es administrado presente una adecuada biodisponibilidad (Flores-Murrieta et. al. 2002). La sobredosificación y la subdosificación relativa a la dosis prescrita se pueden detectar por mediciones de la concentración cuando se obtienen considerables desviaciones de los valores esperados. Si se encuentra que el apego es adecuado, probablemente la causa sea una anomalía de absorción en el intestino delgado. Es poco común que las variaciones en el grado de biodisponibilidad sean causadas por irregularidades en la fabricación de las formas farmacéuticas y generalmente son debidas al metabolismo durante la absorción (Katzung, 2005).

La velocidad de absorción también es un factor a considerar en este proceso, ya que si el principio activo se absorbe muy rápido, se producen concentraciones plasmáticas muy elevadas que conllevan a un riesgo de toxicidad en lapsos de tiempo cortos, sin embargo, si la absorción es lenta, las concentraciones de fármaco serán bajas, lo que tiene como consecuencia la ineficacia del tratamiento (Flores-Murrieta et. al. 2002).

El proceso de absorción puede ocurrir por dos vías, ya sea por difusión pasiva o transporte activo, principalmente.



La difusión pasiva es el desplazamiento de las moléculas a partir de una región que contiene concentraciones altas de fármaco hacia una región con concentración baja de fármaco (a favor de gradiente de concentración) y sin gasto de energía.

La fuerza que actúa para la difusión pasiva es la concentración o el gradiente eléctrico a través de la membrana que separa el lumen gastrointestinal de la circulación sanguínea. En muchas instancias, la concentración en plasma es mucho más baja que la concentración en el tracto gastrointestinal debido al rápido movimiento del fármaco absorbido por la circulación sanguínea, haciendo la velocidad de transporte a través de la membrana proporcional al potencial químico solo en el tracto gastrointestinal.

Además del gradiente de concentración, la velocidad de difusión depende de la permeabilidad de la membrana. La membrana gastrointestinal actúa como una barrera lipídica la cual permite el paso principalmente de moléculas solubles en lípidos, sin embargo, las moléculas más hidrofílicas atraviesan con más dificultad.

El transporte activo es un proceso especializado que requiere del gasto de energía, el cual toma lugar en contra de un gradiente de concentración (contrario a lo que ocurre en la difusión pasiva) y la mayoría de las veces con la participación de enzimas, las cuales se saturan a altas concentraciones de fármaco. Los procesos de transporte activo estudiados en el tracto gastrointestinal son principalmente estructura-específicos y trabajan en la absorción de sustancias naturales, tales como monosacáridos, aminoácidos, pirimidinas, sales biliares y ciertas vitaminas. Existe evidencia de que algunos fármacos son muy similares en su estructura a compuestos endógenos y que son absorbidos mediante los mismos procesos de transporte activo.

Otro mecanismo por el cual los fármacos pueden ser absorbidos por el organismo es la **pinocitosis**, el cual es un proceso de absorción física el cual consiste en la formación de invaginaciones de las membranas celulares que engloban material particulado o bien, en gotas. Es la única forma de transporte en la cual el fármaco no necesita estar



disuelto en medio acuoso para ser absorbido. Muy pocos compuestos son absorbidos por este mecanismo y su mayor importancia radica en la captación de nutrientes (Sarfara, 2007).

La administración oral es la más común por su sencillez, a menos que se requiera de un efecto local (como en superficies epiteliales) o bien, de un efecto terapéutico rápido (administración intravenosa). En la administración oral, el fármaco se absorbe una vez que llega al intestino delgado e ingresa a la circulación venosa periférica, prácticamente de forma exclusiva, a través del sistema portal del hígado (Gibaldi y Perrier, 1982). Además, si un medicamento se biotransforma rápidamente en el hígado, puede sufrir una degradación sustancial antes de alcanzar la circulación sistémica. La captación y eliminación en el hígado durante el primer recorrido del medicamento en la circulación, tras su administración por vía hepática, puede evitar que una fracción importante de la dosis administrada alcance el lugar periférico. Este fenómeno se conoce generalmente como efecto del primer paso (Gibaldi y Perrier, 1982).

2.1.3 Distribución.

La mayoría de los medicamentos que penetran en la circulación sistémica necesitan de un tiempo finito para distribuirse por completo en todo el espacio corporal disponible (Gibaldi y Perrier, 1982).

La distribución se define como la transferencia reversible de un fármaco a partir de un lugar a otro dentro del organismo. La distribución hacia la sangre y de la sangre a otros tejidos ocurre a diferentes velocidades y extensiones. Existen factores determinantes en la distribución de los fármacos como son la liberación del fármaco de la sangre a los tejidos, la capacidad de atravesar membranas, la unión a proteínas plasmáticas y tejidos, y su solubilidad en lípidos. La difusión hacia los tejidos, continúa hasta que se establece un equilibrio entre la forma difusible entre el tejido y la sangre que perfunde (Rowland y Tozer, 1995). Puesto que la distribución del medicamento está relacionada



con el flujo sanguíneo, los órganos y tejidos bien perfundidos como el hígado y el riñón, han de alcanzar con rapidez su equilibrio de distribución con la sangre. Frecuentemente la sangre y todos los fluidos y tejidos rápidamente accesibles pueden tratarse cinéticamente como una unidad homogénea que comúnmente se conoce como compartimento central. Al llegar a éste, diversos equilibrios se manifiestan debido a la unión del fármaco con las proteínas plasmáticas como albúmina para el caso de fármacos ácidos; para el caso de fármacos básicos la unión se da frecuentemente con la alfa-glicoproteína ácida y con las lipoproteínas. La distribución dentro de cada tejido implica múltiples equilibrios (Gibaldi y Perrier, 1982).

2.1.4 Metabolismo.

Existe una gran variedad de rutas por las cuales los fármacos son metabolizados o biotransformados e involucran reacciones tales como oxidación, reducción, hidrólisis, hidratación, conjugación y condensación y es importante su estudio para determinar si estas rutas tendrán como consecuencia actividad farmacológica o toxicológica (Gibson y Skett, 1994). El metabolismo de fármacos se divide en dos fases (tabla 1); la fase I (no sintética) en las cuales se produce un cambio en un grupo funcional para generar moléculas más polares, para así facilitar su eliminación o bien, generar metabolitos con actividad más potente, y la fase II (sintética), consiste en la adición de grupos funcionales formando enlaces covalentes gracias a la participación de un diverso grupo de enzimas, las cuales actúan a nivel de la región donde se produjo la reacción de fase I (tabla 2), dando lugar a un producto muy soluble en agua, el cual puede ser excretado por bilis u orina.



Tabla 1. Fases del metabolismo de fármacos y las principales reacciones que ocurren en cada una de ellas. (Gibson y Skett, 1994).

Fase I	Fase II
Oxidación	Glucuronidación
Reducción	Sulfatación
Hidrólisis	Metilación
Hidratación	Acetilación
Isomerización	Conjugación con aminoácidos, glutatión o ácidos grasos
	Condensación

Tabla 2. Clasificación de las reacciones de biotransformación (Gibson y Skett, 1994).

Reacción	Enzima	Grupo funcional
Glucuronidación	UDP-Glucuroniltransferasa	-OH, -COOH, -NH ₂ , -SH
Glicosilación	UDP-Glicosiltransferasa	-OH, -COOH, -SH
Sulfatación	Sulfotransferasa	-NH ₂ , -SO ₂ NH ₂ , -OH
Metilación	Metiltransferasa	-OH, -NH ₂
Acetilación	Acetiltransferasa	-NH ₂ , -SO ₂ NH ₂ , -OH
Conjugación aminoacídica		-COOH
Conjugación con glutatión	Glutatión-S-transferasa	Epóxido
Conjugación con ácidos grasos		-OH
Condensación		Varios

El principal órgano donde ocurre la biotransformación de fármacos, es el hígado, además del tracto gastrointestinal, los riñones, los pulmones, el cerebro, la placenta, entre otros (Gibson y Skett, 1994).



En ocasiones, el compuesto administrado es un profármaco inerte, el cual depende del metabolismo por activación. Algunos metabolitos presentan propiedades farmacológicas en común con el profármaco (Rowland y Tozer, 1995) e incluso pueden llegar a niveles máximos en el sitio de acción, aumentando la respuesta farmacológica. Otros, presentan un perfil farmacológico diferente causando efectos tóxicos en el organismo. Existen metabolitos que son inactivos pero pueden actuar como inhibidores, prolongando o acortando la respuesta de un fármaco. Otros afectan la disposición del fármaco compitiendo por la unión a las proteínas plasmáticas o por sitios de unión en tejidos (Rowland y Tozer, 1995).

Muchas enzimas que metabolizan fármacos se localizan en las membranas del retículo endoplásmico de las células del hígado, principalmente. Cuando estas membranas se aíslan por homogeneización y fragmentación se forman vesículas que se denominan microsomas, las cuales conservan las propiedades morfológicas del retículo rugoso y liso. En los microsomas lisos se encuentran una clase importante de enzimas conocidas como monooxigenasas. La actividad de estas enzimas requiere NADPH como agente reductor y oxígeno molecular (Katzung, 2005). Existen dos principales tipos de estas enzimas microsómicas, la NADPH-citocromo-reductasa y la citocromo P450 (Gibson y Skett, 1994). Se han identificado numerosas isoformas en hepatocitos humanos, las principales CYPs son 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 y 3A4, siendo esta última la más notable ya que es la responsable de más del 50% del metabolismo hepático de los fármacos que actualmente se prescriben (Katzung, 2005).

Algunos sustratos químicamente diferentes, con administración repetida, inducen al sistema P450 aumentando la velocidad de su síntesis o reduciendo la velocidad de degradación. La inducción da como resultado la aceleración del metabolismo, lo que lleva a la reducción de la actividad farmacológica del inductor y también de los fármacos que se administran de manera simultánea con él. En el caso de fármacos que sufren biotransformación y que dan origen a metabolitos activos, la inducción enzimática puede aumentar la toxicidad del fármaco para el organismo. Otros sustratos inhiben de



manera irreversible al sistema P450, uniéndose de modo covalente a un intermediario activo generado por el metabolismo, el cual puede reaccionar con la apoproteína P450 o la mitad hem del citocromo o bien, inducir la fragmentación del grupo hem y modificar irreversiblemente la apoproteína (Katzung, 2005).

2.1.5. Excreción.

La eliminación es la pérdida irreversible del fármaco del sitio de acción y dicha eliminación ocurre por dos procesos, la excreción y el metabolismo.

La vía de excreción predominante son los riñones, donde son eliminados fármacos y metabolitos polares, seguido de la bilis, para aquellos fármacos que presentan recirculación enterohepática, y el pulmón, éste último para el caso de compuestos volátiles. Otras vías de eliminación son a través de glándulas como las sudoríparas, salivales, lagrimales y mamarias.

En la excreción renal, cuando la sangre circula a través de los glomérulos, se separan de ella aproximadamente 125 mL/min, que representa del 20 al 25% del gasto cardiaco, (Rowland y Tozer, 1995) un filtrado libre de proteínas y los solutos inmersos en él se encuentran limitados en tamaño molecular. En general, los fármacos y sus metabolitos son de tamaño molecular relativamente pequeño respecto a las proteínas, sin embargo, la eliminación por orina se observa retardada debido a la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas con peso molecular elevado. Además de la filtración glomerular, algunos fármacos son excretados a los túbulos renales. Este proceso es considerado activo, es decir, que el movimiento de las moléculas se realiza contra gradiente de concentración y al parecer no hay influencia de la fracción de fármaco unida a proteínas plasmáticas como sucede en la filtración glomerular (Gibaldi y Perrier, 1982).

Si el fármaco es polar, tanto la cantidad filtrada por el glomérulo y la secretada activamente pasa por el asa de Henle y de los túbulos distales al conducto colector, el cual desemboca en la vejiga para finalmente ser eliminado por la orina. Debido a que el



riñón tiene la capacidad de reabsorber compuestos y iones de estos túbulos, se produce una concentración acumulativa del medicamento en el filtrado cuando éste pasa a través de los túbulos, lo cual origina un gradiente de concentración que aumenta de acuerdo a la distancia en la cual se encuentren los túbulos por los que pasan los solutos y favorece la reabsorción de moléculas del medicamento desde el fluido del lumen renal a la sangre. La difusión simple juega un papel importante en la reabsorción en el caso de los fármacos no polares, dependiendo de su carácter ácido o básico y del pH urinario, ya que las modificaciones al pH de la orina representan variaciones significativas en las cantidades relativas de las formas ionizadas y no ionizadas de los fármacos (Gibaldi y Perrier, 1982).

Se pueden encontrar pequeñas moléculas de fármaco en la bilis. Los fármacos que entran, pasan de la bilis al intestino después de que se almacenaron en la vesícula biliar. Una vez metabolizados en el hígado como glucurónidos, son secretados en el intestino, donde las enzimas beta-glucuronidasa de la flora residente hidrolizan de nuevo al fármaco, el cual se reabsorbe (Rowland y Tozer, 1995).

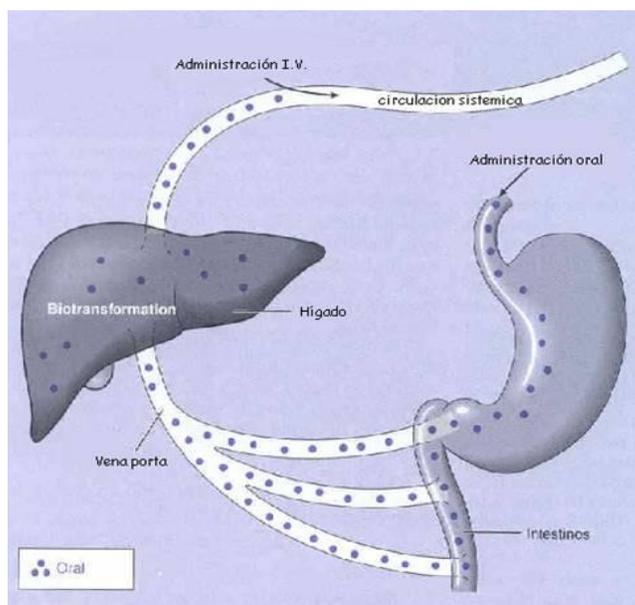


Figura 3. Ciclo enterohepático. (Valsecia M, presentación de farmacología en pdf).



Cualquier fármaco no reabsorbido, ya sea directa o indirectamente hacia un metabolito se excreta del cuerpo a través de las heces.

2.1.6. Factores que modifican la farmacocinética.

Las razones por las que se pueden encontrar variaciones farmacocinética entre los individuos son muy diversas, tales como la constitución genética, enfermedades (sobre todo aquellas que comprometen al hígado y a los riñones), la edad, el género, el peso, los medicamentos administrados concomitantemente, factores ambientales, el embarazo, la alimentación, entre otras.

Un punto de gran importancia es el estado funcional de los riñones. Las enfermedades renales disminuyen la capacidad del riñón para eliminar los fármacos por filtración glomerular y/o secreción tubular, lo cual provoca una excesiva acumulación de los fármacos y/o metabolitos generando riesgo de toxicidad (Gibaldi y Perrier, 1982).

De igual forma, si el hígado se encuentra afectado por enfermedades como la hepatitis, cirrosis biliar o alcohólica activa o inactiva, hemocromatosis, hígado graso o bien, traumatismos, alteran, dependiendo de la gravedad, la actividad enzimática de los hepatocitos, en particular de las oxidasas microsómicas. Algunos fármacos se metabolizan tan rápido que la disminución de la función hepática no prolonga de forma significativa su acción. Sin embargo, las afecciones cardíacas, al limitar el flujo sanguíneo al hígado, afectan la eliminación de fármacos cuyo metabolismo depende del flujo, de manera que los fármacos que se metabolizan rápido en el hígado, su depuración es muy similar al flujo sanguíneo hepático (Katzung, 2005).



2.2 FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía es la ciencia de separar componentes de una muestra. Esta separación se realiza mediante diversas técnicas y basándose en las diferencias moleculares de los analitos involucrados., es decir, las moléculas pueden separarse por sus diferencias de carga, tamaño, masa, polaridad del enlace, potencial redox, constante de ionización, y arreglos de los enlaces tales como la estructura de los isómeros o la quiralidad (Rubinson y Runbinson, 2000).

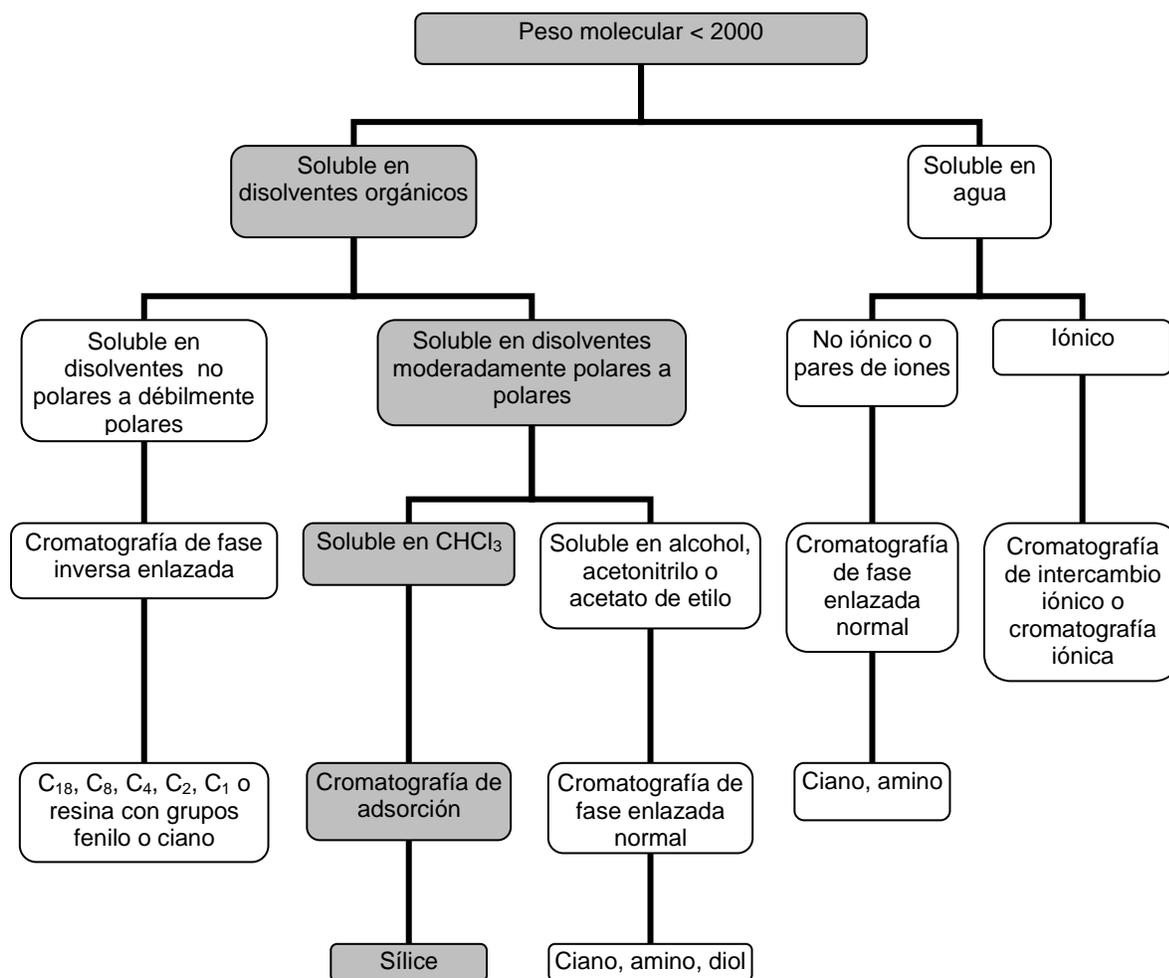


Figura 4. Árbol de selección de modo de separación en cromatografía. (Harris DC, 2001).



El fundamento de la cromatografía es similar a una extracción líquido-líquido, con excepción de que una fase queda fija (fase estacionaria), mientras que la otra se mueve a través de la primera (fase móvil) (Harris, 2001), la cual es bombeada por un pistón que hace presión directamente sobre dicha fase móvil para así obtener un flujo constante, las muestras se cargan por un inyector para depositarse posteriormente a una columna, la cual contiene la fase estacionaria, en la cual se realiza el proceso de separación y generalmente cuenta con un termostato para una mayor reproducibilidad en el análisis y, conforme se separan los compuestos a lo largo de la columna, éstos eluyen a un tiempo determinado y la cantidad contenida en la muestra proporciona una respuesta, que es medida por un detector (Rubinson y Runbinson, 2000) y finalmente queda registrada a través de un gráfico conocido como cromatograma que representa la respuesta del detector en función del tiempo. La señal característica del o los analitos en cuestión se identifican como picos que eluyen a un tiempo determinado y la respuesta emitida es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, por su siglas en inglés) utiliza una fase móvil líquida y una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo separaciones con excelente resolución (Harris, 2001).

En la cromatografía de líquidos en fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Lo más común es la utilización de fases estacionarias que contengan grupos no polares enlazados covalentemente con sílica como $-C_8H_{17}$ o $C_{18}H_{37}$, o bien, con grupos funcionales como el amino, ciano, fenilo, principalmente (ver tabla 3). Los grupos orgánicos entrelazados ejercen un efecto similar al que produciría una capa muy delgada de solvente orgánico en la superficie de las partículas de sílica, de manera que los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil, como sucede en la extracción líquido-líquido. Las cadenas más largas interactúan con más fuerza con los analitos que se disuelven perfectamente en una fuerza orgánica.

**Tabla 3.** Fases estacionarias empleadas en HPLC. (Harris DC, 2001).

Fases polares comunes	Fases no polares comunes
R = (CH ₂) ₃ NH ₂ Amino	R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃ Octadecilo
R = (CH ₂) ₃ CN ≡ Ciano	R = (CH ₂) ₇ CH ₃ Octilo
R = (CH ₂) ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH Diol	R = (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅ Fenilo

La sílice se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que no se puede utilizar por encima de este valor, sin embargo, algunos empaques que resisten pH hasta de 9 ó 10.

La cromatografía de líquidos de fase reversa es muy popular, ya que los picos en este tipo de separación son más finos y simétricos y las reacciones de equilibrio de adsorción-desorción son rápidas (Rubinson y Runbinson, 2000).

Las columnas donde va contenida la fase estacionaria son generalmente de acero de una longitud de 3 a 30 cm con un diámetro interior de 1 a 5 mm. La mayoría de las veces las columnas se llevan a una determinada temperatura, lo que provoca que la viscosidad de la fase móvil disminuya, así como la presión y esto permita un mejor flujo. Al aumentar la temperatura es posible acortar los tiempos de retención de los analitos y mejorar la resolución de los picos ya que aumenta la velocidad de difusión de los mismos. Lo recomendable es calentar la columna a unos cuantos grados por encima de la temperatura ambiente y se mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención y en la cuantificación (Harris, 2001).

En cromatografía, el disolvente compite con las moléculas del soluto por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria. En contraste con las series eluotrópicas para las fases estacionarias como sílica y alúmina, los disolventes menos polares son eluyentes más poderosos en las separaciones de fase inversa. En general, el poder de elución de fase inversa se indica mediante una escala numérica denominada índice de polaridad.



La mayoría de las veces, las separaciones se llevan a cabo con un solo disolvente o bien con una mezcla en proporciones fijas, a esto se le llama elución isocrática; pero si un disolvente no permite que la elución de los analitos sea rápida, se puede utilizar la elución en gradiente, la cual consiste en aumentar la proporción de un solvente respecto a otro, produciendo un gradiente continuo.

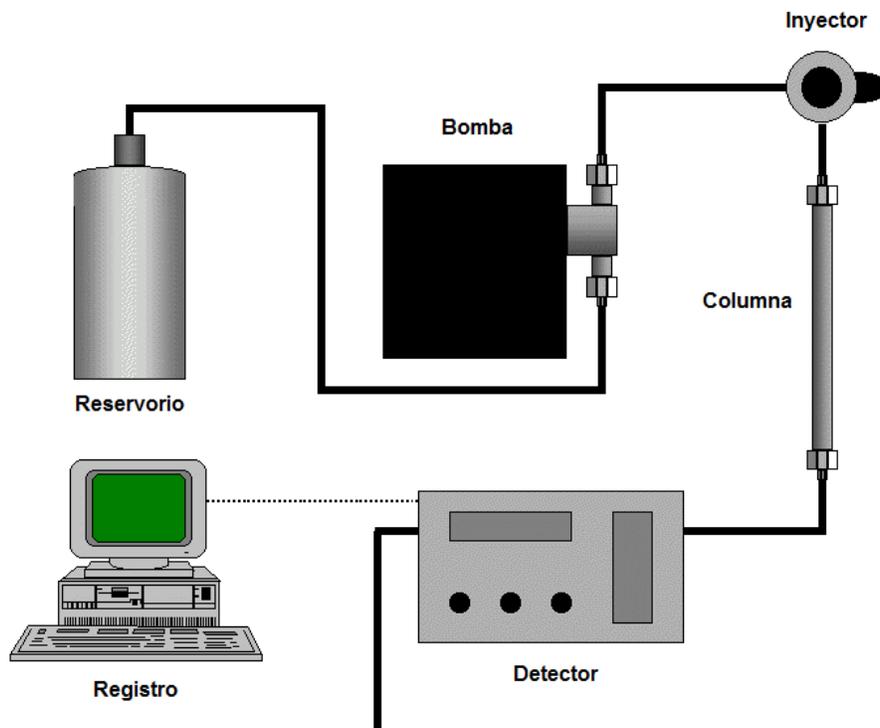


Figura 5. Representación esquemática del sistema HPLC.

Bombas y válvula de inyección

Una bomba de HPLC de buena calidad debe responder eficientemente con flujos constantes y reproducibles, de lo contrario el detector producirá señales con exceso de ruido, lo cual no permite que se vean bien las señales más pequeñas.

La válvula de inyección, utiliza diferentes “loops” que son intercambiables para la carga de muestras, son de volumen fijo que van de los 2 a 1000 μL . En los inyectores manuales se utiliza una jeringa en la posición de carga para lavar y llenar el loop con



una nueva muestra a presión atmosférica. El líquido proveniente de la bomba a alta presión pasa a un lado de la válvula y cuando esta gira en sentido contrario a las agujas del reloj, introduce la muestra a alta presión hacia la columna.

Detectores espectrofotométricos

El detector que más comúnmente se utiliza es el detector de ultravioleta que utiliza una celda de flujo. Los sistemas más simples suele utilizar la intensa línea de emisión de 254 nm de una lámpara de mercurio. Otros detectores utilizan lámpara de deuterio, xenón o volframio y un monocromador que permite elegir la longitud de onda apropiada de ultravioleta o visible para detectar los analitos a cuantificar. Este tipo de detectores pueden alcanzar intervalos de escala completa de 0.0005 a 3 unidades de absorbancia. Los detectores de ultravioleta son recomendables para elución en gradiente.

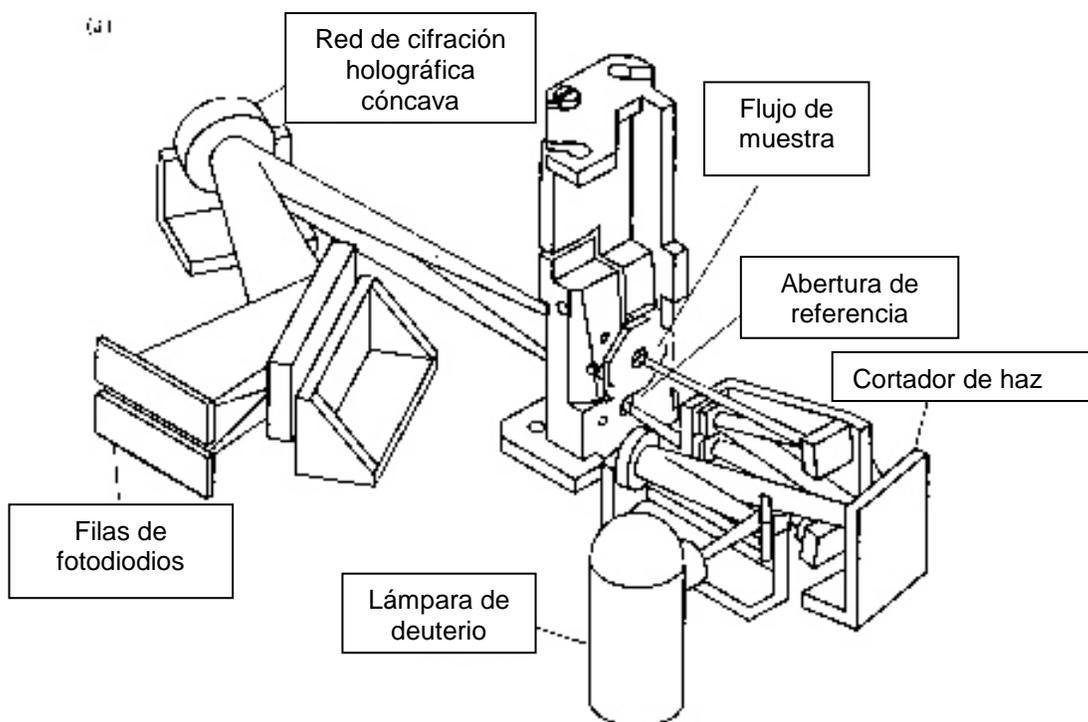


Figura 6. Componentes del detector de ultravioleta. (Harris DC, 2001).



Los detectores de fluorescencia detectan los analitos mediante excitación con un láser y miden su emisión de fluorescencia. Para ello, se necesita enlazar a los analitos de forma covalente con grupos fluorescentes o electroactivos. Este proceso se conoce como derivatización y se puede llevar a cabo durante el procesamiento de las muestras o introduciendo los reactivos al eluato entre la columna y el detector, justo antes de su análisis.

Existen otro tipo de detectores como el detector de índice de refracción, el cual responde casi a cualquier analito, incluso aquellos que no absorben en el ultravioleta, sin embargo sus límites de detección son hasta 1000 veces mayores que el de un detector de ultravioleta, por lo cual es imposible analizar trazas debido a su baja sensibilidad, además de que no se puede trabajar con elución en gradiente, ya que no se puede ajustar exactamente la referencia y la muestra mientras varía la proporción de fase móvil. El detector de dispersión de luz responde a todos los solutos que son menos volátiles que la fase móvil. Estos detectores responden a la masa del analito, no a su estructura o peso molecular y las respuestas que producen no son lineales, de manera que se recurre a polinomios para diseñar las curvas de calibración.

El detector electroquímico responde a analitos que se oxidan o reducen. Para analitos oxidables se utilizan electrodos de cobre o de carbón vitrificado, mientras que para los analitos reducibles se utiliza el electrodo de gotas de mercurio. La corriente es proporcional a la concentración de soluto en el intervalo de seis órdenes de magnitud. Se recomienda trabajar con soluciones acuosas o disolventes que contengan electrolitos y tienen que estar libres de oxígeno. El detector es muy sensible a variaciones de velocidad de flujo y temperatura.

Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es la técnica más moderna que se utiliza en cromatografía de gases y líquidos. El espectrómetro es altamente selectivo, lo cual hace que las



muestras se preparen fácilmente aumentando la relación señal-ruido y disminuye el límite de detección de los analitos.

Un problema que representa al acoplar estas dos técnicas de análisis, es que el analito va acarreado de una cantidad grande de disolvente, ya que los espectrómetros de masas son aparatos de alto vacío que no pueden recibir los volúmenes de disolvente a la velocidad que maneja el HPLC, de manera que se deben utilizar columnas cromatográficas con el menor diámetro interno posible y utilizar tubos de conexión muy estrechos y evitar compuestos no volátiles en la fase móvil como las soluciones amortiguadoras de fosfatos.

2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

La validación del método para la determinación de la OXC y su metabolito MDH se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998; que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas; la cual nos rige en nuestro país y a su vez está basada en regulaciones internacionales como las de Estados Unidos a través de la FDA y de Europa como la EMEA.

2.3.1 Definiciones

Para efectos de este trabajo, se presentan a continuación definiciones útiles aplicadas en la parte experimental para su mejor comprensión:

La ***selectividad del método***, se define como la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.



La **linealidad** es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

La **precisión** indica el grado de variación entre los resultados analíticos individuales ya sea en un mismo día (repetibilidad) o en distintos días de análisis (reproducibilidad).

La **repetibilidad** es una medida de la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida en determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones analíticas.

La **reproducibilidad intralaboratorio** se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas y/o analistas.

La **exactitud del método** es la concordancia de los valores obtenidos experimentalmente con los valores de referencia.

El **recobro (recuperación absoluta)** es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

El **límite de cuantificación** se refiere a la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. De acuerdo con las guías de la FDA, este nivel de concentración debe ser mayor que la señal ruido un mínimo de 10 veces.

El **límite de detección** es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas; las guías de la FDA establecen que este límite debe distinguirse visualmente de la señal ruido y ser mayor a éste 3 veces como mínimo.



La estabilidad de la muestra se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Se debe determinar bajo condiciones de temperatura y tiempo entre otros en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras separadas por triplicado en los tres niveles de concentración dentro del rango, considerando evaluar por lo menos la estabilidad de acuerdo a las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis, así como los ciclos de congelación-descongelación.

Efecto de dilución : Esta prueba no se considera dentro de los requisitos de validación de la norma, sin embargo, se debe tomar en cuenta como contingencia cuando se obtengan concentraciones por encima del rango ya que la muestra puede diluirse con el mismo tipo de matriz biológica.

La evaluación de la **tolerancia** del método analítico se refiere a pequeñas pero deliberadas modificaciones, como pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación) al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica, los resultados pueden o no ser significativos y hay que reportar la variabilidad obtenida con estas modificaciones y establecer si el método es tolerante a esos cambios o no.



2.4. OXCARBACEPINA Y MDH

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

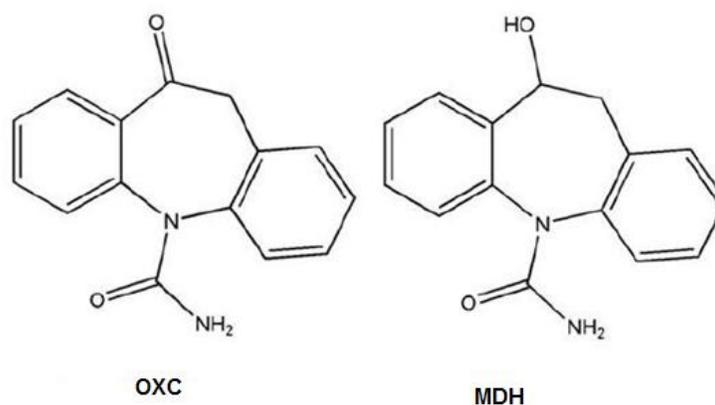


Figura 7. Estructuras químicas de oxcarbacepina (OXC) y su metabolito activo MDH.

La oxcarbacepina (OXC) tiene como nombre IUPAC (10,11-dihidro-10-oxo-5H-dibenz [b,f] azepina-5-carboxamida), es un sólido color rosa claro, inodoro, cuya fórmula química es $C_{15}H_{12}N_2O_2$ y tiene un peso molecular de 252.268 g/mol, es un compuesto lipofílico neutro con baja solubilidad en agua (308 mg/L a 25°C). Poco soluble en cloroformo, diclorometano, acetona y metanol, soluble en acetonitrilo, con pKa de 10.7 ± 0.2 y log P de 1.76. Se debe almacenar en un lugar fresco y seco a menos de 30°C, protegido de la luz. No se le ha demostrado polimorfismo en su presentación física, ni propiedades quirales especiales.

El metabolito activo de la oxcarbacepina, 10,11-dihidro-10-hidroxi-5H-dibenzo (b,f)acepina-5-carboxamida (MDH), es un sólido color blanco, inodoro, cuya fórmula química es $C_{15}H_{14}N_2O_2$ con peso molecular 254 g/mol, soluble en acetonitrilo. Presenta buena estabilidad, se debe mantener alejado de agentes oxidantes fuertes, no se descompone por polimerización, se debe mantener almacenado a -20°C.



2.4.2. Farmacocinética y farmacodinamia

La oxcarbacepina, fue desarrollada para proveer un compuesto estructuralmente similar a la carbamacepina para imitar su eficacia y seguridad al mismo tiempo que se aminoran las reacciones adversas, ya que su biotransformación no involucra la formación del metabolito epóxido, la inducción microsomal hepática y la autoinducción se ve altamente reducida.

La oxcarbacepina es una análogo ceto de la carbamacepina. Como esta, tiene un núcleo dibenzacepina con sustituto en la posición 5-carboxamida pero diferente en la posición 10,11. La oxcarbacepina es un compuesto lipofílico neutro con muy baja solubilidad en agua. En humanos, OXC se metaboliza rápidamente a su metabolito activo MDH (Tecoma, 1999).

El mecanismo de acción de la oxcarbacepina se cree que se debe principalmente al bloqueo de los canales de sodio sensibles al voltaje, dando como resultado la estabilización de las membranas neuronales hiperexcitadas, inhibición de los “disparos” neuronales repetitivos e inhibición de la propagación de descargas, lo cual incrementa la conductancia de potasio, reduce la transmisión glutaminérgica y modula la función de los canales de calcio (Shorvon, 2000).

La oxcarbacepina se absorbe completamente en humanos con poca afectación en la biodisponibilidad debido a la alimentación, por lo tanto puede administrarse con o sin alimentos.

El volumen aparente de distribución del MDH es de 49 litros (dosis de 600 mg). Aproximadamente, 40% del MDH se une a las proteínas séricas, principalmente a la albúmina. La unión es independiente de la concentración sérica, en el intervalo terapéutico de interés. Tanto la oxcarbacepina como el MDH no se unen a la alfa-glicoproteína ácida.



La reducción a MDH se lleva a cabo por las alquilceto reductasas del citosol y, marginalmente hidroxilado, alrededor de un 4% de la dosis (Baruzzi et. al., 1994 y Lloyd et. al. 1994) al derivado 10,11-dihidro-10,11-trans-hidroxi-carbamacepina (DHD). El MDH tiene una potencia equivalente a la oxcarbacepina en la actividad anticonvulsivante y se acumula en grandes cantidades en el suero (Krasowski, 2010) en plasma aparece como una mezcla 4:1 de S-Licarbacepina y R-Licarbacepina (Lloyd et. al., 1994 y Fortuna et. al., 2010).

MDH es inactivado por conjugación a glucurónido y eliminado por excreción renal. Cerca del 96% de la oxcarbacepina es excretada por los riñones y menos del 1% como oxcarbacepina intacta. La excreción fecal representa menos del 4% de la dosis. 83% como MDH o su conjugado glucurónido, 0.3-3% como oxcarbacepina sin cambios y del 4-7% como DHD.

La oxcarbacepina se elimina rápidamente del plasma con valores de vida media entre 1.2 y 2.3 horas, mientras que la vida media del MDH es en promedio de 9.3 ± 1.8 horas.

La depuración renal del MDH conjugado y no conjugado se correlaciona con la depuración de creatinina (Tecoma, 1999). La depuración del metabolito 10-monohidroxi se reduce en la vejez y en insuficiencia renal, se incrementa en el embarazo y en pacientes que consumen fármacos inductores de las enzimas hepáticas (Krasowski, 2010). En general, la autoinducción del metabolismo no ocurre con OXC, una politerapia se simplifica cuando OXC se utiliza en combinación con otros fármacos inductores de enzimas, siendo este uno de los principales motivos por el cual se prefiere a este fármaco en lugar de la carbamacepina.

Aunque el rango terapéutico de MDH no se encuentra establecido, la experiencia clínica sugiere el intervalo objetivo en el plasma es de 50-125 $\mu\text{mol/L}$ (Tecoma, 1999).



2.4.3. Usos terapéuticos y dosis

La oxcarbacepina es un fármaco de primera línea para el tratamiento de las convulsiones parciales (Greiner-Sosanko et. al., 2007) y de neuralgia trigeminal, (Van Belle et. al. 1994), se administra ya sea en monoterapia o politerapia en combinación con otros anticonvulsivantes como lamotrigina, ácido valproico, topiramato y felbamato (Franceschi y Furlanut, 2005). En estado de equilibrio, la farmacocinética del MDH es lineal y proporcional a las dosis entre 300 y 2400 mg/día.

Presentación	Dosis
Tabletas de 300 y 600 mg	Dosis iniciales de 300 mg al día. Posteriormente se aumentan de 600 a 1200 mg al día. Pacientes pediátricos de 10 mg/kg al día hasta 30 mg/kg al día
Suspensión 6 g por cada 100 mL	Dosis que varían de 300 a 1200 mg al día. Pacientes pediátricos de 8-10 mg/kg al día
Grageas de 300 y 600 mg	Inicio de terapia con 600 mg al día dividido en dos tomas. Se consigue un efecto terapéutico adecuado con dosis entre 600 y 2400 mg al día.

Tabla 4. Esquema de dosificación de OXC en el tratamiento de la epilepsia (PLM, 2010).

2.4.4. Reacciones adversas

Las reacciones adversas más comunes son rash, fatiga, dolor de cabeza, mareo, diplopía y ataxia.



2.5 MÉTODOS PARA CUANTIFICAR OXC Y MDH

Se han desarrollado diversos métodos analíticos con detección UV por HPLC para la cuantificación de OXC y/o MDH.

Fortuna y colaboradores en 2010 desarrollaron un método analítico para OXC y su metabolito activo MDH, carbamacepina y acetato de eslicarbacepina, el cual consistió en una extracción en fase sólida, utilizando 500 μL de plasma y como estándar interno 10,11-dihidro-carbamacepina (1mg/mL). Los eluatos se evaporaron a sequedad y se reconstituyeron con 100 μL de fase móvil, se centrifugó y se inyectaron 20 μL al cromatógrafo. El análisis se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 1 mL/min; se utilizó una columna de fase reversa C_{18} de 3 μm , 55 mm x 4 mm a una temperatura de 40°C, con un tiempo de corrida de 9 minutos. La detección se realizó a 235 nm. El método fue lineal en un rango de concentraciones de 0.05-20.0 $\mu\text{g/mL}$ para OXC y de 0.1-60.0 $\mu\text{g/mL}$ para MDH. El límite de cuantificación fue de 0.05 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ para OXC y MDH, respectivamente.

Contin y colaboradores publicaron en 2010, un método analítico para diversos antiepilépticos, entre ellos el metabolito activo de la oxcarbacepina (MDH). El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera: a 250 μL de plasma se le agregó 1 mL de solución de estándar interno (citaprolam, 10 $\mu\text{g/mL}$). Se agitó y se centrifugó 10 minutos. Se inyectaron 5 μL de sobrenadante al cromatógrafo. Se utilizó una columna C_{18} . La fase móvil consistió en una mezcla de buffer de fosfato de potasio monobásico 50 mM pH 5.0, acetonitrilo y metanol (65:26.2:8.8, v/v/v), la velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min. El tiempo de corrida fue de 19 minutos y la detección de los compuestos se realizó a 210 nm.

Greiner-Sosanko y colaboradores en 2007 desarrollaron un método analítico para antiepilépticos, entre ellos OXC y MDH. Utilizaron una extracción líquida en 250 μL de plasma, el estándar interno fue cloranfenicol. La fase orgánica se transfirió a un tubo



cónico y se secó a 40°C. Las muestras se reconstituyeron con 100 µL de fase móvil. Se utilizó una columna C18 de 25 cm x 4.6 mm, 5 µm a 22 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de buffer de fosfato de potasio 30 mM ajustado a pH 3.7 con una solución de ácido fosfórico al 5% y acetonitrilo (65:35, v/v), a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min, con un tiempo de corrida de 10 minutos. OXC y MDH fueron detectados a 230 nm. El método fue lineal en un rango de 1-30 µg/mL para OXC y de 1-40 µg/mL para MDH. El límite de cuantificación fue de 0.75 µg/mL para OXC y 0.5 µg/mL para MDH.

Zakrzewska y Patsalos en 1989 analizaron OXC y MDH mediante el uso de 300 µL de suero, al cual le agregaron 4 µg de metoxicarbamacepina como estándar interno, se basificó la muestra y se agregó diclorometano. Se agitó y se centrifugó, se transfirió la fase orgánica a un tubo de microcentrífuga y se evaporó a sequedad. Se reconstituyó con 15 µL y se inyectaron 10 µL al cromatógrafo. Se utilizó una columna 10 mm RP-8 y como fase móvil acetonitrilo:agua (35:65, v/v) a una velocidad de flujo de 1.8 mL/min con una longitud de onda de 215 nm. El método fue lineal en un rango de concentración de 50-110 µmol/L de MDH en un rango de dosis de 1200-2400 mg de OXC.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Fosfato de sodio monobásico monohidratado grado reactivo ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (J. T. Baker, Philipsburg, EUA).

Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) concentrado grado reactivo (J. T. Baker, Philipsburg, EUA).

Acetonitrilo grado cromatográfico (J. T. Baker, Philipsburg, EUA).

Agua desionizada obtenida a través de un Equipo Milli-Q, (Merck, Darmstadt, Alemania).

3.2. Sustancias de referencia

Oxcarbacepina OXC proporcionada por (Sinbiotik Internacional)
10,11-dihidro-10-hidroxicarbamacepina (TRC, Toronto, Canada)

3.3. Materiales

Tubos de vidrio con tapa rosca (10 mL)

Combitips de 50, 25, 5, 2.5 mL.

Frascos de polipropileno de 30 y 125 mL

Viales de alto recobro

Tubos de vidrio de 13 x 100

Matraces volumétricos de 10, 100 y

1000 mL

3.4. Equipos e instrumentos

Micropipetas de 20-200 μL , 100-1000 μL y

micropipeta repetidora (Eppendorf)

Cromatógrafo de líquidos Alliance 2695
(Waters)

Detector UV-VIS 2487 (Waters)

Evaporador de solventes CALIPER con
corriente de N_2

Ultracongelador REVCO

Centrífuga refrigerada (Sorvall)

Potenciómetro Pinnacle Series M530P

Agitador Vórtex Genie-2

Ultrasonificador BRANSON 1510



3.5. Condiciones cromatográficas

La metodología utilizada para la determinación de la oxcarbacepina y su metabolito MDH, consistió en una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, con detección ultravioleta y se encuentra descrita en la siguiente tabla.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de OXC y MDH por RP-HPLC.

Módulo	Waters Alliance 2695
Detector	Waters Dual UV-VIS 2487
Longitud de onda	235 nm
Columna	X-TERRA Waters RP-8 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m.
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 25 mM pH 3.0 : Acetonitrilo (73.5:26.5 v/v)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	50 μ L
Temperatura de la columna	40°C
Temperatura del automuestreador	5 +/- 2°C
Tiempos de retención	OXC 3.0-4.0 min MDH 5.0 - 4.0 min
Tiempo de corrida	7.0 min

3.6. Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato de sodio 25 mM pH 3.0.

Para preparar esta solución se pesaron 3.45 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), se transfirió a un vaso de precipitados de 1 L, se disolvió con aproximadamente 900 mL de agua grado cromatográfico, se ajustó a pH 3.0 con H_3PO_4 concentrado y/o con NaOH 1 M y se mezcló perfectamente, se transfirió a un matraz aforado de 1 L y se llevó al aforo con agua desionizada y se filtró con membrana de 0.45 μ m.



Fase móvil

La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de solución de fosfato de sodio monobásico monohidrato 25 mM pH 3.0 y acetonitrilo en proporción 73.5:26.5 v/v, la cual se preparó mezclando en un frasco reservorio de 1 L 735 mL solución de fosfato de sodio monobásico monohidrato 25 mM pH 3.0 con 265 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, se agitó vigorosamente, se filtró con membrana de 0.45 μm y se degasificó. Esta solución se utilizó como blanco de reactivos, solución de dilución y de reconstitución.

Solución (A) estándar de oxcarbacepina

Se pesó el equivalente a 10.0 mg de OXC (potencia 99.55%) se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con acetonitrilo grado cromatográfico, una vez disuelto completamente se aforó a dicho volumen con acetonitrilo.

Solución (B) estándar de oxcarbacepina

Esta solución se preparó transfiriendo una alícuota de 10 mL de la solución A de oxcarbacepina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con ayuda de una pipeta volumétrica a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con fase móvil.

Solución (I) estándar de MDH

Se pesó el equivalente a 10.0 mg de MDH (potencia 98%), se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió con acetonitrilo grado cromatográfico, se agitó hasta completa disolución y se aforó a volumen con acetonitrilo.



Solución (II) estándar de MDH

Se transfirió una alícuota de 10 mL de la solución (I) de MDH (200 µg/mL) los cuales se transfirieron con ayuda de una pipeta volumétrica a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con fase móvil.

Solución de adecuabilidad del sistema

Se colocaron en un vial en un vial 400 µL de fase móvil y 100 µL de la solución control medio de 14 µg/mL de oxcarbacepina y 40 µg/mL de MDH y se inyectó por sextuplicado de forma consecutiva al inicio de cada corrida. La concentración final fue de 8 µg/mL de MDH y 2.8 µg/mL de OXC.

3.7. Curvas de calibración y muestras de control de calidad.

A continuación se describe la preparación de las soluciones estándar de OXC y MDH para su determinación simultánea. En la tabla 6 se especifica el volumen de las alícuotas de las soluciones A y B de oxcarbacepina y (I) y (II) de MDH y su concentración final en 10 mL de solución. En la tabla 7, se resume la preparación de la curva de calibración en método para obtener las concentraciones indicadas en dicha tabla en 250 µL de plasma.



Tabla 6. Preparación de las soluciones estándar de OXC y MDH para la curva de calibración, puntos control de calidad y límite de detección

Alícuota de B OXC (10 µg/mL)	Alícuota de A OXC (100 µg/mL)	mL de (2) de MDH (20 µg/mL)	mL de (1) de MDH (200 µg/mL)	Concentración de OXC (µg/mL)	Concentración de MDH (µg/mL)
0.05	-	0.025	-	0.05***	0.05***
0.50	-	0.25	-	0.50**	0.50**
2.00	-	0.75	-	2.00*	1.50*
4.00	-	1.25	-	4.00	2.50
7.5	-	2.50	-	7.50	5.00
-	1.20	-	1.00	12.00	20.00
-	1.40	-	2.00	14.00*	40.00*
-	1.60	-	2.50	16.00	50.00
-	1.80	-	3.00	18.00	60.00
-	2.20	-	4.00	22.00	80.00
-	2.40	-	4.50	24.00*	90.00*
-	2.50	-	5.00	25.00	100.00

*Puntos control de calidad **Límite de cuantificación (LC) ***Límite de detección



Tabla 7. Curvas de calibración y puntos control para método de OXC y MDH.

Concentración de OXC (µg/mL)	Concentración de MDH (µg/mL)	Alícuota de OXC y MDH (µL)	Concentración de OXC (µg/mL) en 250 µL de plasma	Concentración de MDH (µg/mL) en 250 µL de plasma
0.05***	0.05***	50	0.05***	0.05***
0.50**	0.50**	50	0.10**	0.10**
2.0*	1.50*	50	0.40*	0.30*
4.0	2.50	50	0.80	0.50
7.50	5.00	50	1.50	1.00
12.00	20.00	50	2.40	4.00
14.00*	40.00*	50	2.80*	8.00*
16.00	50.00	50	3.20	10.00
18.00	60.00	50	3.60	12.00
22.00	80.00	50	4.40	16.00
24.00*	90.00*	50	4.80*	18.00*
25.00	100.00	50	5.00	20.00

*Puntos de control de calidad ** Límite de cuantificación ***Límite de detección

3.8. Método analítico

3.8.1. Descripción de la muestra biológica

El plasma empleado provino de sujetos sanos, solicitado al banco de sangre del INER y se comprueba con documentos que avalan su bioseguridad. Se evaluó por separado cada unidad empleando en el método de extracción fase móvil en lugar de soluciones estándar de los analitos de interés para comprobar que no existen interferencias principalmente de compuestos endógenos con los analitos que se cuantificarán en sus respectivos tiempos de retención (blanco de matriz biológica). Una vez evaluadas dichas unidades se preparó un “pool” con seis unidades diferentes y se almacenó a temperatura de 2-8°C durante la validación.

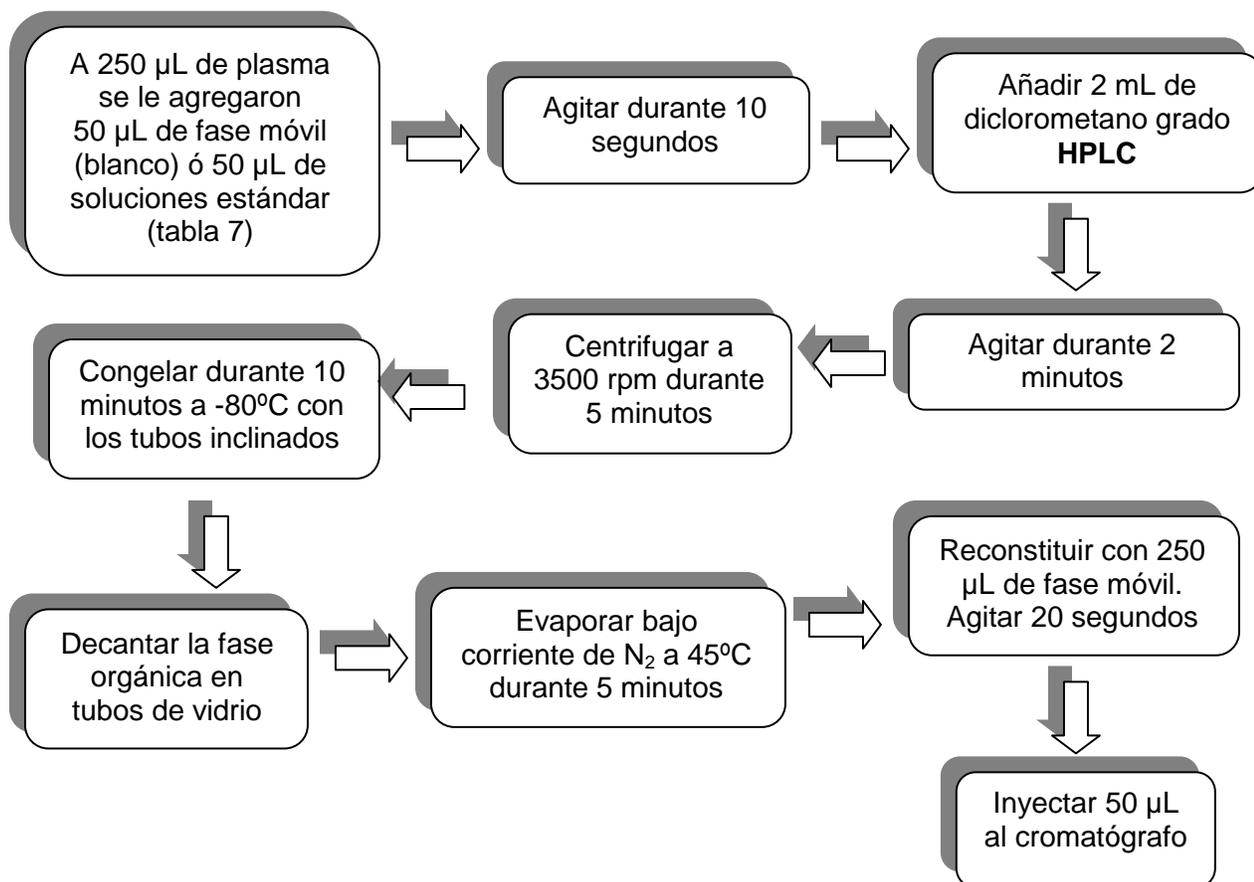


3.8.2. Proceso de extracción

La cuantificación de OXC y MDH, se realizó haciendo uso de las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 5 del apartado 3.5 y el método de extracción líquido-líquido que se describe a continuación. El plasma empleado para la extracción de los analitos fue centrifugado previamente a 3500 rpm durante 5 minutos para clarificarlo.

El blanco de reactivos consistió en la fase móvil, mientras que el blanco de plasma fue preparado con 250 μL de plasma libre de fármaco y se le agregaron 50 μL de fase móvil y se procesó de acuerdo con el diagrama de extracción que se presenta a continuación:

DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN





3.8.3. Integración

El integrador Empower® 1.0 de Waters® se utilizó para graficar la concentración de OXC y MDH (eje de las abscisas) de acuerdo a la respuesta de las áreas (eje de las ordenadas) de dichos analitos y se realizó el ajuste por regresión lineal ($y = mx + b$), donde m es la pendiente de la curva de calibración y b la ordenada al origen, con ponderación $1/y^2$. La concentración experimental recuperada se obtuvo introduciendo la respuesta $1/y^2$ de OXC y MDH en la ecuación de la línea recta generada.

3.9. Validación del método analítico

3.9.1. Selectividad del método

La selectividad del método se evaluó utilizando un pool de plasma (formado con 6 unidades diferentes de este fluido biológico) y en este caso no existió sustancia alguna que interfiriera con la elución de los compuestos de interés para este estudio.

También se utilizó como blanco de matriz biológica plasma hemolizado, lipémico y con heparina (utilizado como anticoagulante en toma de muestra), con el fin de determinar si existían interferencias entre éstos y nuestros compuestos de interés.

Para descartar la interferencia de algunos fármacos comunes como la cafeína y el paracetamol se prepararon soluciones estándar de 1 mg/mL de cada uno (C_{max} cafeína, 50 $\mu\text{g/mL}$ y C_{max} paracetamol 20 $\mu\text{g/mL}$) y se prepararon muestras por duplicado en las cuales el plasma libre de fármaco fue cargado con 50 μL de cada solución estándar y se procesaron de acuerdo con el diagrama de extracción.



3.9.2. Linealidad

La curva de calibración se estableció en función de las concentraciones plasmáticas alcanzadas por el metabolito activo MDH y OXC y el valor de vida de eliminación. El rango de concentraciones utilizado fue de 0.1-20.0 µg/mL para MDH y 0.1-5.0 µg/mL para OXC.

3.9.2.1. Linealidad del sistema

Se corrieron 6 curvas de calibración en solución preparadas con las concentraciones descritas en la tabla 7, colocando 100 µL de las soluciones estándar de MDH y OXC y 400 µL de fase móvil y se inyectaron 50 µL por sextuplicado al cromatógrafo.

3.9.2.2. Linealidad del método

Se corrieron 6 curvas de calibración en método como se indica en la tabla 7 y el diagrama de extracción en un intervalo de concentraciones de 0.1 a 20.0 µg/mL para MDH y de 0.1 a 5.0 µg/mL para OXC. El criterio de aceptación para este parámetro es un coeficiente de correlación r sea mayor a 0.99.

3.9.3. Precisión del método

El criterio de aceptación es que el coeficiente de variación sea menor al 15% en cada uno de los puntos controles.

3.9.3.1. Repetibilidad

Se corrió una curva de calibración en plasma con la cual se cuantificaron los controles de calidad para cada uno de los compuestos. Se utilizaron sextuplicados en método de cada uno de estos puntos (0.3, 8.0 y 18.0 µg/mL para MDH y 0.4, 2.8 y 4.8 µg/mL para OXC) que fueron evaluados por sextuplicado el mismo día, se calculó el promedio,



desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor al 15% respecto al valor teórico.

3.9.3.2. Reproducibilidad

Se preparó una curva de calibración en plasma para cada día, para determinar las concentraciones de los duplicados de controles que se corrieron en tres días diferentes, (puntos control 0.3, 8.0 y 18.0 µg/mL para MDH y 0.4, 2.8 y 4.8 µg/mL para OXC) se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada control evaluado. El criterio de aceptación es un coeficiente de variación no mayor al $\pm 15\%$.

3.9.4. Exactitud del método

Se obtuvo con el valor promedio de las determinaciones de cada nivel de concentración de los puntos control de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad mencionadas anteriormente y para que esos valores sean aceptados la variación debe ser menor de $\pm 15\%$ del valor nominal de la concentración.

3.9.5. Recobro

Se analizaron por sextuplicado los puntos control en los tres diferentes niveles de concentración (0.3, 8.0 y 18.0 µg/mL para MDH y 0.4, 2.8 y 4.8 µg/mL para OXC) y se compararon con la respuesta en solución de dichos analitos en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El criterio de aceptación para dicha prueba es obtener un método de extracción reproducible y que el porcentaje de analito extraído sea consistente entre cada nivel de concentración aunque la recuperación no sea del 100%.

3.9.6. Límite de cuantificación

En el caso del presente estudio para ambos compuestos fue el punto más bajo de la curva de calibración (0.1 µg/mL, para ambos analitos) y éste fue analizado por sextuplicado el mismo día. Se considera que para obtener un valor aceptable del límite



de cuantificación la variación debe estar dentro del $\pm 20\%$ y presentar una respuesta mínima 10 veces mayor con respecto a la señal ruido.

3.9.7. Límite de detección

Se prepararon por sextuplicado muestras con concentración final de $0.05 \mu\text{g/mL}$ para ambos compuestos (tabla 7) la cual quedó como la cantidad mínima detectada y la señal obtenida deber ser al menos 3 veces mayor respecto a la señal ruido.

3.9.8. Estabilidad

El criterio general para las estabildades es que el porcentaje de desviación con respecto a la concentración teórica no debe superar el $\pm 15\%$.

3.9.8.1 Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación

La prueba consistió en congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida de los compuestos en la matriz biológica, esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se evaluaron tres ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras con un espacio de una hora en cada cambio de temperatura, con muestras control por triplicado y comparándolas con controles preparados el mismo día de análisis.

3.9.8.2 Estabilidad a temperatura ambiente

Se prepararon muestras control por triplicado para evaluar la estabilidad a temperatura ambiente de MDH y OXC en un tiempo que se considere suficiente para el manejo de un número grande de muestras, colocando en los tubos redondos de tapa de rosca, $250 \mu\text{L}$ de plasma, $50 \mu\text{L}$ de las soluciones correspondientes a los puntos control de MDH y OXC (ver tabla 7) y dejar reposar durante 5 horas sobre la mesa de trabajo y continuar con lo descrito por el diagrama de extracción una vez transcurrido dicho tiempo y se comparó la respuesta con controles preparados el mismo día de análisis.



3.9.8.3 Estabilidad en refrigeración

Se prepararon muestras control por triplicado para evaluar la estabilidad en refrigeración (2-4 °C) de MDH y OXC durante un lapso de 24 horas, colocando en los tubos redondos de tapa de rosca, 250 µL de plasma, 50 µL de las soluciones correspondientes a los puntos control de MDH y OXC (tabla 7) y se dejaron reposar durante 24 horas en el refrigerador y continuar con lo descrito por el diagrama de extracción una vez transcurrido dicho tiempo y se comparó la relación de áreas con controles preparados en el día de análisis.

3.9.8.4 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon cinco series de muestras control por triplicado para evaluar la estabilidad a largo plazo bajo congelación (-80 ± 5 °C) de MDH y OXC durante un lapso de 70 días, colocando en los tubos redondos de tapa de rosca, 250 µL de plasma, 50 µL de las soluciones correspondientes a los puntos control de MDH y OXC (tabla 7), tapar y reposar durante los días establecidos en el ultracongelador y continuar con la extracción una vez transcurrido dicho tiempo y se comparó la respuesta con controles preparados el mismo día de análisis.

3.9.8.5 Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon muestras control por triplicado para evaluar la estabilidad de muestra procesada (almacenada en el automuestreador del cromatógrafo a 5 ± 3 °C en un lapso de 24 horas) de MDH y OXC tal como lo indica el diagrama de extracción y una vez reconstituidas dichas muestras control, se inyectaron como controles de un día de corrida ordinario y se conservaron en el automuestreador y se reinyectaron al día siguiente junto con muestras control preparadas en el día de análisis y de esta manera se comparó la respuesta de ambas series de controles.



3.9.8.6 Estabilidad en solución

Se prepararon muestras control por triplicado a los tres niveles de concentración en solución de MDH y OXC para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar en congelación de -20 ± 5 °C en un periodo de 18 días (0.3, 8.0 y 18.0 $\mu\text{g/mL}$ para MDH y 0.4, 2.8 y 4.8 $\mu\text{g/mL}$ para OXC) y se comparó con la respuesta (áreas) obtenidas con muestras control en solución recién preparadas.

3.9.9 Efecto de la dilución

Se prepararon muestras control de MDH y OXC por triplicado con el fin de obtener concentraciones superiores a las de los puntos más altos de las curvas de calibración (20.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y así poder cuantificar de forma repetible y reproducible concentraciones de hasta 6.0 $\mu\text{g/mL}$ para OXC y 30.0 $\mu\text{g/mL}$ para MDH. Se colocaron en un tubo de vidrio con tapa de rosca 540 μL de la solución estándar de MDH 100 $\mu\text{g/mL}$ y OXC 25 $\mu\text{g/mL}$ y se añadieron 460 μL de plasma libre de fármaco para completar 1 mL y se mezcló durante unos segundos. Posteriormente, se dosificaron en tres tubos de vidrio con fondo redondo 125 μL de la mezcla anterior y se añadieron 125 μL de plasma libre de fármaco y se procedió con la extracción descrita en el diagrama. El criterio de aceptación es que las concentraciones obtenidas no sean mayores al $\pm 15\%$ de desviación con respecto a las concentraciones teóricas.

3.9.10 Tolerancia

En este caso se cambió la proporción de fase móvil a $\pm 2.0\%$ con respecto a la cantidad de solvente añadido directamente en el equipo cromatográfico y se compararon ambos cambios de solventes con respecto a las condiciones de trabajo establecidas de forma normal.



3.10 Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Para propósitos de monitoreo terapéutico, oxcarbacepina es considerada un profármaco, y la cuantificación se enfoca en el metabolito MDH como el principal mediador del efecto anticonvulsivante (Krasowski et. al. 2010), ya que se encuentran concentraciones muy bajas tanto de OXC y DHD en sangre periférica.

Se emplearon muestras de 6 voluntarios sanos, a los cuales se les proporcionó una dosis de 300 mg de oxcarbacepina en suspensión en la mañana y se tomaron muestras de sangre en tubos con heparina a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0, 12, 24 y 48 horas después de la administración del fármaco. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos para la separación del plasma y se almacenaron a -80 ± 5 °C hasta su análisis.



4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Validación del método analítico

4.1.1 Selectividad del método

En la figura 9 se presentan los cromatogramas de MDH y OXC en solución y después de realizar su extracción a partir del plasma, se observó que la matriz biológica y el blanco de reactivos no presentaron picos que interfirieran en los tiempos de retención de los analitos de interés.

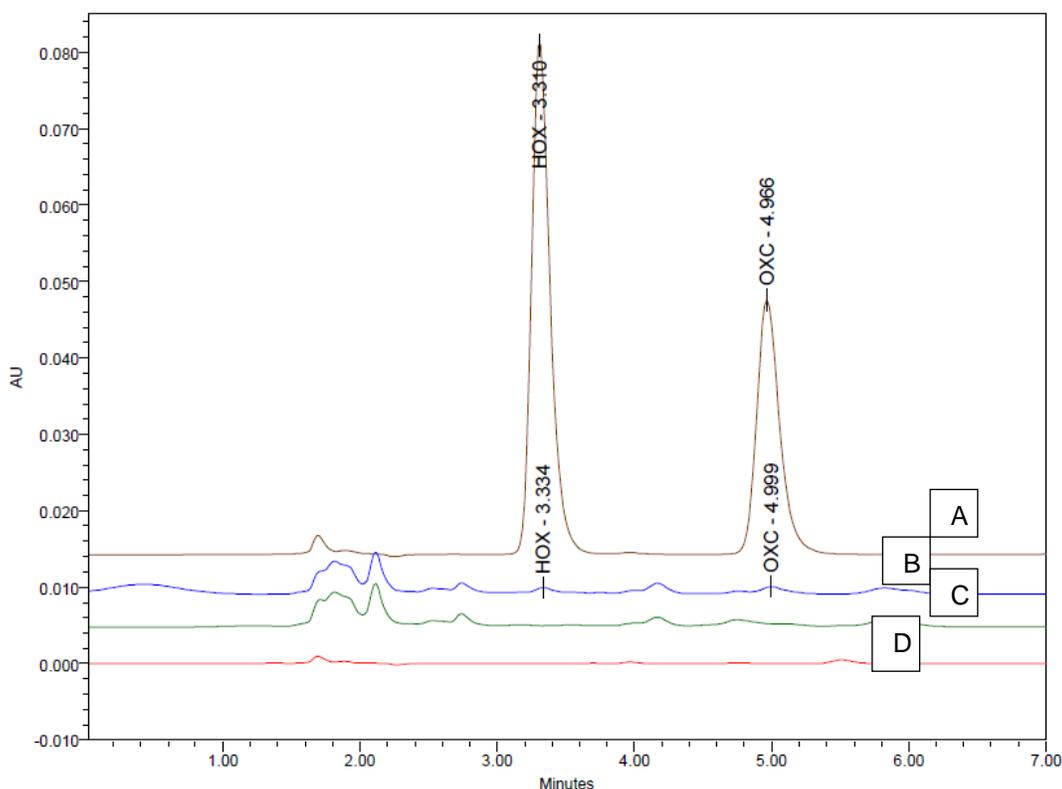


Figura 8. Cromatogramas representativos de OXC y MDH. A) OXC 2.8 $\mu\text{g/mL}$ y MDH 8.0 $\mu\text{g/mL}$, B) Límite de cuantificación OXC y MDH 0.1 $\mu\text{g/mL}$, C) Blanco de plasma, D) Blanco de reactivos.

También se evaluó la posible interferencia de compuestos endógenos como hemoglobina y lípidos; anticoagulante (heparina) y fármacos como el paracetamol y la cafeína los cromatogramas aparecen en la figura 9, en la que se tiene un comparativo con el límite de cuantificación de MDH y OXC.

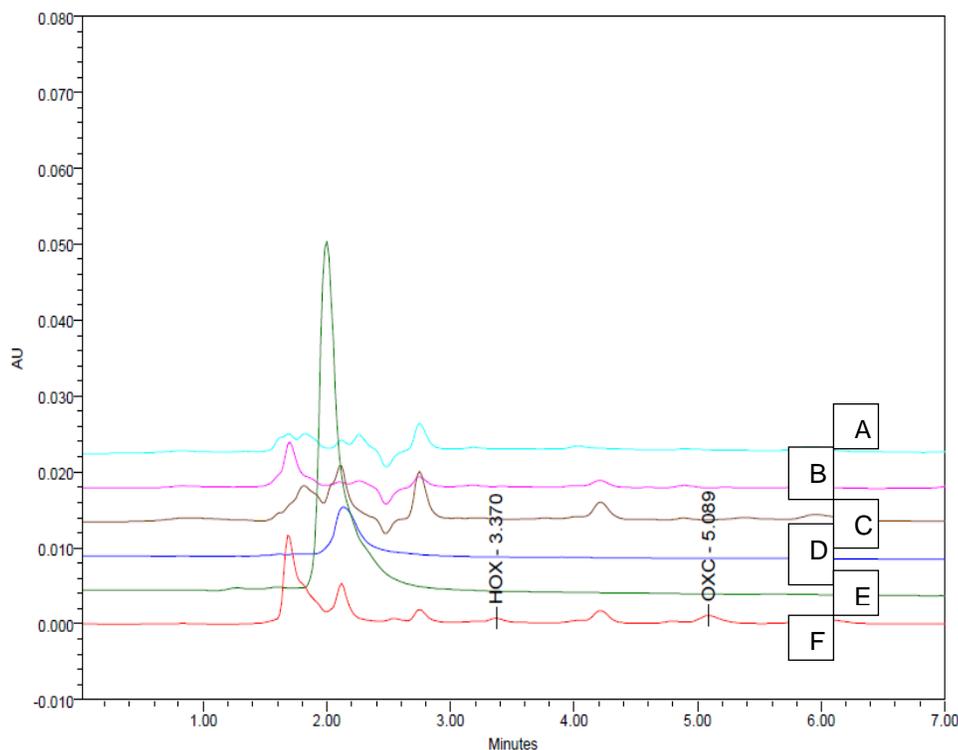


Figura 9. Cromatogramas representativos de muestras plasmáticas después de su procesamiento por extracción líquido-líquido. A) Blanco de plasma hemolizado, B) Blanco de plasma lipémico, C) Blanco de plasma con heparina, D) Plasma cargado con paracetamol, E) Plasma cargado con cafeína, F) Límite de cuantificación OXC y MDH 0.1 µg/mL.

4.1.2 Linealidad

4.1.2.1 Linealidad del sistema

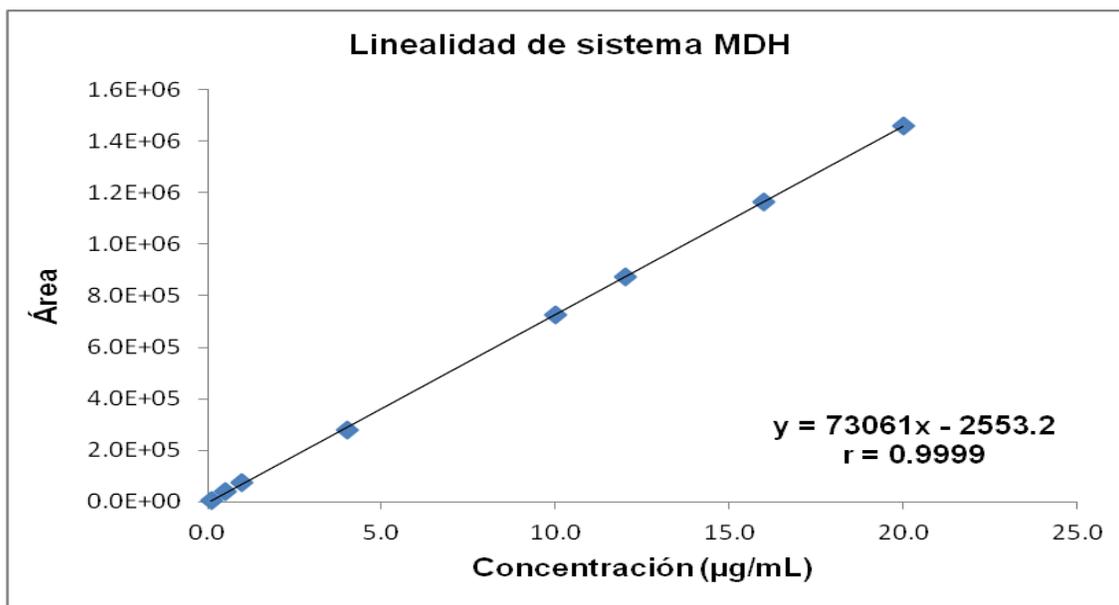
En la tabla 8 se muestran los valores promedio de área de MDH obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración en sistema, se calculó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (C. V., %) y el error estándar de cada nivel de concentración. La gráfica 1 muestra los valores promedio de área contra la concentración teórica y el comportamiento fue lineal en un rango de 0.10 a 20.0 µg/mL con un valor de r de 0.9999, la ecuación que describe a la recta es $y = 73061x - 2553.2$.



Tabla 8. Linealidad del sistema de MDH. Valores promedio de áreas de los picos obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración en solución.

Concentración teórica MDH (µg/mL)	Promedio de áreas de curvas de calibración MDH	Desviación estándar	C.V. (%)	Error Estándar
0.10	6129.585	926.806	15.120	378.367
0.50	38674.213	293.192	0.758	119.695
1.00	73422.969	977.344	1.331	398.999
4.00	279376.411	3007.876	1.077	1227.960
10.00	727331.374	4849.038	0.667	1979.611
12.00	874004.765	13334.844	1.526	5443.927
16.00	1166286.129	15377.648	1.319	6277.898
20.00	1461055.591	20836.547	1.426	8506.485

Para cada nivel de concentración se presentan los valores de desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar.



Gráfica 1. Curva de calibración en sistema para la determinación de MDH

En la tabla 9 se observan los valores de concentración promedio calculados a partir de la interpolación de los valores de área obtenidos de MDH con respecto a la concentración teórica de 6 curvas de calibración en sistema, los valores promedio de la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de

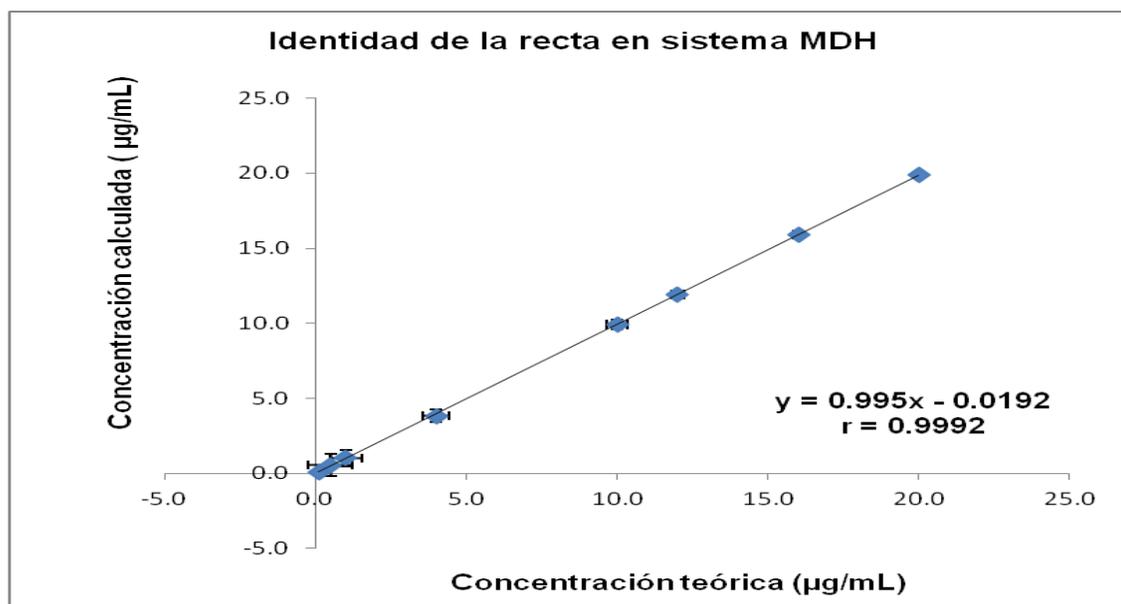


correlación (r) de cada curva, se calculó la desviación estándar, C. V. (%) y el error estándar de cada nivel de concentración; se graficó el promedio de la concentración calculada contra la concentración teórica (gráfica 2), y se obtuvo la identidad de la recta, con una pendiente de 0.9950, ordenada al origen de -0.0192 y un valor de r de 0.9992.

Tabla 9. Identidad de la recta de MDH en sistema.

Concentración teórica MDH ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio concentración calculada de MDH ($\mu\text{g/mL}$)*	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	0.099	0.000	0.000	0.000
0.50	0.542	0.010	1.789	0.730
1.00	1.015	0.013	1.306	0.533
4.00	3.820	0.040	1.047	0.428
10.00	9.922	0.080	0.807	0.329
12.00	11.918	0.059	0.499	0.204
16.00	15.898	0.067	0.422	0.172
20.00	19.913	0.056	0.283	0.116
m	73432.611			
b	-1139.683			
r	0.9992			
r²	0.9984			

*Valores promedio de la concentración calculada de MDH a partir del sextuplicado de curvas de calibración utilizadas para la evaluación de la linealidad del sistema.



Gráfica 2. Identidad de la recta en sistema de MDH obtenido a partir de las concentraciones calculadas promedio contra la concentración teórica.

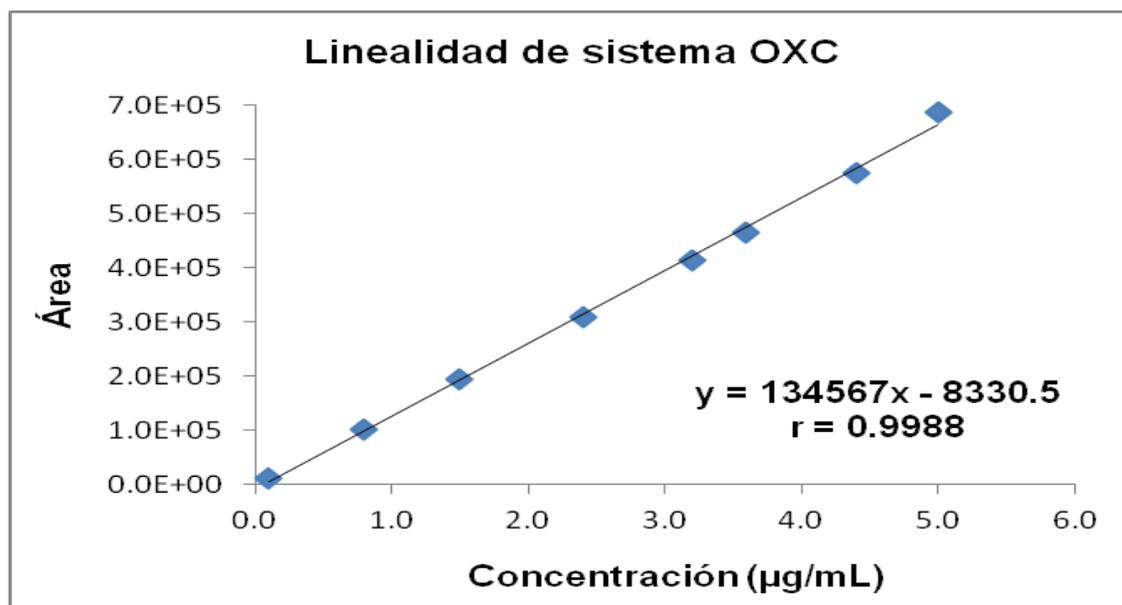
En la tabla 10 se describen los valores de área promedio de OXC obtenidos a partir de seis curvas de calibración en sistema, se calculó la desviación estándar, C. V. (%) y el error estándar de cada nivel de concentración. La gráfica 3 muestra el área promedio de contra la concentración teórica de OXC, el comportamiento fue lineal en un rango de concentración de 0.10 a 5.0 µg/mL, la ecuación de la recta fue de $y = 134567x - 8830.5$ con un valor de r de 0.9988.



Tabla 10. Linealidad de sistema de OXC. Valores promedio de áreas de los picos obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración en sistema.

Concentración OXC (µg/mL)	Promedio de áreas de curvas de calibración OXC	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	12468.088	133.092	1.067	54.334
0.80	102277.637	425.791	0.416	173.828
1.50	193209.785	826.990	0.428	337.617
2.40	309651.947	4488.589	1.450	1832.459
3.20	414289.601	2478.137	0.598	1011.695
3.60	465989.904	8337.945	1.789	3403.952
4.40	574099.125	7599.616	1.324	3102.530
5.00	687274.665	11306.330	1.645	4615.790

Para cada nivel de concentración se presentan los valores de desviación estándar, coeficiente de variación, y error estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración en sistema para la determinación de OXC.

En la tabla 11 se registraron los datos de concentración promedio calculados a partir de la interpolación de las áreas con respecto a la concentración teórica de OXC, los

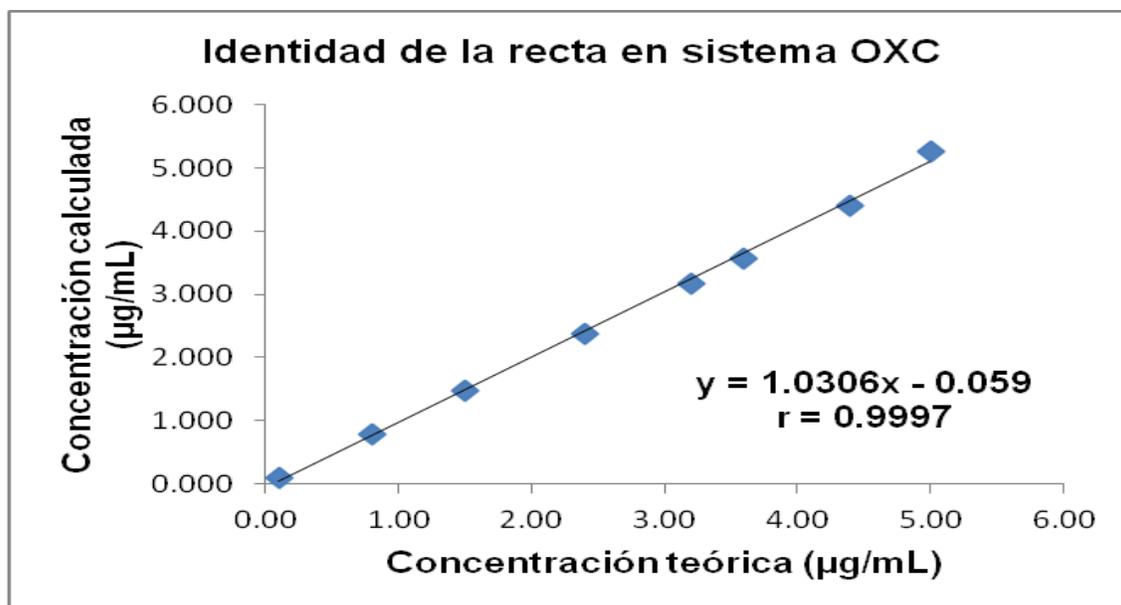


valores promedio de la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de correlación (r); se calculó, la desviación estándar, C. V. (%) y el error estándar, se graficó el promedio de las concentraciones calculadas contra la concentración teórica para obtener la identidad de la recta en sistema de OXC de lo cual se obtuvo una pendiente de 1.0306, una ordenada al origen de -0.059 y un valor de r de 0.9997 (gráfica 4).

Tabla 11. Identidad de la recta de OXC en sistema.

Concentración teórica OXC ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio concentración calculada de OXC ($\mu\text{g/mL}$)*	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	0.100	0.000	0.000	0.000
0.80	0.788	0.010	1.234	0.004
1.50	1.485	0.010	0.680	0.004
2.40	2.376	0.013	0.541	0.005
3.20	3.178	0.013	0.411	0.005
3.60	3.574	0.030	0.843	0.012
4.40	4.402	0.019	0.421	0.008
5.00	5.268	0.035	0.665	0.014
m	130566.703			
b	-618.805			
r	0.9997			
r²	0.9995			

*Valores promedio de la concentración calculada de OXC a partir del sextuplicado de curvas de calibración utilizadas para la evaluación de linealidad de sistema.



Gráfica 4. Identidad de la recta en sistema de OXC obtenido a partir de las concentraciones calculadas promedio contra la concentración teórica

4.1.2.2 Linealidad del método

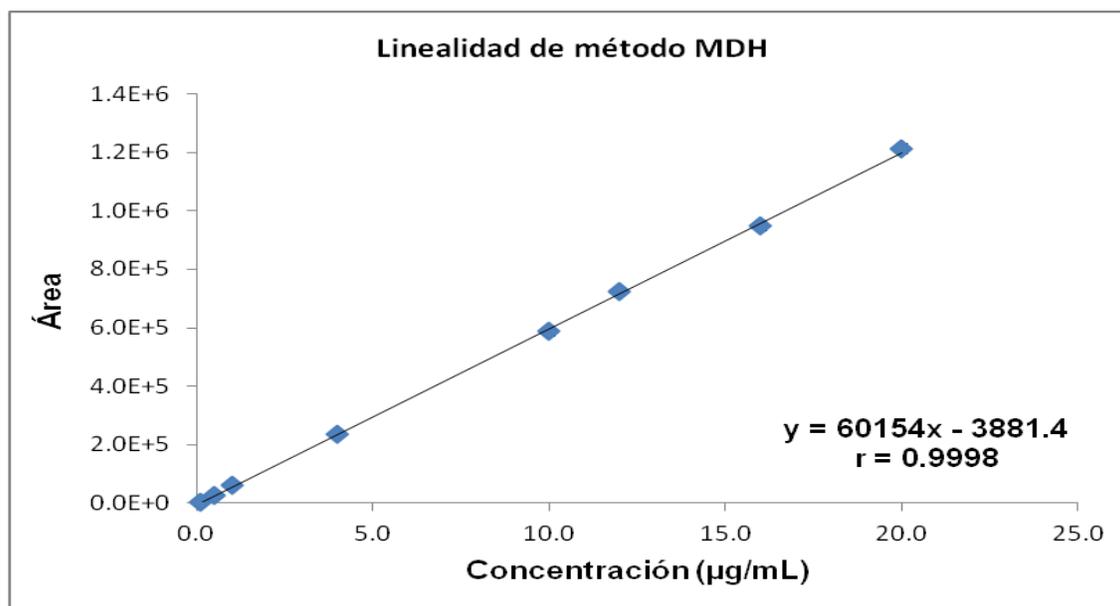
En la tabla 12 se muestran los valores promedio de área de MDH obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración en método, se calculó el promedio, la desviación estándar, C. V. (%) y el error estándar de cada nivel de concentración. Se graficaron los valores promedio de área contra la concentración teórica y se observó un comportamiento lineal en el rango de concentración de 0.10 a 20.0 µg/mL, el valor de r fue de 0.9998, la ecuación que describe a la recta es $y = 60154x - 3881.4$ (gráfica 5)



Tabla 12. Linealidad del método de MDH. Valores promedio de áreas de los picos de MDH obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración.

Concentración de MDH (µg/mL)	Promedio de áreas curvas de calibración MDH	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	4011.661	607.358	15.140	247.953
0.50	26361.488	1969.434	7.471	804.018
1.00	60127.102	2905.396	4.832	1186.123
4.00	236593.546	5832.831	2.465	2381.243
10.00	586817.721	32804.061	5.590	13392.202
12.00	723275.656	20786.553	2.874	8486.075
16.00	947143.806	37524.145	3.962	15319.168
20.00	1210392.237	36989.651	3.056	15100.962

Para cada nivel de concentración se presentan los valores de desviación estándar, coeficiente de variación, y error estándar.



Gráfica 5. Curva de calibración en método para la determinación de MDH.

En la tabla 13 se registraron los datos de concentración promedio calculados a partir de la interpolación de las áreas con respecto a la concentración teórica de MDH, así como los valores promedio de la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de

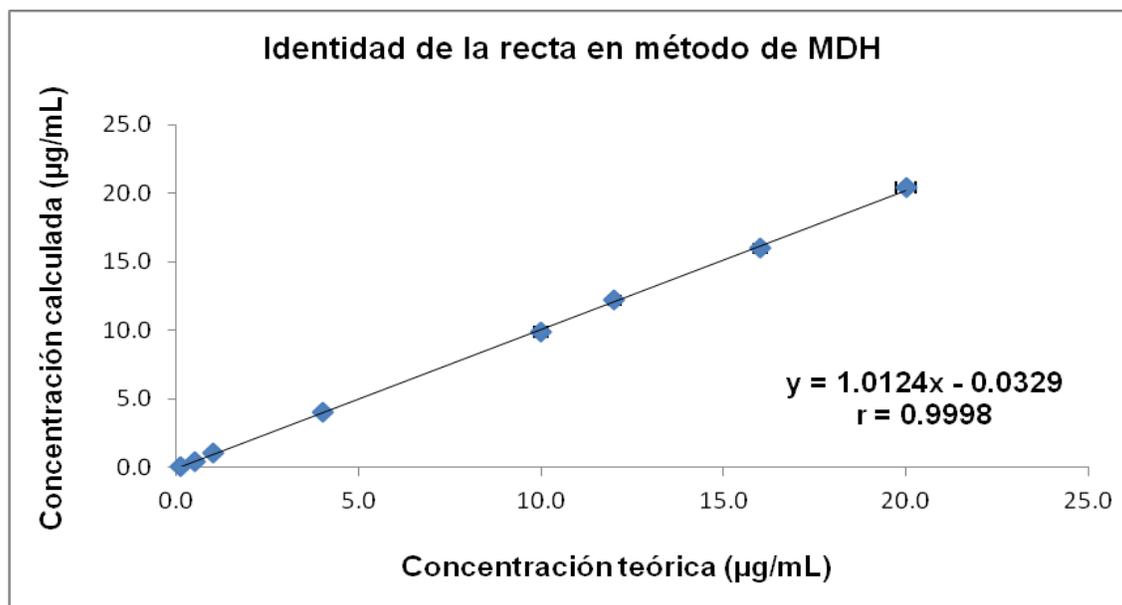


determinación (r^2) y coeficiente de correlación (r); se obtuvo la desviación estándar, C.V. (%) y el error estándar de cada nivel de concentración, se graficó el promedio de las concentraciones calculadas contra la concentración teórica (gráfica 6) con la que se obtuvo la identidad de la recta en sistema de MDH con una pendiente de 1.0124, ordenada al origen de -0.0329 y un valor de r de 0.9998.

Tabla 13. Identidad de la recta de MDH en método.

Concentración teórica MDH ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio concentración calculada de MDH ($\mu\text{g/mL}$)*	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	0.100	0.001	0.515	0.000
0.50	0.476	0.029	6.056	0.012
1.00	1.045	0.057	5.450	0.023
4.00	4.014	0.040	0.986	0.016
10.00	9.904	0.434	4.379	0.177
12.00	12.208	0.392	3.207	0.160
16.00	15.969	0.423	2.650	0.173
20.00	20.406	0.649	3.181	0.265
m	59430.723			
b	-1960.257			
R	0.9998			
r^2	0.9997			

*Valores promedio de la concentración calculada de MDH a partir del sextuplicado de curvas de calibración en plasma.



Gráfica 6. Identidad de la recta en sistema de MDH obtenido a partir de las concentraciones calculadas promedio contra la concentración teórica

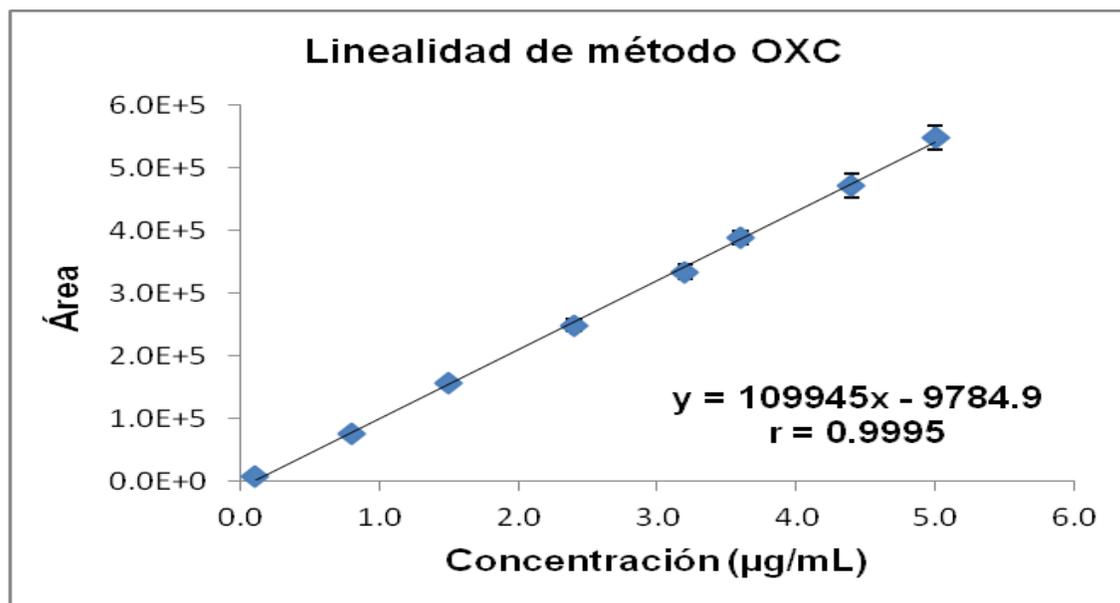
En la tabla 14 aparecen los valores de área promedio de OXC obtenidos a partir de las seis curvas de calibración en método, se calculó la desviación estándar, C.V. (%) y el error estándar de cada nivel de concentración. Se graficó el área promedio de contra la concentración teórica, el comportamiento fue lineal en un rango de concentración de 0.10 a 5 µg/mL, la ecuación de la recta $y = 109945x - 9784.9$ y el valor de r de 0.9995 (gráfica 7).



Tabla 14. Linealidad del método de OXC en método. Valores promedio de áreas de los picos obtenidos del sextuplicado de curvas de calibración.

Concentración de OXC (µg/mL)	Promedio de áreas curvas de calibración OXC	Desviación Estándar	C.V. (%)	Error Estándar
0.10	7603.697	1350.760	17.765	551.446
0.80	74951.793	6533.016	8.716	2667.093
1.50	157507.985	11122.709	7.062	4540.827
2.40	249242.010	22040.206	8.843	8997.876
3.20	333497.923	28494.726	8.544	11632.923
3.60	388689.390	25492.349	6.559	10407.208
4.40	470793.088	46338.486	9.843	18917.608
5.00	548277.218	48836.819	8.907	19937.548

Para cada nivel de concentración se presentan los valores de desviación estándar, coeficiente de variación, y error estándar.



Gráfica 7. Curva de calibración en método para la determinación de OXC.

En la tabla 15 se registraron los datos de concentración promedio calculados a partir de la interpolación de las áreas con respecto a la concentración teórica de OXC, así como los valores promedio de la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de correlación (r), a partir los datos de concentración se

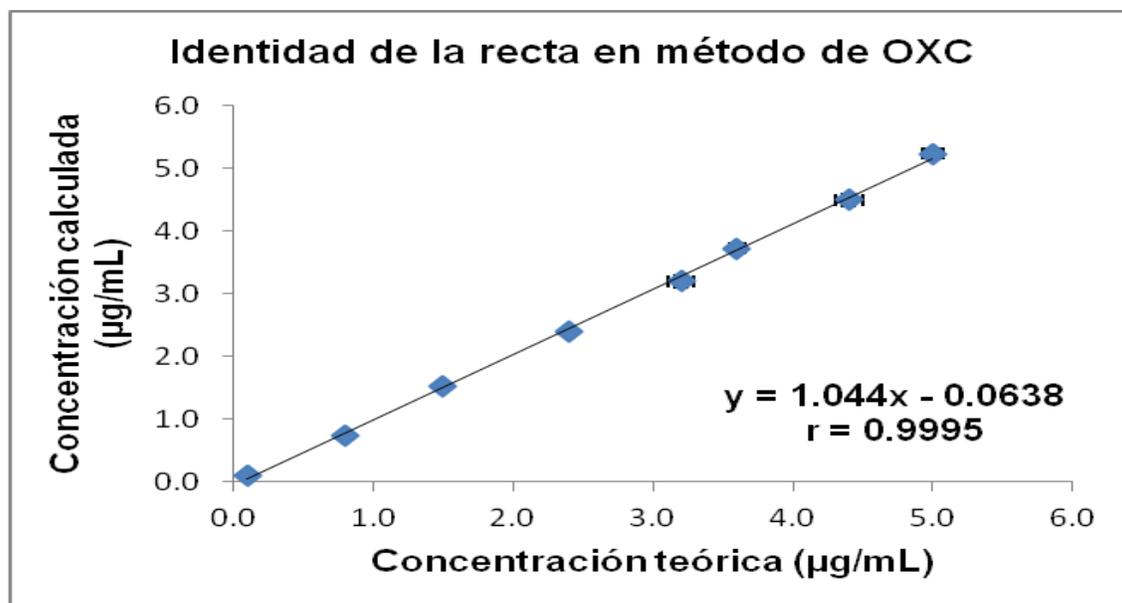


calculó el promedio, la desviación estándar, C.V. (%) y error estándar, se graficó el promedio de las concentraciones calculadas contra la concentración teórica para obtener la identidad de la recta en sistema de oxcarbacepina de lo cual se obtuvo una pendiente de 1.0440, ordenada al origen de -0.0638 y un valor de r de 0.9995 (gráfica 8).

Tabla 15. Identidad de la recta de OXC en método.

Concentración teórica OXC (µg/mL)	Promedio concentración calculada (µg/mL)*	Desviación Estándar	C. V. (%)	Error Estándar
0.10	0.101	0.001	0.545	0.000
0.80	0.741	0.040	5.427	0.016
1.50	1.525	0.045	2.919	0.018
2.40	2.394	0.066	2.761	0.027
3.20	3.200	0.224	7.004	0.091
3.60	3.724	0.135	3.632	0.055
4.40	4.497	0.232	5.156	0.095
5.00	5.233	0.180	3.443	0.074
m	105272.409			
b	-2980.190			
r	0.9995			
r²	0.9991			

*Valores promedio de la concentración calculada de OXC a partir del sextuplicado de curvas de calibración en plasma.



Gráfica 8. Identidad de la recta en sistema de OXC obtenido a partir de las concentraciones calculadas promedio contra la concentración teórica



4.1.3 Precisión del método

4.1.3.1 Repetibilidad

En la tabla 16 muestran los resultados de repetibilidad del método, se obtuvieron coeficientes de variación menores al 15% respecto al valor nominal tanto para MDH y OXC en sus tres niveles de concentración correspondientes.

Tabla 16. Repetibilidad del método a partir de 6 determinaciones preparadas el mismo día.

Concentración Nominal MDH ($\mu\text{g/mL}$)	0.300	8.000	18.000
Promedio	0.276	8.345	18.066
Desviación Estándar	0.018	0.103	0.431
C.V. (%)	6.671	1.238	2.388
Desviación Absoluta (%)	-8.000	4.312	0.366
Concentración Nominal OXC ($\mu\text{g/mL}$)	0.400	2.800	4.800
Promedio	0.389	2.766	4.819
Desviación Estándar	0.013	0.186	0.196
C.V. (%)	3.278	6.719	4.070
Desviación Absoluta (%)	-2.750	-1.214	0.396



4.1.3.2 Reproducibilidad

La precisión del método interdía arrojó como resultados que el método es reproducible, debido a que se obtuvieron coeficientes de variación menores al 15% respecto al valor nominal para MDH y OXC en sus tres niveles de concentración (tabla 17).

Tabla 17. Reproducibilidad del método a partir de duplicados de controles analizados en tres días diferentes.

Concentración Nominal MDH ($\mu\text{g/mL}$)	0.300	8.000	18.000
Promedio	0.306	8.067	17.919
Desviación Estándar	0.027	0.396	0.735
C.V. (%)	8.867	4.905	4.100
Desviación Absoluta (%)	2.000	0.837	-0.450
Concentración Nominal OXC ($\mu\text{g/mL}$)	0.400	2.800	4.800
Promedio	0.389	2.973	5.032
Desviación Estándar	0.029	0.247	0.388
C.V. (%)	7.523	8.302	7.701
Desviación Absoluta (%)	-2.750	6.178	4.833

4.1.4 Exactitud del método

De acuerdo con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad (precisión intradía e interdía), el método es exacto debido a que se obtuvieron desviaciones absolutas menores al 15% respecto al valor nominal con ambos analitos en sus respectivos niveles de concentración (tablas 16 y 17).

4.1.5 Recobro

En la tabla 18, se aprecia el comparativo entre el promedio de las determinaciones de puntos control en método con las concentraciones promedio en sistema, éstas últimas



se consideraron como 100% y se calculó el porcentaje al que corresponden las respuestas promedio de la extracción en plasma. El recobro promedio para el caso de MDH fue de 79.96% y para OXC fue de 83.20% con desviaciones absolutas menores al 15% respecto al valor de la media en los tres niveles de concentración.

Tabla 18. Recobro del método.

Concentración Nominal MDH ($\mu\text{g/mL}$)	Área promedio sistema	Área promedio plasma	Recobro (%)	Desviación absoluta (%)*
0.300	22260.333	15264.600	68.573	-14.241
8.000	579682.000	497120.167	85.757	7.250
18.000	1260100.500	1078026.167	85.551	6.991
Recobro global (%)			79.960	
Concentración Nominal OXC ($\mu\text{g/mL}$)	Área promedio sistema	Área promedio plasma	Recobro (%)	Desviación absoluta (%)*
0.400	51513.667	39027.800	75.762	-8.943
2.800	349074.500	299823.833	85.891	3.231
4.800	596945.333	525047.667	87.956	5.712
Recobro global (%)			83.203	

*Los resultados se expresan como el promedio de 6 determinaciones de cada uno de los puntos control tanto para método como para sistema.

4.1.6 Límite de cuantificación

En la tabla 19, aparecen los valores promedio de las concentraciones calculadas de 6 determinaciones independientes de MDH y OXC, en ambos casos se cumplió con exactitud y precisión, ya que los valores de desviación absoluta son menores al 20%.



Tabla 19. Límite de cuantificación de MDH y OXC.

Concentración 0.1 µg/ml	Promedio*	D.E.	C.V.	Desv. Absol.	Área Promedio	Ruido	Señal (área)/Ruido
MDH	0.102	0.010	9.893	2.00	3552.83	37.00	96.02
OXC	0,109	0,007	6,150	9.00	4441.50	493.00	9.00

*Resultados obtenidos a partir de 6 determinaciones independientes en método.

4.1.7 Límite de detección

En la tabla 20 se describen los valores promedio de las concentraciones calculadas de MDH y OXC a partir de 6 determinaciones para el límite de detección; en el caso de MDH, los picos de dicho analito presentaron una señal 13.84 veces mayor con respecto al ruido (en blanco de plasma). Cabe señalar que en el caso de OXC, los picos se distinguieron de la señal ruido, con una relación de 1.690 veces mayor a este último, y las concentraciones promedio tuvieron mayor variación, lo que se puede observar en el resultado del porcentaje de desviación absoluta que es mayor al 15% respecto al valor teórico, por lo cual OXC no pudo ser cuantificado de manera exacta pero sí precisa. Esto se obtuvo en la determinación del límite de detección (el cual es solo informativo) pero para el límite de cuantificación se obtuvieron valores adecuados.

Tabla 20. Límite de detección de MDH y OXC.

Concentración 0.05 µg/ml	Promedio*	D.E.	C.V.	Desv. Absol.	Área Promedio	Ruido	Señal (Área)/Ruido
MDH	0.049	0.001	2.378	-2.000	512.167	37.000	13.842
OXC	0.067	0.001	0.824	34.000	118.333	70.000	1.690

*Resultados obtenidos a partir de 6 determinaciones independientes en método.

En la figura 11 aparecen dos cromatogramas, (A), que representan el límite de detección de MDH y OXC comparado con un blanco de plasma (B), se observaron picos que se distinguen de la señal ruido.

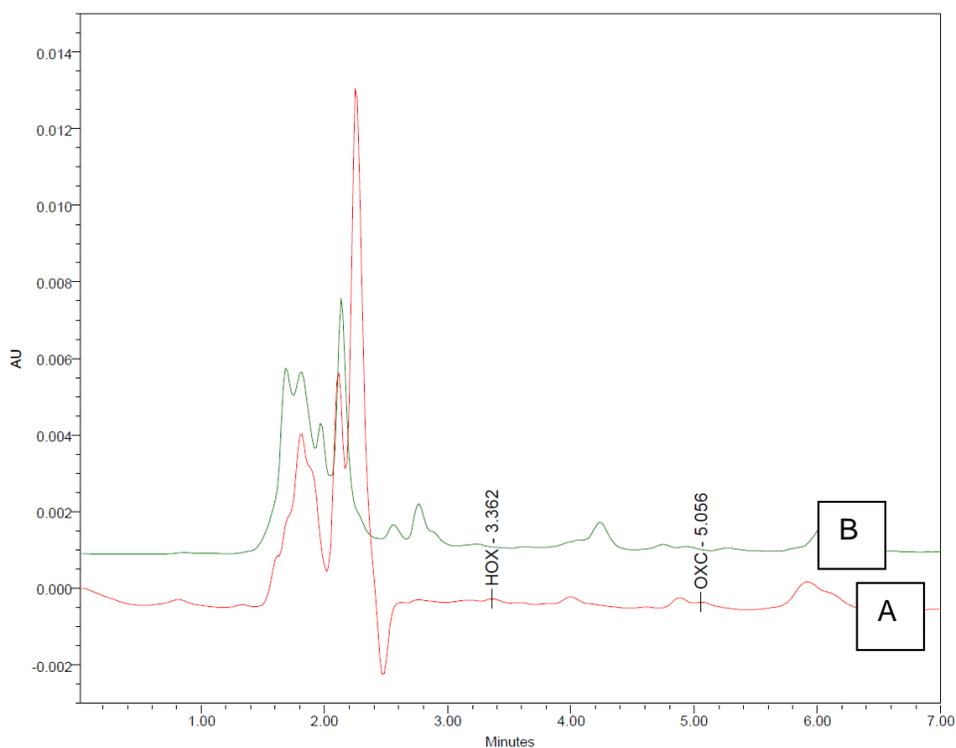


Figura 10. Cromatogramas representativos del límite de detección de OXC y MDH 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (A) comparado con un blanco de plasma (B).

4.1.8 Estabilidad

Las pruebas realizadas a MDH y OXC arrojaron como resultados que ambos analitos fueron estables en muestras plasmáticas a largo plazo durante 70 días almacenadas a -80 ± 5 °C, como muestra procesada almacenada en el automuestreador durante 24 horas a 5°C y en las soluciones estándar almacenadas en congelador (-20 ± 5 °C) durante 19 días, en las pruebas antes mencionadas, los coeficientes de variación y los porcentajes de desviación absoluta fueron menores al $\pm 15\%$ comparados con controles preparados el mismo día de análisis.

En el caso de la prueba de estabilidad de ciclos de congelación-descongelación y refrigeración, MDH obtuvo C.V. (%) y porcentajes de desviación absoluta menores al $\pm 15\%$ respecto a controles frescos, sin embargo OXC no soportó estas condiciones.



En la prueba de estabilidad a temperatura ambiente durante 5 horas, MDH obtuvo C.V. menores al $\pm 15\%$, sin embargo el porcentaje de desviación absoluta comparado con puntos control frescos fue mayor al 15%, mientras que en el caso de OXC tanto su C.V. y porcentajes de desviación absoluta fueron mayores al $\pm 15\%$, por lo tanto ambos analitos no fueron estables bajo estas condiciones.

Cabe señalar que estas pruebas son de tipo informativo y su utilidad implica que, al llevar a cabo una validación de método analítico de forma previa, los resultados arrojados especialmente en este rubro proporciona la pauta para manejar de forma estratégica las muestras provenientes de estudios de farmacocinética, bioequivalencia y/o monitoreo terapéutico. Dado que las muestras no fueron estables en ciclos de congelación-descongelación, se deben almacenar duplicados de muestras de forma que un “juego” de muestras se almacene permanente en congelación a $-80 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ y el otro sea el sometido a análisis y revisiones de registros, tomando en cuenta que no se deben descongelar en más de tres ocasiones. Para el caso del cuidado de la integridad de las muestras sometidas a temperatura ambiente, se deben programar un número determinado de muestras por analizar y su retiro del lugar de almacenamiento por partes, de tal manera que no queden más de 5 horas en estas condiciones y su procesamiento se lleve a cabo rápidamente.

En el caso de la estabilidad en refrigeración, se debe tomar en cuenta que las muestras plasmáticas no deben ser almacenadas de forma permanente hasta su análisis en dicho equipo, y si se va a analizar, preferentemente no deben pasar más de 24 horas bajo estas condiciones.

4.1.9 Efecto de la dilución

La dilución que se llevó a cabo fue precisa y exacta de acuerdo con los coeficientes de variación y desviación absoluta, los cuales fueron menores al 20% respecto al valor nominal (ver tabla 21).



Tabla 21. Efecto de la dilución de MDH y OXC.

Analito	Promedio concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)*	Desviación Estándar	C.V. (%)	Desviación Absoluta (%)
MDH (30 $\mu\text{g/mL}$)	27.170	0.766	2.817	-9.434
OXC (6 $\mu\text{g/mL}$)	6.893	0.104	1.514	14.883

*Resultados obtenido a partir de 3 determinaciones independientes.

4.1.10 Tolerancia

El método fue tolerante a cambio de proporción de $\pm 2.0\%$ de solvente orgánico (acetonitrilo), ya que los coeficientes de variación calculados a partir de los triplicados de controles para cada condición no rebasan el $\pm 15\%$ respecto al valor teórico, asimismo, la desviación absoluta no supera el $\pm 15\%$ respecto a los dichos controles inyectados en las condiciones normales de trabajo.

COMPARACIÓN DE ALGUNOS MÉTODOS REPORTADOS EN LA LITERATURA.

El método analítico desarrollado en el presente trabajo tiene las ventajas de ser más económico y sencillo con respecto a los métodos reportados en la literatura y aquí citados, ya que no implica la utilización de materiales como cartuchos para extracción, así como la utilización de más reactivos como metanol en la fase móvil, hidróxido de sodio para la basificación de las muestras. También es capaz de detectar concentraciones menores, ya que el límite de cuantificación es de $0.1 \mu\text{g/mL}$ para ambos analitos y la longitud de onda de detección utilizada 235 nm es más específica para los compuestos, ya que así se descarta que otros componentes del plasma absorban a dicha longitud de onda, lo cual podría interferir en los tiempos de retención de OXC y MDH; al mismo tiempo es muy selectivo frente a componentes como la hemoglobina, los lípidos, cafeína, paracetamol y heparina. Asimismo, el tiempo de análisis es más corto, ya que el tiempo de corrida fue de 7 minutos, lo cual contribuye a un gasto menor de solventes en la fase móvil, a la vez que el procesamiento de las



muestras se lleva a cabo en poco tiempo y se utiliza un volumen pequeño de muestra (ver sección 2.5).

4.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN UN ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA

La C_{max} fue de 4.07 y 1.05 $\mu\text{g/mL}$, T_{max} de 4.00 y 0.830 h $ABC_{(t)}$ 78.08 y 2.55 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$, $ABC_{(INF)}$ 85.67 y 3.57 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ y finalmente $t_{1/2}$ 9.56 y 3.98 h para MDH y OXC, respectivamente (tabla 22).

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de OXC calculados a partir de los datos de concentración de 6 sujetos a los que se les administró una dosis de 300 mg de oxcarbacepina en suspensión.

Variable MDH	Promedio	Desviación estándar	C.V. %	Error estándar
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	4.072	0.996	24.465	0.407
T_{max} (h)	4.000	0.000	0.000	0.000
$ABC_{(t)}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	78.075	20.349	26.063	8.307
ABC_{INF} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	85.672	13.792	16.099	5.631
$t_{1/2}$ (h)	9.561	1.758	18.385	0.718
Variable OXC	Promedio	Desviación estándar	C.V. %	Error estándar
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1.048	0.584	55.719	0.238
T_{max} (h)	0.830	0.625	75.349	0.255
$ABC_{(t)}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	2.546	1.094	42.971	0.447
ABC_{INF} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	3.574	1.308	36.599	0.585
$t_{1/2}$ (h)	3.983	2.648	66.471	1.184



La figura 12 muestra el cromatograma de una muestra de un voluntario, tomada a las 4 horas posteriores a la administración de OXC en suspensión (300 mg). Cabe señalar que la farmacocinética aquí presentada únicamente tiene como fin el mostrar la aplicación del método analítico validado en este trabajo.

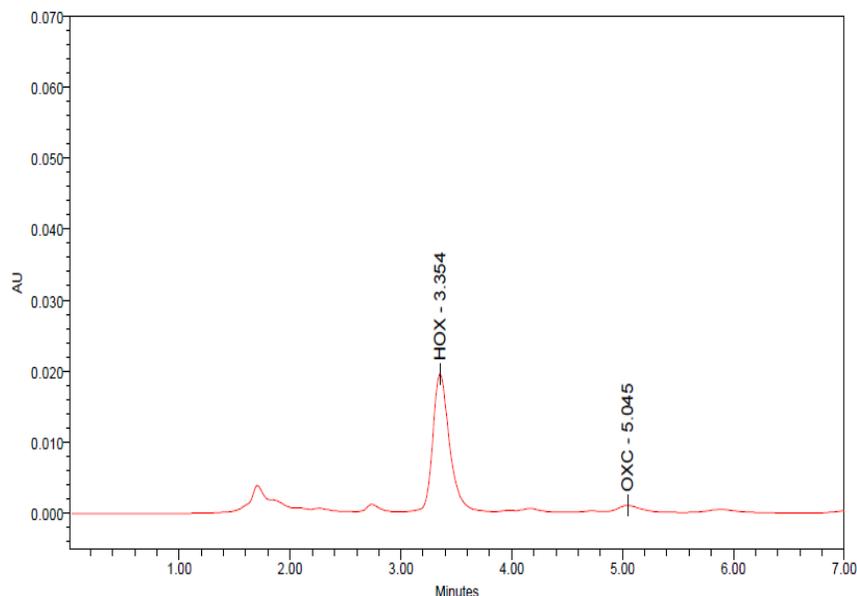
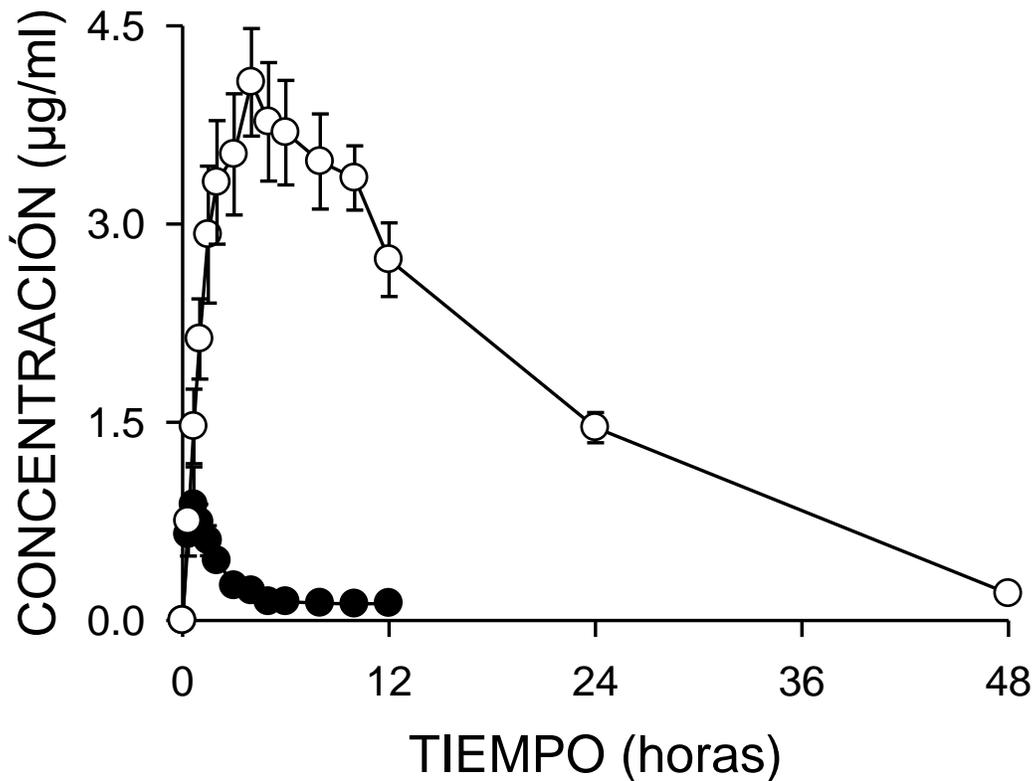


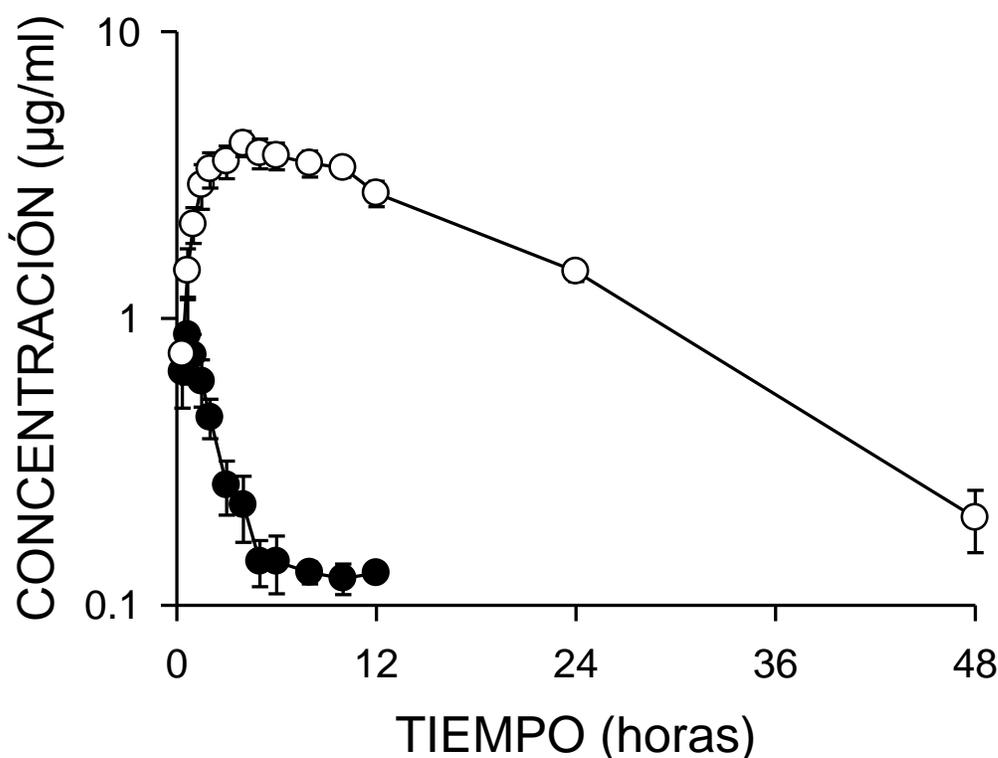
Figura 11. Cromatograma representativo de una muestra de un voluntario, se observa la respuesta de MDH y OXC 4 horas después de la administración de una dosis de 300 mg de OXC en suspensión oral.



La gráfica 9 representa el curso temporal promedio de ambos analitos en plasma de 6 voluntarios sanos después de la ingesta oral de 300 mg de oxcarbacepina en solución (valores lineales) y en la gráfica 10 se muestran los mismos datos pero en valores transformados a logaritmos. Dichas gráficas fueron construidas con el programa WinNonLin Profesional Versión 2.



Gráfica 9. Curva aritmética de absorción oral de 300 mg de OXC en suspensión. Valores promedio de concentración contra tiempo a partir de 6 sujetos sanos. ○ MDH, ● OXC



Gráfica 10. Curva logarítmica de absorción oral de 300 mg de OXC en suspensión. Valores promedio de concentración contra tiempo a partir de 6 sujetos sanos. ○ MDH, ● OXC

En un estudio realizado en 8 sujetos sanos (Tartara et. al. 1993) la concentración máxima de MDH fue de 5.6 ± 0.4 µg/mL en un tiempo de 6.6 ± 0.8 h, con un $t_{1/2}$ de $20.0 \pm$ y un ABC de 192 ± 25 µg/mL-h y 119 ± 10 µg/mL-h (0,32 h) para MDH y para OXC la C_{max} fue de 1.05 ± 0.15 µg/mL, en un tiempo t_{max} de 1.3 ± 0.2 h y un área bajo la curva (0,24 h) de 5.1 ± 0.7 µg/mL-h. Tanto OXC como MDH atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y su unión a proteínas es del 67% y 38%, respectivamente. En este mismo estudio, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de la oxcarbacepina y MDH en 8 pacientes tratados concomitantemente con valproato de sodio y en 8 pacientes con fenobarbital. En los pacientes tratados con valproato, la cinética tanto de la oxcarbacepina como de MDH no manifestó diferencias significativas respecto a los voluntarios sanos; sin embargo, en los pacientes tratados con fenobarbital se observó que, en general, los parámetros farmacocinéticos se vieron disminuidos respecto al



grupo control, lo cual sugiere que la biotransformación de OXC a su metabolito activo es acelerada por el tratamiento concomitante con fenobarbital, sin que la magnitud de este efecto tenga relevancia clínica.

Por otro lado, Larkin, et. al., en 1991 evaluaron en 8 voluntarios sanos varones (22-43 años), las concentraciones de OXC y MDH después de una dosis única de 300 mg de OXC y también en dosis diarias durante 29 días de 600 mg, obteniendo como resultados en el caso del monitoreo de concentraciones en la dosis única de 300 mg un área bajo la curva (ABC) de $255 \pm 59 \mu\text{mol/L}$, una C_{max} aproximadamente de $12 \mu\text{mol/L}$ en una t_{max} de alrededor de 6 horas; mientras que en el estado estacionario analizado después de la dosis 29 se reportó una C_{max} de 35-40 $\mu\text{mol/L}$ en una t_{max} aproximadamente de 2 horas con un área bajo la curva de $395 \pm 59 \mu\text{mol/L}$; evidentemente, los parámetros farmacocinéticos en el estado estacionario son más altos que los anticipados por el monitoreo de dosis única, sin embargo, no se observó afectada la relación MDH/OXC.

Como se puede observar los estudios de biodisponibilidad reportados por Tártara et. al., 1993 y Larkin et. al., 1991, los parámetros farmacocinéticos C_{max} , T_{max} y ABC (ver tabla 22), no difieren respecto a lo reportado en el presente trabajo, a pesar de que se utilizaron n pequeñas y el fin particular de este trabajo es presentar una aplicación del método analítico.



5. CONCLUSIONES

El método analítico para la cuantificación de oxcarbacepina y su metabolito activo MDH es un método confiable, económico y rápido, que además tiene la característica de medir concentraciones más pequeñas con respecto a los otros descritos en la literatura, por lo tanto es más sensible, y a su vez es sencillo para realizarlo y procesar las muestras plasmáticas, además de obtener un buen recobro para ambos compuestos (alrededor del 80%).

El método es lineal, preciso y exacto en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 20.0 $\mu\text{g/mL}$ para MDH y 0.01 a 5.0 $\mu\text{g/mL}$ para OXC. El límite de cuantificación y el límite de detección fue de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Por lo tanto es un método que se puede utilizar con certeza en las mediciones de oxcarbacepina y su metabolito activo MDH, en estudios de biodisponibilidad, farmacocinética, bioequivalencia y monitoreo terapéutico entre otros.



6. BIBLIOGRAFÍA

Baruzzi A, Albani F, Riva R. Oxcarbazepine: Pharmacokinetic Interactions and Their Clinical Relevance. 1994; *Epilepsia*; 35 (Suppl. 3), S14-S19.

Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. 2010; *Journal of Chromatography B*; 878 461-465.

Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G, Medina Santillán R. 2002. Biodisponibilidad y bioequivalencia en los medicamentos genéricos. México. Asclepius XXI.

Fortuna A, Sousa J, Alves G, Falcão A, Soares-da-Silva P. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. 2010; *Anal. Bioanal. Chem*; 397:1605-1615.

Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. 2005; *Pharmacological Research*; 51 297-302.

Gabrielsson J, Green AR. Quantitative pharmacology or pharmacokinetic pharmacodynamic integration should be a vital component in integrative pharmacology. 2009; *JPET* 331: 767-774.

Gibson GG, Skett P. 1994. Introduction to drug metabolism. Reino Unido. Blackie Academic & Professional Chapman & Hall, Segunda edición.



Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD. Drug monitoring: Simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hidroxicarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. 2007; *J Chromatogr. Sci*; 45, 9: 616-622.

Gibaldi M, Perrier D. 1982. Farmacocinética. España. Reverte.

Harris DC. Análisis Químico Cuantitativo, 2001. España. Reverté, Segunda Edición.

Katzung BG. 2005. Farmacología Básica y clínica. México. El Manual Moderno, Novena edición.

Krasowski MD. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-epilepsy medications. 2010; *Pharmaceuticals (Basel)*; 11:3(6):1909-1935.

Larkin JG, McKee PJW, Forrest G, Beastall GH, Park BK, Lowrie JI, Lloyd P, Brodie MJ. Lack of enzyme induction with oxcarbazepine (600 mg daily) in healthy subjects. 1991; *Br J Clin Pharmac*; 31, 65-71.

Lloyd P, Flesch P, Dietrele W. Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Oxcarbazepine. 1994; *Epilepsia*; 25 (Suppl. 3), S10-S13.

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

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. 2004. Farmacología. Madrid.Churchill Livingstone, Quinta Edición.



Rouan MC, Decherf M, Le Clanche V, Lecaillon JB, Godbillon J. Automated microanalysis of oxcarbazepine and its monohydroxy and transdiol metabolites in plasma by liquid chromatography 1994; *Journal of Chromatography B*; 658 167-172.

Rowland M, Tozer TN. 1995. Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications. Estados Unidos de América. Lippincott Williams & Wilkins, Tercera edición.

Rubinson JF, Rubinson KA. 2000. Química Analítica Contemporánea. México. Prentice Hall Pearson, Primera Edición.

Sarfaraz, KN. 2007. Handbook of bioequivalence testing, Estados Unidos de América Informa, Healthcare, USA, Drugs and Pharmaceutical Sciences, Volumen 171.

Shorvon, S. Oxcarbazepine: a review. 2000; *Seizure*; 9:75-79.

Tartara A, Galimberti CA, Manni R, Morini R, Limido G, Gatti G, Bartoli A, Strada G, Perucca E. The pharmacokinetics of oxcarbazepine and its active metabolite 10-hydroxy-carbazepine in healthy subjects and in epileptic patients treated with phenobarbitone or valproic acid. 1993; *Br. J Clin Pharmac*; 36:366-368.

Tecoma ES. Oxcarbazepine 1999; *Epilepsia*, 40 (Suppl. 5); S37-S46.

Van Belle K, De Koster K, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Narrow-bore liquid chromatographic assay for oxcarbazepine and its major metabolite in rat brain, liver and blood microdialysates. 1994; *Journal of Chromatography B*; 657, 149-154.

Zakrzewska JM, Patsalos PN. Oxcarbazepine: a new drug in the management of intractable trigeminal neuralgia. 1989; *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*; 52:472-476.