



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN FARMACIA

**LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA
Y BIOFARMACIA**

Presenta:

pLF. FLORES TEMOLTZI GUADALUPE CAROLINA

Tesis:

Validación de un método por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Cefotaxima en orina humana.

Director de tesis:

M.C. Benjamín Sandoval Guzmán.

“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA CUANTIFICAR CEFOTAXIMA EN ORINA HUMANA”

Índice.

1	Introducción	3
1.1	Cromatografía	3
1.1.1	Definición de cromatografía	3
1.1.2	Cromatografía líquidas de alta resolución (HPLC)	4
1.1.3	Cromatografía de fase reversa	4
1.1.4	Cromatograma	5
1.1.5	Retención o factor de capacidad	6
1.1.6	Efecto del tamaño de la muestra	7
1.1.7	Resolución y tiempo de retención	8
1.1.8	Cambio en la resolución Rs con cambios en el factor de separación α	8
1.1.9	Equipo HPLC	9
1.2	Validación de métodos analíticos	10
1.2.1	Definición de validación	10
1.2.2	Clasificación de validación	11
1.3	Parámetros de validación	11
1.3.1	Linealidad	13
1.3.2	Límite de detección y cuantificación	13
1.3.3	Selectividad	13
1.3.4	Precisión	13
1.3.5	Repetitividad	14
1.3.6	Reproducibilidad	14
2	Antecedentes	15
2.1	Lactámicos β	15
2.1.1	Mecanismo de acción	15
2.2	Cefotaxima	16
2.2.1	Características generales	16
2.2.2	Dosis en función renal normal	16
2.2.3	Dosis en pacientes con insuficiencia renal.	16
3	Objetivos	17
3.1	Objetivos generales	17
3.2	Objetivos particulares	17
4	Justificación	17
5	Hipótesis	18
6	equipo	19
7	materiales	19
8	reactivos	19
9	Búsqueda de las condiciones adecuadas de trabajo	20
9.1	Preparación de las soluciones	20
9.2	Equilibrado del sistema: fase móvil / fase estacionaria	21
9.3	Resolución cromatografica	21

9.4	Determinación del intervalo de concentraciones sembrado en matriz ideal (fase móvil)	24
9.5	Determinación de presencias de interferencias en la matriz biológica (orina)	25
9.6	Modificación de la fase móvil	26
9.7	Disminución de las interferencias presentes en orina	29
9.8	Modificación del estándar interno	33
9.9	Determinación del intervalo de concentraciones sembrado en matriz biológica (orina)	36
9.10	Determinación de la concentración del estándar interno (dipirona)	37
10	Validación del método	39
10.1	Preparación de las soluciones	39
10.2	Equilibrado del sistema: fase móvil/fase estacionaria	40
10.3	Determinación de la linealidad, intervalo de concentraciones de la curva patrón, LOD y LOQ	41
10.4	Repetitividad	41
10.5	Reproducibilidad	41
10.6	Robustez	42
10.7	Estabilidad de las muestras	43
11	Resultados	44
11.1	Linealidad	44
11.2	LOD y LOQ	45
11.3	Repetitividad	46
11.4	Reproducibilidad	47
11.5	Robustez	48
11.6	Evaluación del método en muestras in vivo	48
12	Diagrama de flujo: búsqueda de las condiciones adecuadas de trabajo	55
13	Diagrama de flujo: validación del método para cuantificar Cefotaxima en orina por HPLC	56
14	Discusión de resultados	57
15	Conclusión	58
16	Anexo1: calibración del pH-metro	59
17	Anexo 2: obtención, tratamiento y conservación de muestras biológicas	59
18	Anexo 3. Criterios de exclusión e inclusión de pacientes	61
19	Anexo 4: sistema de filtración del buffer	62
20	Anexo 5: responsiva de los voluntarios administrados con Cefotaxima	63
21	Anexo 6: instrucciones para la administración del medicamento (Cefotaxima sódica)	63
22	Anexo 7: nota 1: preparación de las soluciones en la búsqueda de las condiciones de trabajo	64
23	Anexo 7: nota 2: preparación de las soluciones en la validación del método	65
24	Anexo 8: glosario	67
25	Bibliografía	68

Introducción

Cromatografía.

Las primeras separaciones con resultados positivos, por medio de métodos cromatograficos fueron llevados a cabo por Mijail. S. Tswett en el año de 1906; este botánico ruso consiguió separar algunos pigmentos verdes de hojas de plantas en una serie de bandas coloreadas, utilizando una columna de carbonato de calcio en polvo y haciendo pasar sobre este lecho diferentes solventes.

El desarrollo total de estas técnicas se produjo a finales de 1930 e inicio de 1940 en que J. P. Martin (premio nobel en 1952) y A. T. James impulsaron el desarrollo de la cromatografía de gases (CG), donde primero introdujeron una forma de cromatografía líquida, al colocar la fase móvil (agua) en la fase estacionaria (sílica gel) y de esta forma separaron algunos acetil aminoácidos, publicaron su trabajo en 1941 y en este recomendaron; el reemplazo de la fase móvil acuosa por un gas, el cual aceleraría el proceso de transferencia entre las dos fases y proporcionaría una separación más eficiente. No obstante, las limitaciones de la CG en cuanto al tipo de muestras analizables, origino en la segunda década de los sesenta, una vuelta a considerar la cromatografía líquida (CL) cuyas limitaciones, en este sentido se reducen a la posibilidad de disolver la muestra, lo que confiere un rango mucho más amplio de aplicación. Este hecho, junto con la aparición de fases estacionarias con diámetros de partícula mucho menores que los utilizados hasta entonces (3 a 25 μm), que permiten obtener columnas de mayor eficacia, llevó a una utilización cada vez más extensa de este tipo de cromatografía.

La experiencia acumulada en el desarrollo de la CG permitió también aplicar nuevos puntos de vista de la CL, para la que pronto se diseñaron sistemas de inyección, circulación del eluyente y detección, de eficacia comparable a los retos utilizados en CG, dando lugar a la moderna técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o por cuyas siglas en ingles HPLC (high performance liquid chromatography)^{1,4}

En lo que respecta a la definición de cromatografía; la I.U.P.A.C la define de forma más amplia como:

Definición IUPAC: Método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel. La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como película, etc.²

Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía líquida de alta resolución, o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) es una técnica cromatográfica empleada para separar componentes utilizando una variedad de interacciones físicas y químicas entre el analito y la columna cromatográfica.³

El analito disuelto en la fase móvil se pasa a través de una columna por la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce a la corriente de la fase móvil y aquí es donde se efectúan interacciones fisicoquímicas con la fase estacionaria mientras la atraviesa. El tiempo que tarda en efectuar interacciones se conoce como tiempo de retención (T_R), único. El cual depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

La migración diferencial o el movimiento de las moléculas de los compuestos a través de la columna dependen de la distribución del equilibrio de cada compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil. Por lo tanto la migración diferencial es determinada por las variables que afecten este proceso de distribución, dentro de estas tenemos a la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura. Por lo tanto si queremos alterar el equilibrio de distribución entre las moléculas de los materiales a separar tenemos que modificar a estas tres variables.

Sin embargo; cuando se requiere mejorar la selectividad para mejorar la resolución son varias las formas en que puede lograrse y se encuentran listadas en orden decreciente de efectividad como sigue: cambio del solvente de la fase móvil, cambio del pH de la fase móvil, cambio de la fase estacionaria y el cambio de temperatura.^{4;5}

Cromatografía de fase reversa.

Anteriormente la cromatografía de líquidos se utilizaba básicamente para separar compuestos polares siendo la fase estacionaria de un carácter polar y la fase móvil poco polar (cromatografía de fase normal). Sin embargo; en 1950 Howard y Marlín introducen un sistema cromatográfico de fase reversa que es aquella en la que la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar.

La cromatografía de fase reversa, RPC (Reverse Phase Chromatography), se ha convertido en el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada en HPLC, debido a que esta técnica proporciona retención y selectividad óptima cuando las muestras tienen un carácter predominantemente alifático o aromático.

En la RPC la fase estacionaria consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílica rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 micras.

La sílica presenta las ventajas de resistir la aplicación de altas presiones sin contraerse, y de no expandirse al contacto con los solventes. Pero tiene la desventaja de ser

químicamente inestable; a un $\text{pH} < 3$ los ligandos unidos a la sílica pueden ser removidos y a un $\text{pH} > 7.5$, la sílica se solubiliza.

Puede considerarse que la RPC es un proceso de partición en donde los solutos están distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares.

El mecanismo que se ha propuesto para explicar cómo retienen estas superficies a los solutos es el siguiente. Cuando un soluto se disuelve en agua, las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua se distorsionan o se rompen. Únicamente los solutos altamente polares o iónicos pueden interactuar con la estructura del agua. Los solutos no polares casi no interactúan con estas estructuras y como consecuencia “abandonan” la fase móvil. La fuerza motriz de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, si no el efecto de repulsión del disolvente por el soluto.

La retención hidrofóbica del soluto en la fase estacionaria puede disminuirse añadiendo un disolvente orgánico a la fase móvil acuosa. Al incrementar la polaridad de la fase móvil, la distribución de los solutos se cambia hacia la fase móvil. La cantidad de muestra que se une a la fase estacionaria depende de la concentración del ligando inmovilizado, de las propiedades químicas y físicas de la molécula que va a ser adsorbida y de la polaridad de la fase móvil y estacionaria. Así; conforme menos polar sea la fase móvil, menor será la adsorción de la muestra a la fase estacionaria.

Respecto a las características químicas del ligando, es difícil predecir qué tipo de cadena hidrocarbonada será mejor para determinada aplicación. En principio, entre menos polar sea la molécula que se va a purificar, se requerirá una fase estacionaria más hidrofóbica. Sin embargo, si la muestra resulta ser muy afín a la matriz, la elución se dificultaría. Debe hacerse un análisis cuidadoso de la molécula de interés y determinar la naturaleza química de los contaminantes asociados.²⁰

CROMATOGRAMA

Los resultados los observamos en un cromatograma, el cual presenta cuatro características que son importantes para describir los resultados de la separación. Primero cada compuesto abandona la columna en forma de una banda simétrica en forma de campana o pico (una curva de distribución Gaussiana). Segundo cada banda de moléculas sale de la columna a un tiempo dado el cual puede ser usado para caracterizar o identificar al compuesto, a este tiempo se le conoce como el tiempo de retención T_R que es una medida que comprende desde que se introdujo a la columna hasta que la abandono. Una tercera característica es la diferencia en el tiempo de retención entre bandas de compuestos adyacentes: por ejemplo, T_R para el compuesto C menor que el T_R del compuesto B. Y finalmente cada banda se caracteriza por un valor de anchura del pico T_W , como se observa en la banda B de la figura 1; en la cual se han dibujado tangentes que se extienden hasta tocar la línea base. La separación es mejor a medida que las bandas sean más estrechas y por lo tanto los valores de T_W sean más pequeños.⁴

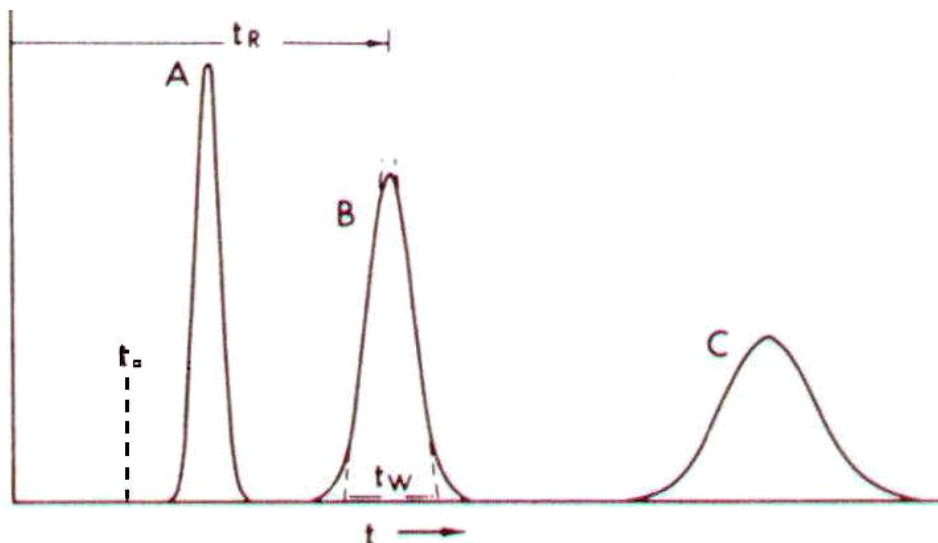


Figura. 1 Resultado de un cromatograma. El tiempo T_0 marca la elución de una muestra no retenida

RETENCION O FACTOR DE CAPACIDAD (K')

El factor de capacidad (K), expresa la relación entre el número de moléculas que se encuentran en la fase estacionaria con relación al número de moléculas que se encuentran en la fase móvil como esta relación es expresada por el tiempo de retención que presenta un soluto en determinadas condiciones cromatográficas puede ser expresado en base al tiempo de retención por medio de la siguiente ecuación:

$$K = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

Donde T_R es el tiempo de retención del compuesto de interés y T_0 es el tiempo de retención de un compuesto que se sabe no sufre ninguna interacción con la fase estacionaria y representa el tiempo en que tarda en pasar únicamente por el espacio que constituye a la columna, este dato puede estar representado por el solvente donde se encuentra contenida la muestra.

Para observar si un cambio de condiciones en el sistema cromatográfico modifica al factor de capacidad, es necesario determinarlo utilizando la ecuación anterior, si observamos la figura 1 para el caso del compuesto B, el valor de K es la distancia entre T_0 y el valor del centro del pico de B dividido entre el valor de T_0 .

Para una columna con una fase móvil, temperatura y ciertos constituyentes de la muestra, **k** por lo general es constante cuando la muestra es pequeña. Por lo tanto el valor de t_R es definido para un compuesto dado en unas condiciones dadas y puede ser usado para identificar a un compuesto comparando el valor en condiciones idénticas⁴

EFECTO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

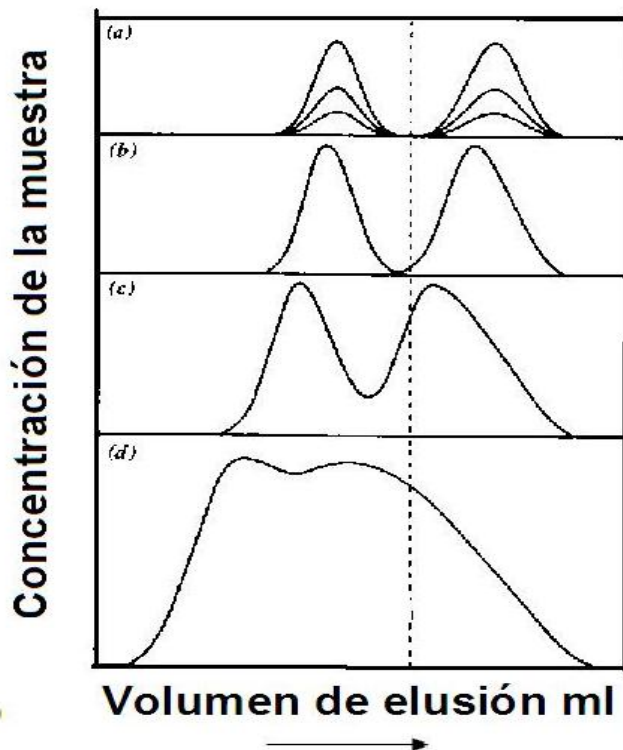


Figura 2 Efecto del tamaño de la muestra en CL

En general el efecto de variar el tamaño de la muestra en cromatografía líquida (CL) se observa en la figura 2. Para muestras muy pequeñas (a) la altura del pico incrementa conforme aumenta el tamaño de la muestra, pero el tiempo de retención no es afectado y la separación relativa se mantiene igual. Conforme aumenta la cantidad de la muestra en (b) se observa una disminución en el tiempo de retención bien sea para uno de los compuestos o para ambos, para incrementos mayores en la cantidad de la muestra, casos (c y d) se observa una rápida pérdida de la separación y una disminución en los tiempos de retención de los compuestos.

Por lo general en las separaciones analíticas es preferible trabajar dentro de límites de concentración en los cuales los valores de K se mantengan constantes, esto es el tamaño de la muestra debe ser menor que la capacidad lineal de la columna.

Los valores de K deberían hallarse idealmente entre uno y diez, o sea, los solutos deberían ser retenidos de dos a once veces tanto como el compuesto no retenido. Los valores de k mayores a 10 dan por resultado tiempos de retención más largos y picos más anchos, mientras que los valores menores a la unidad dan por resultado una separación deficiente.

Pero como lo que se desea lograr con la cromatografía es la separación de varios solutos de una muestra dada, el conocimiento del factor de capacidad de un soluto no nos da una idea de la capacidad de separación de una columna para varios solutos ni nos asegura que la separación de dos o más solutos sea adecuada, es necesario evaluar la separación relativa de dos solutos adyacentes, lo cual es descrito por el factor de separación (α), el cual está dado por la siguiente ecuación.

$$\alpha = K_A / K_B$$

El factor de separación es una medida de la selectividad de un sistema cromatográfico, por lo general se le llama el **factor de selectividad, selectividad o retención relativa**.⁴

RESOLUCIÓN Y TIEMPO DE RETENCIÓN

La resolución R_S de dos bandas adyacentes 1 y 2 es definida como la distancia que separa a las bandas 1 y 2 dividido por el promedio del ancho de las bandas:

$$R_S = (t_2 - t_1) / 1/2 (t_{w1} - t_{w2})$$

Los valores de t_1 y t_2 se refieren a los tiempos de retención de las bandas 1 y 2, los valores de t_{w1} y t_{w2} se refieren al ancho de cada banda. Cuando el valor de R_S es igual a 1 como en el ejemplo anterior, las dos bandas se separan relativamente bien, solo el 2 % de cada banda se sobrepone a la otra banda. Valores mayores de R_S dan por resultado mejores separaciones, y valores menores llevan a pobres separaciones.⁴

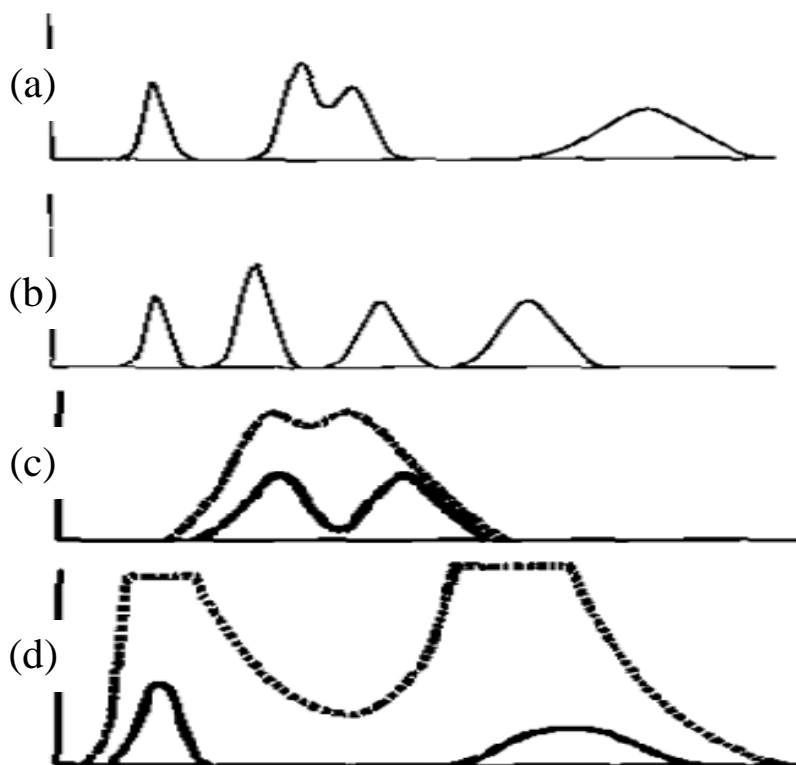
CAMBIO EN LA RESOLUCIÓN R_S CON CAMBIOS EN EL FACTOR DE SEPARACION α

El valor de α deberá de ser lo mayor posible y los valores de los otros parámetros mantenerse constantes. Un incremento en α es una técnica poderosa para aumentar y mejorar la resolución R_S debido a que R_S puede aumentar mientras el tiempo es disminuido. Sin embargo determinar las condiciones necesarias tales como cambio en la fase móvil y/o cambio de la fase estacionaria y/o cambios de temperatura para cambiar el valor de α muy frecuentemente no es un paso sencillo y por lo general requiere del viejo método prueba y error.

La pregunta es cuándo un cambio en α es la solución más probable para un problema de separación. Ya que no es posible una separación si el valor de $\alpha = 1$, por lo tanto cuando el valor ($\alpha - 1$) es menor de 0.1 un cambio en α es la elección primaria.

Segundo debido a que valores grandes de α dan separaciones rápidas un cambio en este valor puede ser necesario cuando se desarrolla un método que se empleara en la rutina analítica para un gran número de muestras, lo cual es muy común en procesos de control, en ensayos clínicos, etc.

Tercero la separación de muestras complejas de una forma rutinaria puede requerir el ajuste de varios valores para bandas o picos adyacentes para obtener un cromatograma con picos regularmente espaciados, como se observa en la fig 3-**b** comparada con la fig 3-**a**, se desea obtener valores similares de α para todos los picos resueltos. Finalmente valores muy grandes de α son necesarios sobre todo cuando se efectúa cromatografía preparativa, debido a que el tamaño de la muestra puede incrementar grandemente e impedir la separación al sobresaturarse la columna con valores bajos de α como es el caso en 3-**c**, cuando el valor de α es incrementado la capacidad de la columna aumenta como es el caso de 3-**d**.⁴



*Figura 3 Rutinaria modificación de separaciones en cromatografía líquida al alterar los valores de α de bandas adyacentes. Bandas **a** y **b** son separaciones analíticas y bandas **c** y **d** son separaciones preparativas*

Equipo de HPLC

Un equipo de HPLC básicamente debe contar con un sistema de bombeo que impulse el flujo de la fase móvil a través de la columna, una columna que separe los componentes de la muestra, un detector que mida alguna característica de dichos componentes conforme van saliendo de la columna y un procesador que convierta la señal electrónica del detector en un cromatograma.²⁰

En la figura 2 se presenta el esquema básico de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

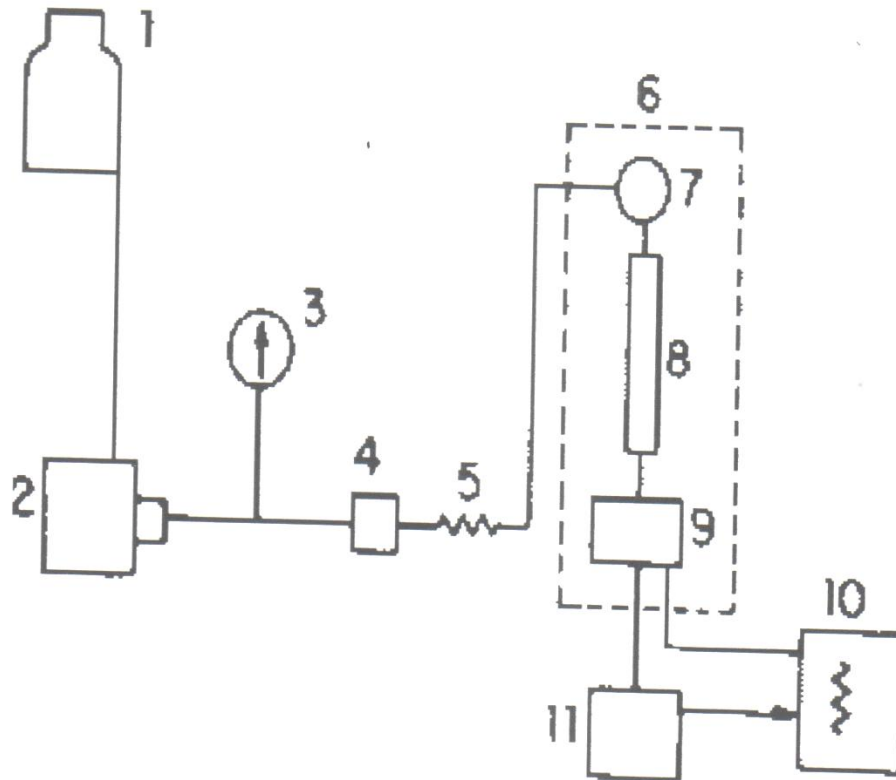


Figura 2. Esquema básico de un HPLC (1) recipiente de la fase móvil, (2) bomba, (3) medidor de presión, (4) Filtro en línea, (5) Amortiguador de pulsos, (6) Controlador de temperatura, (7) Inyección de la muestra, (8) Columna cromatográfica, (9) Detector, (10) Registrador. (11) equipo de evaluación de datos.

Validación de métodos analíticos.

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.⁶

Definición: “La validación es el método científico que proporciona la evidencia documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación o proceso; el cual establece que está bajo control, lo que nos conduce a obtener un alto grado de control y satisfacción plena de todas las especificaciones de calidad.”⁷

Clasificación de la validación.

Los métodos de validación se clasifican como Normalizado o no Normalizado de acuerdo a lo siguiente:

- a) Método normalizado es un método ya existente al cual se le realizara una modificación significativa y estos se encuentran publicados en las siguientes instancias.
 1. Como primera instancia en:
 - i. Normas Oficiales Mexicanas (NOM)
 - ii. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)
 - iii. Normas Mexicanas (NMX).
 2. Como segunda instancia:
 - i. Environmental Protection Agency (EPA)
 - ii. Pesticide Analytical Manual (PAM)
 - iii. Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC)
 - iv. United States Pharmacopeia (USP)
 - v. British Pharmacopeia (BP)
 - vi. American Society for Testing and Materials (ASTM)
 - vii. International Organization for Standardization (ISO)
 - viii. Food and Drug Administration (FDA)
 - ix. Food and Agriculture Organization (FAO)
 - x. European Commission (CE)
 - xi. United States Department of Agriculture (USDA)
- b) Métodos no normalizados: Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o método nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.^{6; 8}

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Los parámetros de desempeño se establecen de acuerdo al tipo de prueba utilizada, por lo cual tenemos:

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
Intervalo lineal y de trabajo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Límite de detección	SI ^a	SI ^a	NO	NO	NO	SI ^b
Límite de cuantificación	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	NO
Recuperación	SI	SI	NO	SI	SI	NO
Sesgo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Repetibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Reproducibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Incertidumbre	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Sensibilidad	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI ^e	SI ^d	NO
Selectividad	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI	SI	SI ^b
Robustez	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d

^a Solo para análisis a nivel trazas (ppm, ppb, ppt)

^b Solo métodos cualitativos

^c Solo métodos cuantitativos

^d Solo aplica para métodos no normalizados

^e Solo para el análisis de aniones y cationes por ion selectivo

Tomado de: Boris Duffau, Fabiola Rojas, Isabel Guerrero, Luis Roa, Luis Rodríguez, Marcelo Soto, Marisol Aguilera, Soraya Sandoval. "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre validación de métodos", instituto de salud pública, Santiago de Chile, diciembre de 2010.

LINEALIDAD

Se define como la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango definido.¹¹

Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones.

La ecuación de la línea es:

$$y = mx + b$$

Donde; b = Ordenada al origen

M = Pendiente

Pendiente (m): Indica la sensibilidad de calibración del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito.

Ordenada al origen (b): Es la intersección o intercepto, y es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos.^{12, 13}

LIMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Empleando los resultados de la curva de calibración, se determinó LOD y LOQ, empleando las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = a + 3 \cdot S_{y/x}$$

$$\text{LOQ} = a + 10 \cdot S_{y/x}$$

Dónde: a = intercepto y $S_{y/x}$ = Error estándar de estimación del intercepto

SELECTIVIDAD

Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito en presencia de otros constituyentes de la muestra y demostrar la especificidad del método para producir una sola respuesta para el analito. Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalentes: algunos autores los diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto.^{14, 15, 16}

PRECISIÓN

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre si.¹⁴

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, estimada analíticamente por *s*. El estimador *s* de la desviación estándar se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n = Numero de medidas

X_i = Valor medio en el ensayo i,

\bar{X} = Estimador de la media poblacional μ

REPETIBILIDAD

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.¹⁷

El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación. Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

El coeficiente de variación se calcula de la siguiente manera:

$$CV = \left(\frac{s}{\hat{x}} \right) * 100$$

Este parámetro se determina mediante uno de los siguientes métodos:

- Realizando varias determinaciones a una muestra homogénea.
- Realizando varias determinaciones a muestras de cantidades o concentraciones diferentes.^{15, 18}

REPRODUCIBILIDAD

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad.¹⁷

Antecedentes

Lactámicos β .

Los antibióticos β lactámicos son antimicrobianos que comparten una estructura y un mecanismo de acción común: la inhibición de la síntesis de peptidoglucanos de la pared celular bacteriana, en este grupo están las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos

En el caso de las cefalosporinas se clasifican por generaciones: en la primera están fármacos con actividad buena contra grampositivos y poca actividad contra gramnegativos; en la segunda generación están fármacos con una actividad un poco mayor contra gramnegativos, e incluye algunos agentes con actividad contra anaerobios; en la tercera generación están antimicrobianos con una actividad contra enterobacteriaceae, y un subgrupo con actividad contra P. aeruginosa: y la cuarta generación, con una mayor estabilidad contra la hidrólisis.²³

Mecanismo de acción

Los antibióticos beta-lactámicos interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana. Específicamente, estos medicamentos se ligan de manera covalente e inhiben las enzimas traspeptidasas que participan en el último paso de la formación del peptidoglucano rígido; este componente es especialmente importante en la pared celular de las bacterias gram positivas.

Las enzimas transpeptidasas de la membrana citoplasmática bacteriana que son sensibles a los agentes beta-lactámicos, son llamadas proteínas ligadoras de penicilinas. Esas proteínas varían en las distintas bacterias. Algunas de ellas también funcionan como enzimas hidrolíticas beta-lactámicas.

Comprendiendo el mecanismo de acción pueden, también, entenderse los principales procesos que confieren resistencia bacteriana a estas drogas:

- 1) Producción de beta-lactamasas, que acetilan el anillo betalactámico e inactivan la droga. Existen al menos 3 clases de beta-lactamasas. El proceso se transmite mediante plásmidos; las bacterias gram-negativas tienen una mayor variedad de beta-lactamasas, que pueden ser producidas por rutas directas desde los cromosomas. Los gram-negativos y los estafilococos son ejemplos bien conocidos de este tipo de resistencia. Las cefalosporinas son más estables que las penicilinas a la acción de las beta-lactamasas.
- 2) Proteínas ligadoras de penicilinas alteradas, a las que no pueden ligarse los antimicrobianos. Este mecanismo es responsable, entre otros, de la resistencia de S. aureus a la meticilina, del aumento reciente de la resistencia de S. pneumoniae, y de la incapacidad de las cefalosporinas para inhibir a los enterococos.
- 3) Incapacidad del agente terapéutico de alcanzar la proteína ligadora de penicilina específica, por cambios en proteínas llamadas porinas, que permiten el paso del beta-

lactámico a través de la membrana lipídica exterior. Este mecanismo es principalmente importante en las bacterias gram-negativas⁹

Cefotaxima

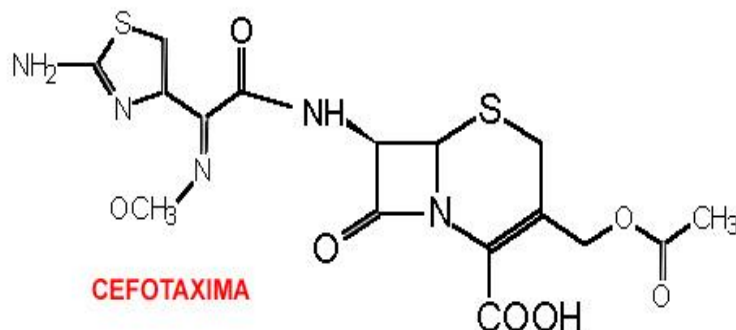


Imagen tomada de <http://www.iqb.es/diccio/c/images/cefotaxima.jpg>

La cefotaxima es una cefalosporina de tercera generación resistente a muchas de las β -lactamasas bacterianas y posee buena actividad contra muchas bacterias aerobias grampositivas y gramnegativas. La cefotaxima tiene una semivida plasmática de ~1 h y hay que administrarla cada 4 a 8 horas en caso de infecciones graves. Es metabolizada in vivo hasta la forma de desacetilcefotaxima, que es menos activa contra muchos microorganismos, en comparación con el compuesto original. Sin embargo, el metabolito actúa de forma sinérgica con el compuesto original contra algunos microorganismos.

Características generales.

- Peso molecular: 477.4
- % unión a proteínas: 40
- % excretado en orina: 40-60
- Volumen de distribución (L/Kg): 0.15-0.55
- Vida media normal: 0.9 - 1.14 / 2.5 (10 horas para el metabolito)

Dosis en función renal normal.

- Infección leve: 1 g. cada 12 horas.
- Infección moderada: 1 g. cada 8 horas.
- Infección severa: 2 g. cada 6 horas.
- Infección mortal: hasta 12 g. diarios dividido en 3-4 dosis.

Dosis en pacientes con insuficiencia renal (ml/min)

- 20-50 -misma dosis que en la función renal normal
- 10-20 -misma dosis que en la función renal normal
- <10 -1 g cada 8-12 horas²⁴

Objetivos

Objetivos generales

- Cuantificar el porcentaje de excreción en orina de Cefotaxima después de la administración de 500 mg por vía intramuscular (dosis única); usando Cromatografía líquida de Alta Resolución, (HPLC) con el método previamente validado.

Objetivos particulares:

- Llevar a cabo la validación del método cromatográfico para asegurar la correcta cuantificación de Cefotaxima en orina humana.

Justificación

En México se desconoce el comportamiento metabólico y de excreción de la gran mayoría de los fármacos empleados por la población, por lo cual se administran diariamente bajo las dosis recomendadas por los laboratorios farmacéuticos aun cuando los estudios de dosificación y seguridad se realizaron en los países de origen de la casa matriz.

Hasta cierto punto esto podría ser un problema en nuestro país, ya que el comportamiento metabólico y de excreción de una raza a otra puede variar por la genética de cada individuo, los hábitos alimenticios, las condiciones ambientales, etc.

Dicho problema se puede atribuir a la expresión de la variabilidad biológica interindividual, puede ser debida a causas farmacocinéticas (en la absorción, distribución, metabolización y excreción que puede determinar diferentes intensidades y duraciones de la respuesta) o bien a causas farmacodinámicas (en la interacción fármaco-receptor). Cada uno de estos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos puede ser diferente de un individuo a otro a causa de determinantes genéticos, ambientales o patológicos, y depende también de la gravedad o intensidad de la enfermedad o síntoma que se desee tratar²¹

En general; si revisamos los datos reportados veremos que aproximadamente uno de cada tres pacientes no responde correctamente a la terapia farmacología prescrita. Los ingresos hospitalarios debido a reacciones adversas por fármacos representan el 1.7% en España, mientras que esta cifra es más elevada en reino unido (6.5%), y en estados unidos cada año 2.2 millones de pacientes sufren efectos adversos, aun cuando los fármacos han sido prescritos y administrados adecuadamente. Además, las reacciones adversas graves son la principal razón de fallo del desarrollo de un nuevo fármaco y la retirada del mercado de fármacos aprobados.²²

Si el comportamiento cinético de los mexicanos fuera diferente, con respecto al proceso de eliminación, el cual se refleja en la depuración del fármaco, en el caso de cefotaxima en la depuración renal y la hepática; ambos juegan un papel importante en la eliminación y se conoce que se forman tres metabolitos por vía hepática, siendo el más importante el desacetil cefotaxima, el cual se sabe tiene una potencia antimicrobiana aproximadamente 8 veces menor que cefotaxima en general, el proceso hepático de biotransformación representa del 30 % al 40 % y la eliminación renal del fármaco intacto, representa del 70 al 60%. De presentarse diferencias en los procesos de eliminación de cefotaxima se podrían presentar dos escenarios:

- 1) Si depuramos a mayor velocidad que la población empleada en el diseño del régimen de dosificación, los niveles plasmáticos serían menores, lo cual podría afectar la eficiencia del fármaco, ya que los reportes de la literatura sitúan a la concentración mínima inhibitoria entre 4 y 8 mcg/ml en plasma, dependiendo del microorganismo patógeno
- 2) Si la depuración en los mexicanos es más lenta, los efectos secundarios como son: reacciones alérgicas cutáneas, fiebre, shock anafiláctico, cuadro hemático, nauseas, vomito, colitis, diarrea, etc. Pueden aumentar su intensidad, de tal forma que la dosis administrada podría disminuirse, sin afectar la eficiencia de Cefotaxima.

Cabe mencionar que este proyecto se divide en dos partes, en este trabajo se desarrollara el método analítico para cuantificar cefotaxima en orina, lo cual permitirá evaluar el comportamiento de excreción renal, evaluando la cantidad total excretada intacta del fármaco. Con el método que se está desarrollando se determinaran los niveles plasmáticos del fármaco; empleando ambos métodos podremos determinar la depuración plasmática y la depuración renal del fármaco, lo cual permitirá conocer si existen diferencias en cuando a los valores de depuración tanto renal como no renal en el comportamiento de la población mexicana con respecto a la población empleada para diseñar el régimen de dosificación, si este es el caso podría ser necesario efectuar modificaciones en dicho régimen.

Hipótesis.

H_a: El método a desarrollar va a permitir la eficiente cuantificación de Cefotaxima en orina humana

H₀: El método a desarrollar no va a permitir la cuantificación de Cefotaxima en orina humana de manera eficiente

Equipo

- Equipo cromatográfico: HPLC, marca Varian Polaris ProStar; Modelo 210 con dos bombas de tipo mecánico varian polaris Pro star; modelo 210.
- Detector UV marca varian pro star modelo 350.
- Inyector Manual con Loop de 20µl, marca Rheodyne
- Columna: C₁₈
- Sistema de registro: Star Chromatography Workstation Versión 6.0
- Sistema de regulación de la temperatura marca Erweka.
- Balanza analítica marca Sartorius; modelo BP121S
- Ultrasonido Branson modelo 2510
- PH-metro marca Corning; modelo 430.

Materiales

- Pipetas automáticas
- Agitador vórtex
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Puntas para pipetas
- Bala magnética
- Sistema de filtración
- Reservorios de 1 litro
- Material común de laboratorio.

Reactivos

- Buffer de Fosfato de sodio monobásico pH=4.5
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado industrial
- Agua desionizada a 18 mΩ (grado HPLC)
- Cefotaxima
- acetaminofén.
- Dipirona
- Dexametazona
- Prednisona
- Fenilefrina
- indometacina
- cefuroxima sódica
- ceftriaxona

BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES ADECUADAS DE TRABAJO.

Para realizar este trabajo se toma como base un método no normalizado desarrollado hace tiempo por el laboratorio de biofarmacia y farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

Preparación de las soluciones.

1. Se prepara 1 litro de fase móvil, por lo cual en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en sus respectivas proporciones:

a)-Buffer de fosfato de sodio monobásico: 91% =910 ml

- Pesar 2.8 gramos de fosfato de sodio monobásico.
- Verter en un vaso de precipitado y disolver en 1 litro de agua grado HPLC.
- Agregar una barra magnética y someter a agitación durante 5 minutos.
- Transcurrido este tiempo o bien al observar que el fosfato se encuentre bien disuelto, se procede a medir el pH de la solución (antes de medir se debe calibrar el pH-metro, consulte el anexo 1).
- El pH de la solución deberá ser pH=4.5, de lo contrario se acondiciona agregando pequeñas cantidades de NaOH (0.5 N) o H₃PO₄ (1 N) según sea el caso.
- Finalmente se procede a filtrar el buffer (ver anexo 4).

b)- Metanol grado HPLC: 9% = 90 ml.

c)- cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C para su posterior uso.

2. Preparar la solución madre de cefotaxima y acetaminofén como sigue:

Solución madre cefotaxima

- ✓ Pesar 4 mg de patrón primario de cefotaxima
- ✓ Disolver y aforar en un matraz de 10 ml con metanol.
- ✓ Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5–10 °C. para su posterior uso.

Solución madre acetaminofén (estándar interno)

- ✓ Pesar 1 mg de acetaminofén
- ✓ Verter en un tubo de ensayo y disolver en 2 ml de metanol
- ✓ Agitar en vórtex durante 60 segundos.
- ✓ Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C. para su posterior uso.

3. Preparación de muestras a diferentes concentraciones, para lo cual se deberán rotular los tubos con el nombre del estándar o la concentración respectiva; según corresponda y agregar a cada tubo las cantidades correspondientes:

-[blanco]: esta muestra se prepara el mismo día que se realizaran las inyecciones en el equipo HPLC. 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agite en vórtex 60 segundos.

-[estándar de cefotaxima]: 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 2) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl)

-[estándar de acetaminofén]: 250 µl solución madre de acetaminofén (paso 2) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl)

-[100 µg/ml]: 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 2) y agitar en vórtex 60 segundos

-[50 µg/ml]: 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 2) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-[25 µg/ml]: 250 µl del tubo 50 µg/ml + 250 µl de metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-[12.5 µg/ml]: 250 µl del tubo 25 µg/ml + 250 µl de metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-[6.25 µg/ml]: 250 µl del tubo 12.5 µg/ml+250 µl metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-[3.12 µg/ml]: 250 µl del tubo 6.25 µg/ml+250 µl metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-[1.56 µg/ml]: 250 µl del tubo 3.12 µg/ml+250 µl metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-[0.78 µg/ml]: 250 µl del tubo 1.56 µg/ml+250 µl metanol / agitar en vórtex 60 seg. (Desechar 250 µl para mantener volumen)

-Agregar 25 µl de la solución madre de acetaminofén (12.5 µg/ml) a los tubos de diferentes concentraciones, excepto a los estándares y al blanco; agitar nuevamente en vórtex por 60 segundos.

-Colocar a todos los tubos tapones de papel aluminio perforados, dejar evaporar el metanol 24 hr

Equilibrio del sistema: fase móvil/fase estacionaria.

Para garantizar la correcta resolución cromatografica, se deberá llevar a cabo siempre el equilibrado del equipo un día antes del día en que se programen las inyecciones de las muestras, para ello seguir las siguientes indicaciones:

-Con la fase móvil desgasificada (punto 1) se pone a circular en el sistema (columna) a un flujo de 0.5 ml/min durante 12 horas, temperatura del controlador 40 °C.

-trascorridas las 12 horas, se continua la circulación de la fase móvil cambiando el flujo a 1.2 ml/min, durante 1 hora y temperatura del controlador 40 °C.

-cuando finalice la hora indicada se procede a programar el equipo para corridas de 10 minutos, flujo 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C, por lo que se deberá correr la línea base antes de cualquier inyección

-si la línea base no presenta fluctuaciones (el equilibrado del equipo está listo) se pueden inyectar individualmente cada una de las muestras preparadas.

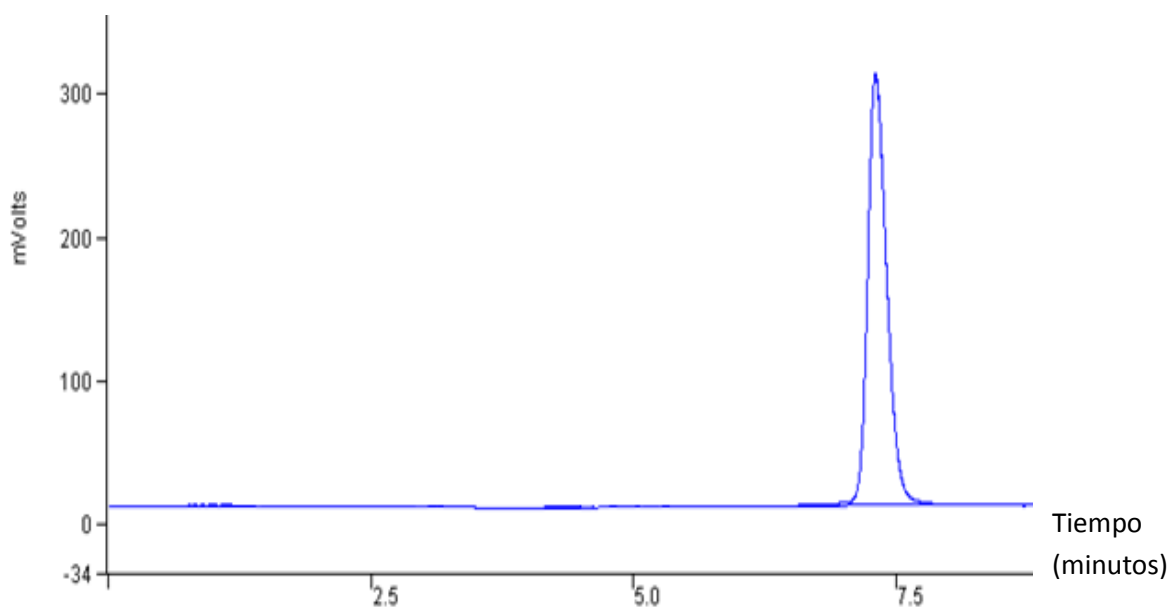
Resolución cromatográfica.

4. Preparar muestra estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 3
5. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando 250 µl de fase móvil (ver paso 1) a los 3 tubos y agitar en vórtex por 60 segundos. Las muestras están listas para ser inyectadas

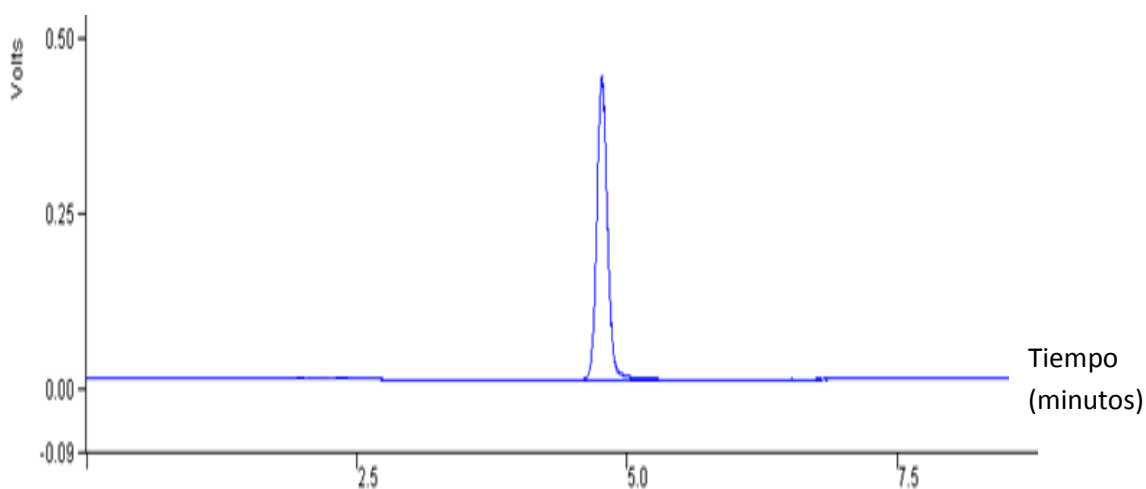
6. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

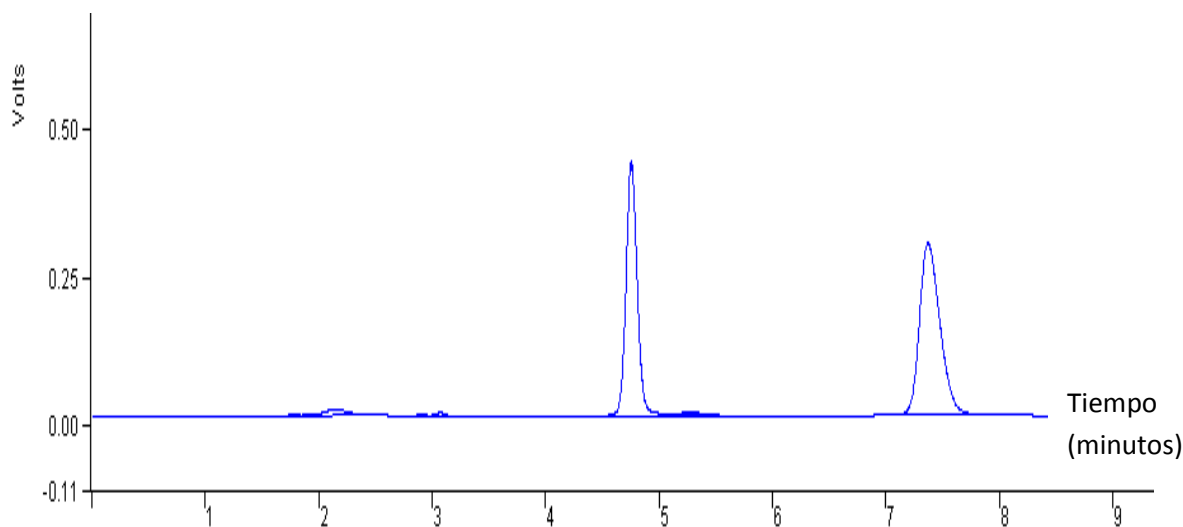
Las primeras dos inyecciones se realizaron con el fin de poder identificar el tiempo de retención de cada fármaco; así para cefotaxima su $T_R = 7.3017$ minutos y para acetaminofén su $T_R = 4.7620$ minutos. La última corrida debería demostrar que ambos tiempos de retención no interfirieran uno con respecto del otro y asegurar la correcta diferenciación y selectividad para cada uno. ($T_{R\text{cefotaxima}} = 7.3680$ minuto; $T_{R\text{acetaminofén}} = 4.7517$ minutos).



En la **figura 1** se presenta el fármaco de interés (Cefotaxima) a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ preparado de una solución madre empleando un estándar primario y reconstituyendo la muestra en fase móvil, este cromatograma se realizó para poder identificar el tiempo de retención (T_R) de Cefotaxima obteniendo así $T_{R\text{cefotaxima}} = 7.3017$ minutos, a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.



En la **figura 2** se presenta el estándar interno (Acetaminofén) a una concentración de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ preparado de una solución madre empleando un estándar primario y reconstituyendo la muestra en fase móvil, este cromatograma se realizó para poder identificar el tiempo de retención (T_R) de acetaminofén obteniendo así $T_{\text{Racetaminofén}} = 4.7620$ minutos, a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.



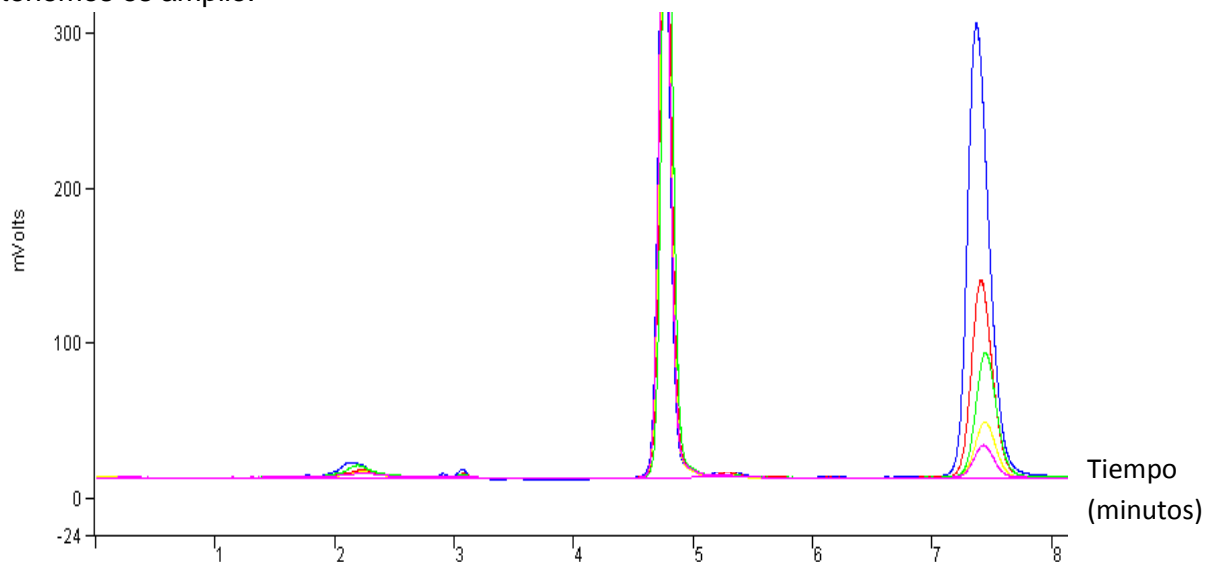
En la **figura 3** se presenta a Cefotaxima y Acetaminofén a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Ambos preparados de soluciones madre empleando estándares primarios y reconstituyendo la muestra en fase móvil, este cromatograma se realizó para demostrar la correcta separación de ambos fármacos presentes en una misma muestra y con ello asegurar la selectividad del mismo al observar que ambos tiempos de retención (T_R) no intervenían uno con respecto del otro, obteniendo así $T_{\text{Rcefotaxima}} = 7.3680$ minutos; $T_{\text{Racetaminofén}} = 4.7517$ minutos a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.

Determinación del intervalo de concentraciones sembrado en matriz ideal (fase móvil).

7. Preparar estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén, 100 µg/ml, 25 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.125 µg/ml y 0.78 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 3
8. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando 250 µl de fase móvil (ver paso 1) a los 7 últimos tubos y agitar en vórtex por 60 segundos. Las muestras están listas para ser inyectadas
9. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

Cabe mencionar que los estándares se inyectan para identificar el tiempo de resolución de ambos fármacos. Sin embargo; no se incluyen sus cromatogramas por cuestiones de exceso de Repetibilidad. Ahora bien en la **figura 4** podemos observar las 5 muestras donde el T_R del estándar interno ($T_{R\text{aprox}}=4.7$ minutos) no interfiere en el T_R de Cefotaxima ($T_{R\text{aprox}}=7.3$ minutos). Pudiéndose observar los cambios en la respuesta dependientes de la variación de las concentraciones de Cefotaxima, además todas son perceptibles por el equipo, incluso la concentración mínima (0.78 µg/ml) es perfectamente identificada mostrando un pico pequeño pero definible, lo cual indica que el intervalo de trabajo que tenemos es amplio.



En la **figura 4** se presenta las corridas de 5 muestras, conteniendo Acetaminofén ($T_{R\text{aprox}}= 4.7$ minutos) a una concentración fija de 12.5 µg/ml y Cefotaxima ($T_{R\text{aprox}}= 7.3$ minutos) a diferentes concentraciones 100 µg/ml (pico azul), 25 µg/ml (pico rojo), 6.25 µg/ml (pico verde), 3.25 µg/ml (pico amarillo), 0.78 µg/ml (pico fiusha) a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.

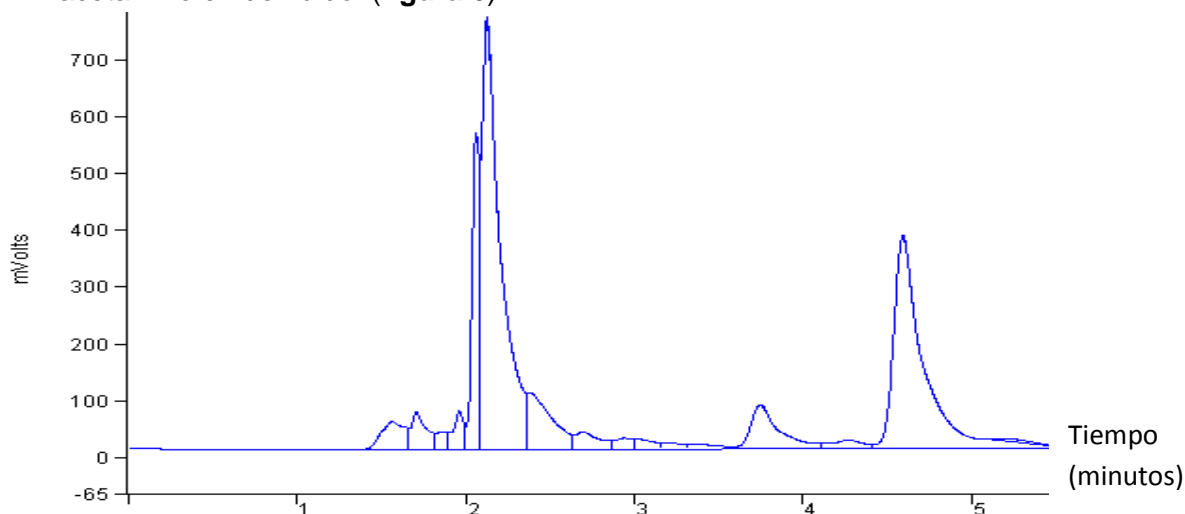
Determinación de presencia de interferencias en la matriz biológica (orina).

10. La determinación de interferencias en la orina es importante porque nos determina hasta qué punto estas afectan nuestro intervalo de trabajo, por lo cual se prepara muestra banco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 3
11. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 1.
12. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

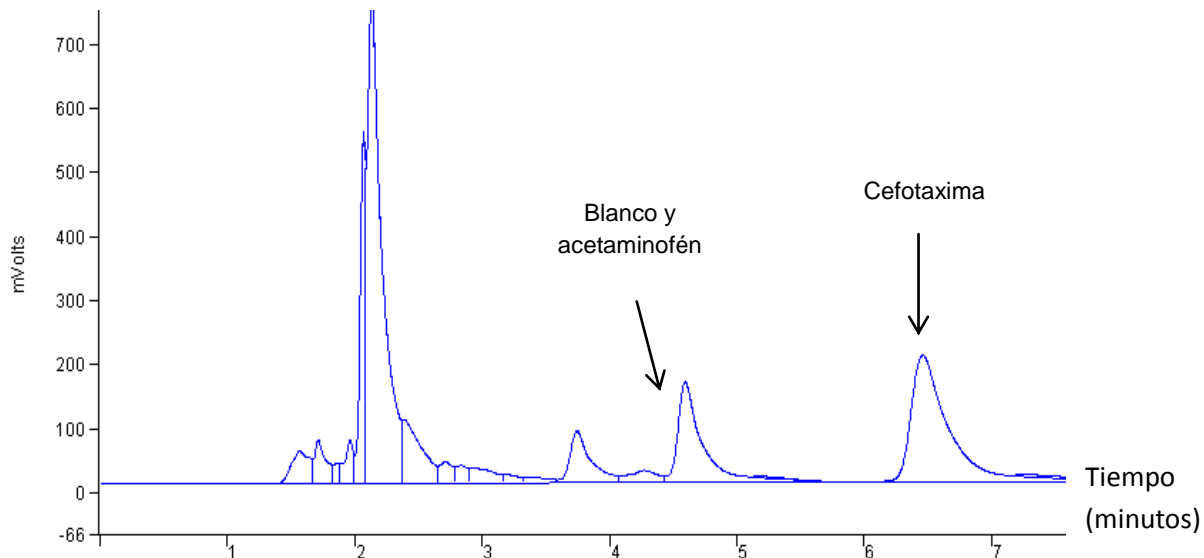
Resultados.

Primero se mencionara que los estándares tanto de cefotaxima como de acetaminofén son inyectados para poder identificarlos de manera individual y de ese modo podamos perfectamente diferenciarlos. Sin embargo, se decidió omitir sus cromatogramas.

Se inyectó la muestra de orina pura diluida en fase móvil (1:15) el cual funciona como **blanco**; así en la **figura 5** veremos que el ruido se prolonga y abarca hasta tiempos de retención de $T_{R\text{blanco}}=4.6917$ lo cual afectaría los resultados de acetaminofén. Por ello para verificar el problema existente se inyecta la muestra de 50 µg/ml (Cefotaxima 50 µg/ml y acetaminofén 12.5 µg/ml). Esta muestra fue reconstituida en la matriz biológica (orina) para poder observar cómo se comportaban las diferentes concentraciones en la matriz biológica y así poder verificar que no tuviera contaminantes que interfirieran con los tiempos de retención de ambos fármacos. Sin embargo se presentó el problema ya observado que los picos del ruido y de acetaminofén eran muy próximos hasta el punto que no permite distinguir a acetaminofén del ruido (**figura 6**).



En la **figura 5** se presenta el blanco diluido (1 ml de orina + 15 ml de fase móvil) para poder identificar el tiempo de retención (T_R) que abarca el ruido presente en la propia matriz biológica obteniendo así $T_{R\text{blanco}} = 4.6917$ minutos a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.



En la **figura 6** se presenta a Cefotaxima ($T_{R\text{cefotaxima}} = 6.4567$ minutos) y Acetaminofén ($T_{R\text{acetaminofén}} =$ no determinado) a concentraciones de $50 \mu\text{g/ml}$ y $12.5 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. Ambos preparados de soluciones madre empleando estándares primarios y reconstituyendo la muestra en matriz biológica (orina) a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.

Modificación de la fase móvil.

Como podemos observar en la parte superior se presentan problemas ocasionados por las interferencias presentes en la matriz biológica (orina) lo que nos lleva a modificar la fase móvil para disminuir el ruido en el cromatograma. Durante este proceso se modifica 3 veces la fase móvil de la siguiente forma:

13. **CAMBIO 1:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 1; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las nuevas proporciones:
 - a) Buffer de fosfato de sodio monobásico: 81%=810 ml
 - b) Metanol grado HPLC: 19% = 190 ml
 - c) cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de $5 - 10^\circ\text{C}$. para su posterior uso.

14. proceder a preparar muestra estándar de cefotaxima y estándar de acetaminofén reconstituido con fase móvil
15. preparar muestra banco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén y 50 µg/ml reconstituido con orina diluida, para ello seguir las indicaciones del paso 3
16. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos del paso 15, 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. ***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (punto 13: cambio 1)
17. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

Para disminuir el ruido presente en la matriz biológica se modificó la fase móvil aumentando el porcentaje de metanol de 9 % a 19%. Se realizan las corridas y en todas nos encontramos un aumento excesivo de presión (>4500 psi) por lo cual rebaza el límite soportado por el equipo y la corrida se suspende de manera automática a los 5 minutos.

18. **CAMBIO 2:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 1; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las nuevas proporciones:
 - a) Buffer de fosfato de sodio monobásico: 80% = 800 ml
 - b) Metanol grado HPLC: 18% = 180 ml
 - c) Acetonitrilo grado HPLC: 2% = 20 ml
 - d) cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C. para su posterior uso.
19. proceder a preparar muestra estándar de cefotaxima y estándar de acetaminofén reconstituido con fase móvil y preparar la muestra banco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén y 50 µg/ml en matriz biológica; para ello seguir las indicaciones del paso 3
20. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos del punto 20, 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. ***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (punto 18: cambio 2)
21. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

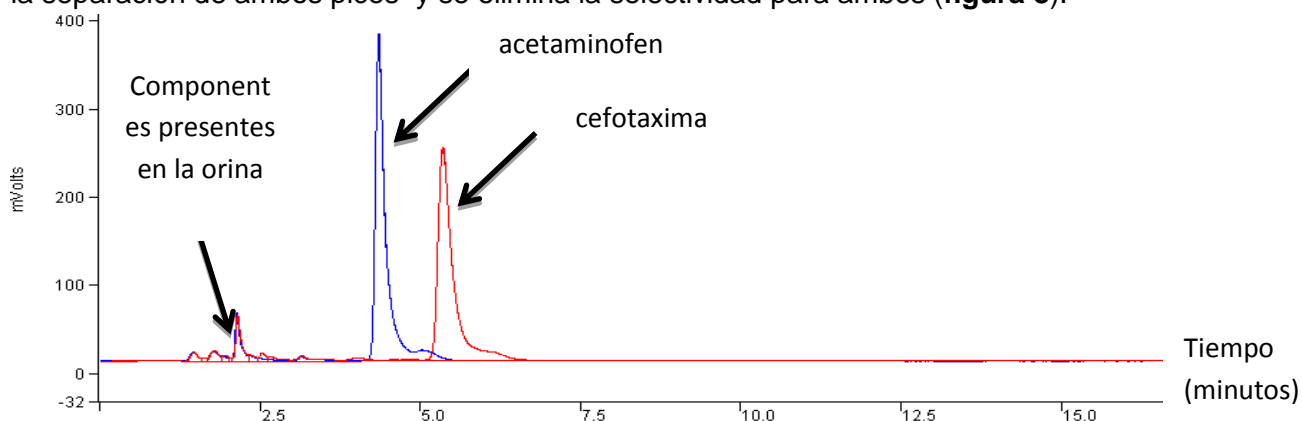
Nuevamente se procede a modificar la fase móvil al agregar acetonitrilo con el cual se espera que la presión disminuya, ahora la fase móvil está constituida por: buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo 80:18:2 y el flujo se modifica a 1 ml/min. Se realiza la

corrida del blanco, los dos estándares y la muestra de 50 µg/ml (cefotaxima 50 µg/ml y acetaminofén 25 µg/ml) ahora el problema disminuye, es decir; el tiempo de retención del blanco disminuye pero la presión se encuentra en el límite (≥ 4150 psi).

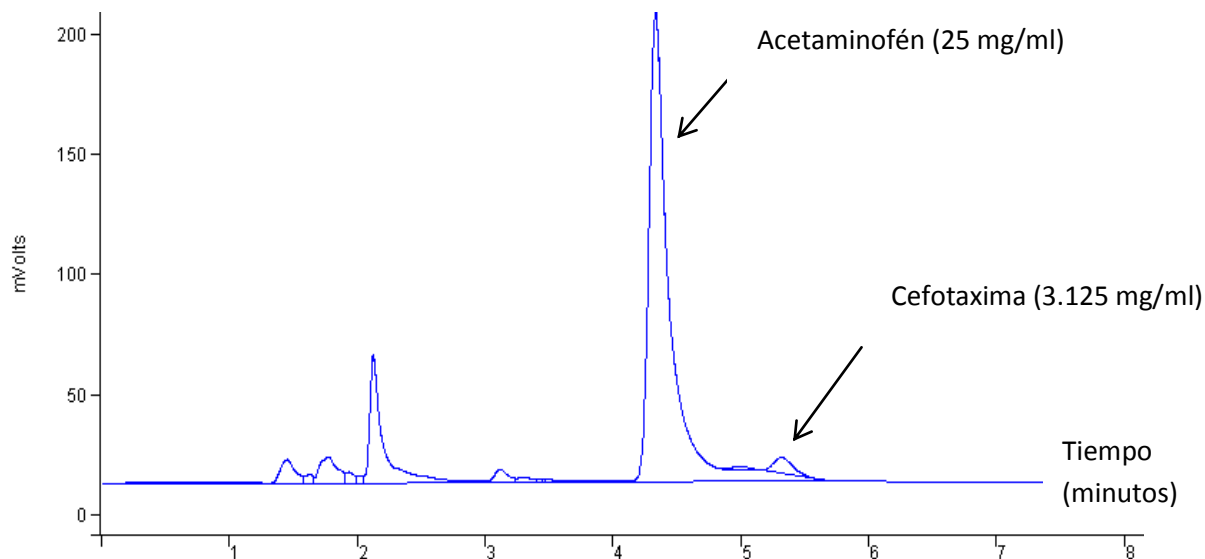
22. **CAMBIO 3:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 1; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las nuevas proporciones:
- Buffer de fosfato de sodio monobásico: 80%=800 ml
 - Metanol grado HPLC: 17% = 170 ml
 - Acetonitrilo grado HPLC: 3% = 30 ml
 - Cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en ultrasonido, por 20 minutos Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C. para su posterior uso.
23. proceder a preparar la muestra estándar de cefotaxima y estándar de acetaminofén reconstituido con fase móvil.
24. Preparar muestra banco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén, 12.5 µg/ml y 3.125 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 3
25. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 4 últimos tubos del punto 24, 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. ***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (punto 22: cambio 3)
26. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente del punto 23 en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 50 °C

Resultados.

Las muestras representativas (12.5 µg/ml y 3.125 µg/ml) se inyectan y la disminución del ruido se logra; más sin embargo el T_R de Cefotaxima disminuye ($T_{R\text{cefotaxima}}=5.3443$ minutos) considerablemente hasta el punto en que se “pega” al pico de acetaminofén ($T_{R\text{acetaminofen}}=4.3450$ minutos), en la concentración más alta el problema no pareciera significativo (**figura 7**), pero en la concentración de 3.125 µg/ml ya no es posible observar la separación de ambos picos y se elimina la selectividad para ambos (**figura 8**).



En la **figura 7** se presenta a Cefotaxima ($T_{R_{\text{cefotaxima}}}=5.3443$ minutos) y Acetaminofén ($T_{R_{\text{acetaminofen}}}=4.3450$ minutos) a concentraciones de $12.5 \mu\text{g/ml}$. Ambos preparados de soluciones madre empleando estándares primarios y reconstituyendo la muestra en matriz biológica (orina), en el cromatograma podemos observar que el ruido de la orina se ha disminuido, pero también los picos de ambos fármacos se encuentran muy próximos a una temperatura de 50°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de 1.0 ml/min .



En la **figura 8** se presenta a Cefotaxima y Acetaminofén a concentraciones de $3.125 \mu\text{g/ml}$ y $12.5 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. Ambos preparados de soluciones madre empleando estándares primarios y reconstituyendo la muestra en matriz biológica (orina), en el cromatograma podemos observar que el tiempo en que se presentaba el ruido se disminuyó, al igual que ambos picos de los fármacos se encuentran muy próximos, tanto que no es posible determinarlos individualmente a una temperatura de 50°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de 1.0 ml/min .

Disminución de las interferencias presentes en orina

Como podemos observar en la parte superior al modificar el porcentaje de metanol y acetonitrilo (cambio 3) se logra disminuir la presión del sistema y el ruido de la matriz biológica se presenta en menor tiempo. Sin embargo; el problema al que ahora nos enfrentamos es el hecho de que se ven modificados los tiempos de retención de cefotaxima y acetaminofén hasta el punto en que se encuentran demasiado juntos uno con respecto del otro. Por ello se decide retomar la fase móvil inicial (buffer 91%: metanol 9%) e intentar disminuir el ruido por otros métodos. Las pruebas experimentales realizadas son las siguientes:

PRUEBA 1: uso de un sistema de extracción fase sólida (cartuchos)

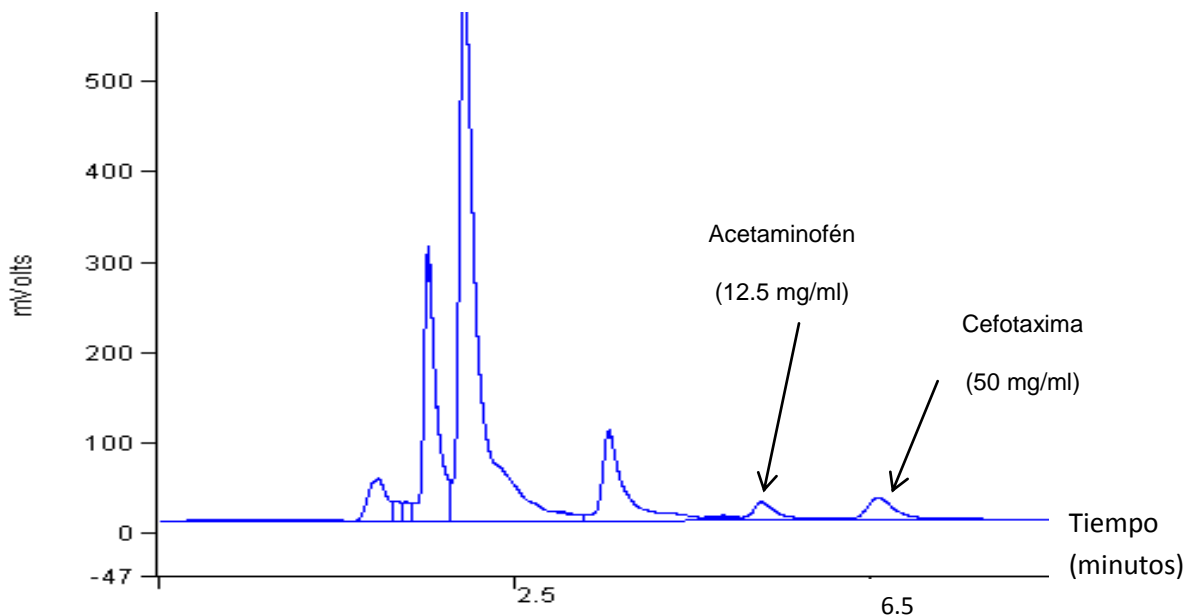
Equilibrado del sistema de extracción fase sólida

- circular por los cartuchos 2 ml de metanol grado HPLC
 - circular por los cartuchos 2 ml de acetonitrilo grado HPLC
 - circular por los cartuchos 2 ml de agua grado HPLC
27. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén, 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 3
28. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 1.
29. Rotular 4 tubos con números consecutivos del 1 al 4 y seguir las siguientes instrucciones:
- Hacer pasar la muestra ya reconstituida del tubo “blanco” por los cartuchos y depositarla en el tubo 1
 - Hacer pasar la muestra ya reconstituida del tubo “estándar de acetaminofén” por los cartuchos y depositarla en el tubo 2
 - Hacer pasar la muestra ya reconstituida del tubo “estándar de cefotaxima” por los cartuchos y depositarla en el tubo 3
 - Hacer pasar la muestra “50 µg/ml” por los cartuchos y depositarla en el tubo 4
30. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente del punto 29 en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

Debido a que en un principio se observaba perfectamente la separación de Cefotaxima y acetaminofén, se intenta retomar nuevamente la fase móvil que se manejó desde el principio e intentar disminuir el ruido por otro método que no fuera la modificación de la fase móvil.

De tal modo que al hacer pasar las muestras por el sistema de extracción fase solida donde la orina lleva sembrado a Cefotaxima (50 µg/ml) y Acetaminofén (12.5 µg/ml) para verificar que tal sistema al usarlo no retenga los fármacos. Sin embargo al realizar tal prueba veremos que el ruido no disminuye considerablemente y la mayor parte de ambos fármacos es retenido en los cartuchos (**figura 9**).



En la **figura 9** se presenta la corrida de una muestra de Cefotaxima (50 $\mu\text{g/ml}$) y acetaminofén (12.5 $\mu\text{g/ml}$). En el cromatograma podemos observar que ambos picos son pequeños, es decir; se retienen ambos fármacos al hacerlo pasar por la pre-columna a una temperatura de 40°C y fase móvil en proporciones 91:9 (buffer de sodio monobásico: metanol) a un flujo de 1.2ml/min.

31. PRUEBA 2: Modificación del pH de la orina.

- Se prepara 1 litro de fase móvil con las proporciones iniciales (consulte el paso 1)
- Rotular 3 vasos de precipitado (50 ml) con las leyendas: pH=1, pH=7, pH=9 respectivamente.
- En cada uno de los 3 vasos agregar 1 ml de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1)+ 15 ml de la fase móvil inicial (punto 1)
- Someter agitación constante los 3 vasos en una parrilla de agitación con una bala magnética.
- Ir midiendo el pH de cada vaso (manteniendo la agitación) y al mismo tiempo modificar tal pH hasta que este sea igual al pH rotulado en cada vaso, para ello se deberá medir este factor con el pH-metro. (antes de medir se debe calibrar el pH-metro, consulte el anexo 1)
- El pH de cada solución se acondiciona agregando pequeñas cantidades de NaOH (0.5 N) o H₃PO₄ (1 N) Según sea el caso
- Cuando cada fase móvil contenida en los vasos ya tenga el pH necesario, se retira de la agitación y se resguarda para su posterior uso.

32. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de acetaminofén, 50 µg/ml, cada una de ellas se deberá hacer por triplicado. Para ello seguir las indicaciones del paso 3
33. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando al estándar de Cefotaxima, estándar de acetaminofen y 50 µg/ml; 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 1.
34. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente del punto 32 en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados.

Recordemos que aunque se inyecta el blanco y los dos estándares; los resultados se usan para poder identificarlos y ninguno se incluye para no tener una Repetibilidad innecesaria. Por lo cual; la muestra que se toma como representativa es la que contiene ambos fármacos, es decir; 50 µg/ml y sus resultados son los que se mencionan a continuación:

-pH= 1 (ácido): el ruido se prolonga hasta tiempos de retención de 5.7532 minutos, por lo cual continuaría combinándose el tiempo de retención del ruido y del acetaminofén

-pH= 7 (neutro): el ruido se prolonga hasta un tiempo de retención de 7.8073 minutos lo cual no solo nos afectaría a acetaminofén sino que también afectaría a nuestro fármaco de interés Cefotaxima.

-pH=9 (básico): el ruido se prolonga hasta un tiempo de retención de 7.8110 minutos lo cual no solo nos afectaría a acetaminofén sino que también afectaría a nuestro fármaco de interés Cefotaxima.

35. PRUEBA 3: agregación de solventes a la orina:

- Se rotulan 5 tubos de ensayo con números consecutivos del 1 al 5
- Agregar a cada tubo las cantidades siguientes:
 - ✓ tubo 1: 2 ml de orina + 1 ml de éter
 - ✓ tubo 2: 2 ml de orina + 1 ml de cloruro de metileno
 - ✓ tubo 3: 2 ml de orina + 1 ml de butanol
 - ✓ tubo 4: 2 ml de orina + 1 ml de hexano
 - ✓ tubo 5: 2 ml de orina + 1 ml de cloroformo
- Posteriormente se someten a agitación los 5 tubos en la centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos
- se logra la separación de fases y se extrae el solvente quedando solo la fase acuosa que es la que se inyecta en el equipo; para poder observar el tiempo en el que se presenta el ruido de la orina
- Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las 5 muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.2 ml/ min y temperatura del controlador a 40 °C

Resultados

Los resultados para el caso de los primeros 3 tubos el tiempo de retención del ruido supera los 5 minutos y para los últimos 2 tubos (tubo 4 y 5) se logra desplazar el tiempo de retención hasta 4.3687 minutos apenas unos segundos alejados del tiempo de retención del acetaminofén. Se observa que el uso de alguno de estos solventes es inadecuado para desplazar el ruido, pues su tiempo de retención de la matriz biológica no se logra disminuir y continua cercano al tiempo de acetaminofén.

Modificación del estándar interno

Debido a que no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las 3 pruebas usadas para disminuir la señal del ruido de la orina. Se decide cambiar el estándar interno, buscando algún fármaco cuyo tiempo de retención se aleje del tiempo en el que surge dicho ruido y del tiempo de retención de Cefotaxima, el procedimiento experimental es el siguiente:

36. retomar la fase móvil donde se disminuyó la presión y el ruido, preparando 1 litro de esta: buffer de sodio monobásico/metanol/Acetonitrilo 80:17:3. (consultar el punto 22-cambio 3).
37. preparar las soluciones madre de cada fármaco a probar como estándar interno, para ello preparar dichas soluciones como sigue:

Tubo	Contenido	Agitación (tiempo):
A	1 mg de Dexametazona + 2 ml de metanol	60 segundos
B	1 mg de Prednisona + 2 ml de metanol	60 segundos
C	1 mg de Fenilefrina + 2 ml de metanol	60 segundos
D	1 mg de Indometacina + 2 ml de metanol	60 segundos
E	1 mg de Cefuroxima sódica + 2 ml de metanol	60 segundos
F	1 mg de Ceftriaxona + 2 ml de metanol	60 segundos
g	1 mg de Dipirona + 2 ml de metanol	60 segundos

38. preparar las muestras en la matriz biológica (orina) como sigue:

- ✓ -Rotular 8 tubos con números consecutivos del 1 al 8.
- ✓ -Medir 4 ml de metanol (medio de dilución) y colocarlo en un tubo de ensayo rotulado con el nombre de metanol.
- ✓ -Agregar a cada tubo las cantidades correspondientes como sigue:
 - Tubo 1 blanco: seguir los pasos del punto 3
 - Tubo 2 [estándar de Dexametazona]: 250 µl del tubo A + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)
 - Tubo 3 [estándar de Prednisona]: 250 µl del tubo B + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)
 - Tubo 4 [estándar de Fenilefrina]: 250 µl del tubo C + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-Tubo 5 [estándar de Indometacina]: 250 µl del tubo D + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-Tubo 6 [estándar de Cefuroxima sódica]: 250 µl del tubo E+ 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-Tubo 7 [estándar de ceftriaxona]: 250 µl del tubo F + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

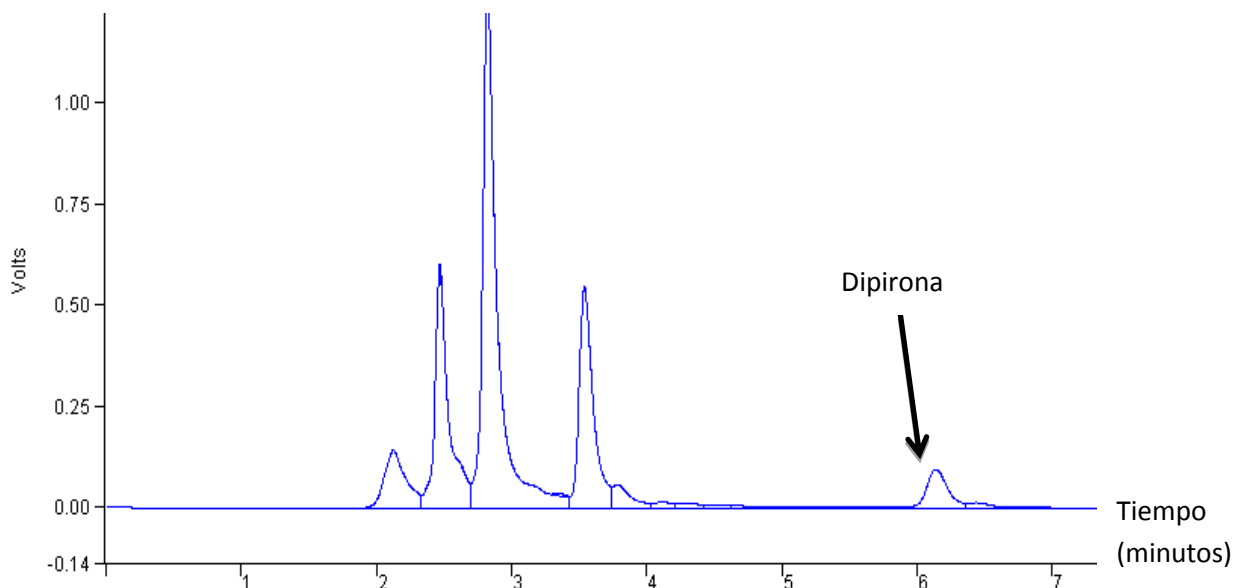
-Tubo 8 [estándar de dipirona]: 250 µl del tubo G + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

- ✓ Colocar a los tubos tapones de papel aluminio perforados, dejar evaporar el metanol por 24 horas.
- ✓ Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando 250 µl de orina diluida (consultar anexo 2; apartado 2.1) en vórtex por 60 segundos.
***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (paso 22: cambio 3)
- ✓ Nota. Cada uno de los estándares mencionados en la parte superior se deberán preparar en fase móvil también, ya que con ello se podrá identificar a cada uno.

39. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 20 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

Resultados.

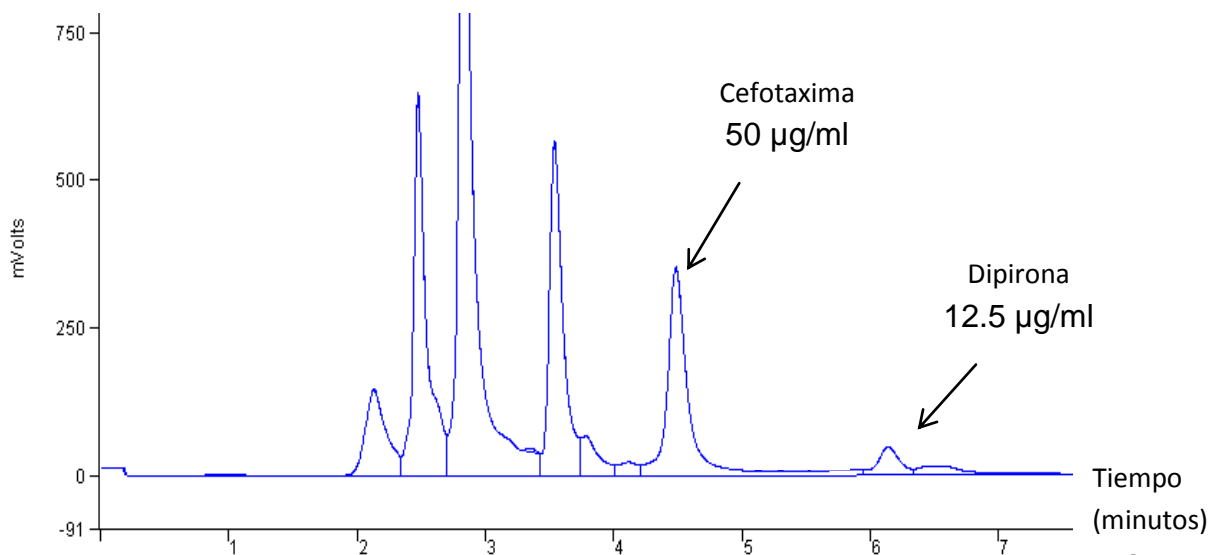
Se usaron las condiciones donde se logró disminuir el ruido de la matriz biológica y conservado una presión aceptable del equipo, es decir; manejaremos una Fase móvil: buffer de sodio monobásico/metanol/Acetonitrilo 80:17:3, Corridas de 20 minutos a un flujo: 1 ml/min, Temperatura: 45 °C con dichas condiciones se probaron cada uno de los fármacos mencionados, obteniendo como resultado que dexametazona, prednisona, fenilefrina e indometacina no se resolvieron en la fase móvil. Mientras que Ceftriaxona presentó $T_R=3.4460$ minutos; veremos que su tiempo se combinara con el tiempo del ruido de la orina y se presentara el mismo problema que con acetaminofén, para el caso de Cefuroxima sódica su $T_R= 4.9807$ minutos y dicho tiempo ahora se encontrara cercano con el T_R de Cefotaxima siendo este un problema mayor. Mientras que para dipirona su $T_R=6.1327$ minutos lo suficientemente alejado del ruido y del fármaco de interés (**figura 10**).



En la **figura 10** se presenta a dipirona a concentraciones de 62.5 $\mu\text{g/ml}$. Dicha muestra fue preparada de una solución madre empleando estándar primario y reconstituyendo la muestra en matriz biológica (orina), con un $T_{R\text{dipirona}}=6.1327$ minutos a una temperatura de 45°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de 1.0 ml/min.

De este modo se determinó que el nuevo estándar interno que se usaría sería dipirona, por lo cual se prepara una muestra de **[50 $\mu\text{g/ml}$]**: 250 μl solución madre de cefotaxima (paso 2) + 250 μl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos y desechar 250 μl para mantener volumen constante. Agregar 25 μl de la solución madre de dipirona (12.5 $\mu\text{g/ml}$) y agitar nuevamente en vórtex por 60 segundos.

Al inyectar la muestra veremos en la **figura 11** existe una diferencia considerable entre el Tiempo de retención de dipirona ($T_{R\text{dipirona}}=6.1531$ minutos) y de Cefotaxima ($T_{R\text{cefotaxima}}=4.4813$ minutos), es decir; estos podrán separarse adecuadamente cuando se encuentren ambos en la muestra biológica y serán perfectamente cuantificados de manera individual.



En la **figura 11** se presenta a Cefotaxima ($T_{R\text{cefotaxima}}=4.4813$ minutos) y dipirona ($T_{R\text{dipirona}}=6.1531$ minutos) a concentraciones de $50\ \mu\text{g/ml}$ y $12.5\ \mu\text{g/ml}$ respectivamente. En el cromatograma podemos observar que ambos picos se encuentran adecuadamente alejados, por lo cual se corrobora que se puede usar dipirona como estándar interno y que este no interferirá en la correcta cuantificación de Cefotaxima a una temperatura de 45°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de $1.0\ \text{ml/min}$.

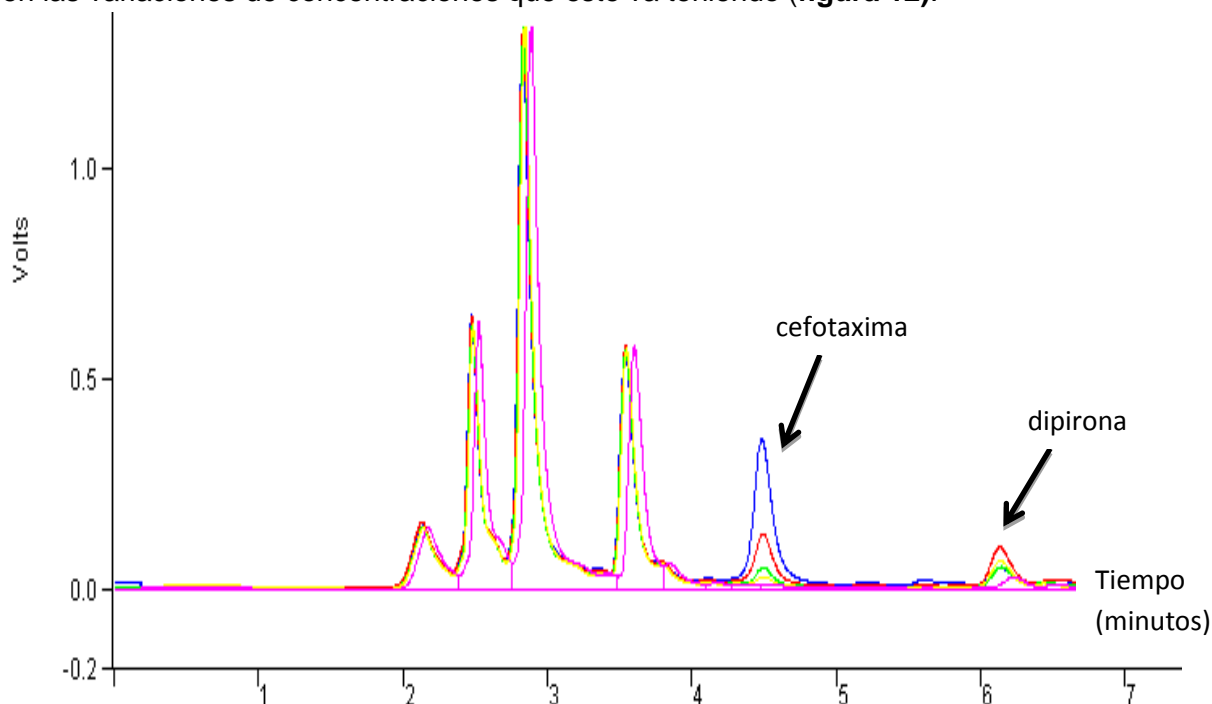
Determinación del intervalo de concentraciones sembrando en matriz biológica (orina).

40. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de dipirona, $100\ \mu\text{g/ml}$, $25\ \mu\text{g/ml}$, $6.25\ \mu\text{g/ml}$, $3.125\ \mu\text{g/ml}$ y $0.78\ \mu\text{g/ml}$. Solo en el caso del estándar de dipirona se deberá seguir el paso 38 en los demás seguir las indicaciones del paso 3 NOTA: recordar que se ha sustituido el estándar de acetaminofén por el estándar de dipirona y al agregar los $25\ \mu\text{l}$ de estándar interno este deberá ser la dipirona.
41. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 4 últimos tubos $250\ \mu\text{l}$ de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. ***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (punto 22: cambio 3)
42. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente del punto 40 en corridas de 10 minutos, flujo de $1.0\ \text{ml/min}$ y temperatura del controlador a 45°C

Resultados

En la figura 12 veremos que al inyectar diferentes muestras donde la concentración de dipirona permanece estable ($12.5\ \mu\text{g/ml}$) y variaciones en las concentraciones de Cefotaxima ($100\ \mu\text{g/ml}$, $25\ \mu\text{g/ml}$, $6.25\ \mu\text{g/ml}$, $3.25\ \mu\text{g/ml}$, $0.78\ \mu\text{g/ml}$), el pico de dipirona

es demasiado pequeño y no puede compararse adecuadamente con el fármaco de interés en las variaciones de concentraciones que este va teniendo (**figura 12**).



En la **figura 12** se presenta las corridas de 5 muestras, conteniendo dipirona ($T_{R_{aprox}} = 6.13$ minutos) a una concentración fija de $12.5 \mu\text{g/ml}$ y Cefotaxima ($T_{R_{aprox}} = 4.48$ minutos) a diferentes concentraciones $100 \mu\text{g/ml}$ (pico azul), $25 \mu\text{g/ml}$ (pico rojo), $6.25 \mu\text{g/ml}$ (pico verde), $3.25 \mu\text{g/ml}$ (pico amarillo), $0.78 \mu\text{g/ml}$ (pico fiusha). Como podemos observar en las 5 muestras el pico del estándar interno (dipirona) es demasiado pequeño y no puede compararse adecuadamente con Cefotaxima en las variaciones de concentración que este va teniendo a una temperatura de 45°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de 1.0 ml/min .

Determinación de la concentración del estándar interno (dipirona).

43. Preparar la solución madre de dipirona como sigue:

- Pesar 2 mg de dipirona
- Verter en un tubo de ensayo y disolver en 2 ml de metanol
- Agitar en vórtex
- resguardar para su posterior uso

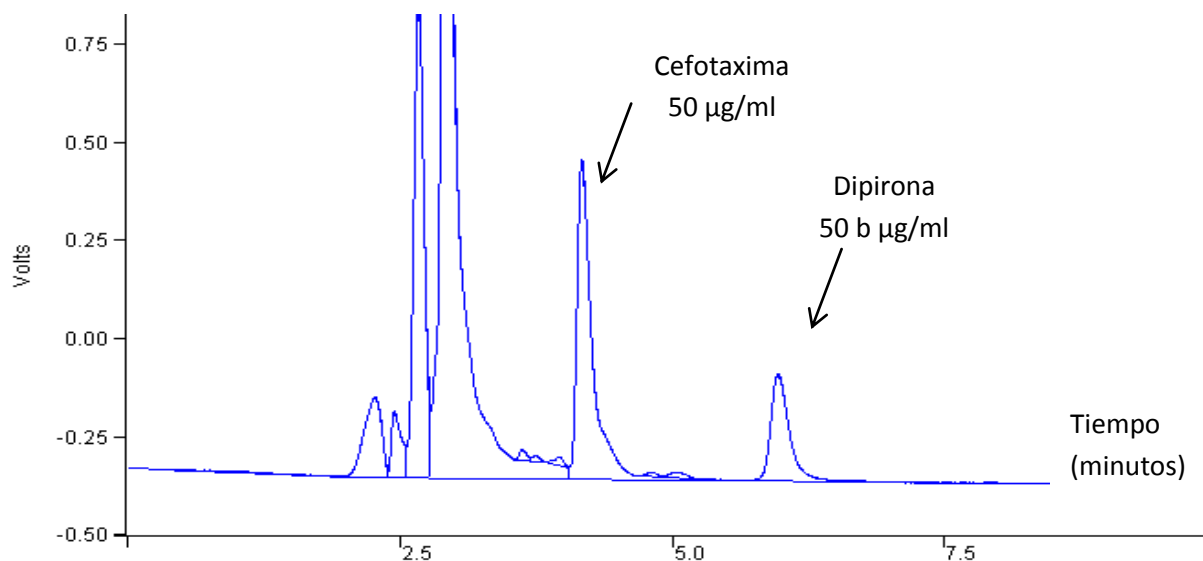
44. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, $50 \mu\text{g/ml}$. Para ello seguir las indicaciones del paso 3 NOTA: al agregar los $50 \mu\text{l}$ de estándar interno este deberá ser de la solución madre de dipirona del paso 43

45. Preparar estándar de dipirona: $250 \mu\text{l}$ de solución madre de dipirona (paso 43) + $250 \mu\text{l}$ de metanol / agitar en vórtex 60 segundos y desechar $250 \mu\text{l}$ para mantener volumen

46. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2;
47. apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. ***Para la orina diluida deberá realizarse la dilución con la nueva fase móvil (punto 22: cambio 3)
48. Verificar el equilibrado del equipo (punto 4) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

Resultados

Para esta prueba se ha decidido aumentar la concentración del estándar interno a 50 µg/ml y se inyecta tal muestra, observando una mejoría y se establece que en las futuras muestra se maneja una concentración fija de 50 µg/ml (**figura 13**)



En la figura 13 se presenta a dipirona a una concentración de 50 µg/ml. Dicha muestra fue preparada de una solución madre empleando estándar primario y reconstituyendo la muestra en matriz biológica (orina), con un $T_{Rdipirona}=6.1518$ minutos a una temperatura de 45°C y fase móvil en proporciones 80:17:3 (buffer de sodio monobásico/ metanol/ acetonitrilo) a un flujo de 1.0 ml/min.

Ahora bien; en el apartado anterior se realizaron diferentes pruebas para establecer las condiciones adecuadas de trabajo por lo cual las condiciones finales a las que se desarrollara la validación del método son las siguientes:

- Fase móvil: buffer de sodio monobásico/metanol/acetonitrilo 80:17: 3
- Corridas de 10 minutos a un flujo: 1.0 ml/min.
- Temperatura: 45°C

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Preparación de las soluciones.

49. Se prepara 1 litro de fase móvil, por lo cual en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en sus respectivas proporciones:

a)-Buffer de fosfato de sodio monobásico: 80% =800 ml

- Pesar 2.8 gramos de fosfato de sodio monobásico
- Verter en un vaso de precipitado y disolver en 1 litro de agua grado HPLC.
- Agregar una barra magnética y someter a agitación durante 5 minutos.
- Transcurrido este tiempo o bien al observar que el fosfato se encuentre bien disuelto, se procede a medir el pH de la solución (antes de medir se debe calibrar el pH-metro, consulte el anexo 1).
- El pH de la solución deberá ser pH=4.5, de lo contrario se acondiciona agregando pequeñas cantidades de NaOH o H₃PO₄ según sea el caso.
- Finalmente se procede a filtrar el buffer (ver anexo 4).

b)- Metanol grado HPLC: 17 = 170 ml.

b)- Acetonitrilo grado HPLC: 3% = 30 ml.

c)- cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C. para su posterior uso..

50. Preparar la solución madre de cefotaxima y dipirona como sigue:

Solución madre cefotaxima

- Pesar 4 mg de patrón primario de cefotaxima
- Disolver y aforar en un matraz de 10 ml con metanol.
- Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C para su posterior uso.

Solución madre dipirona (estándar interno)

- Pesar 2 mg de patrón primario de dipirona.
- Verter en un tubo de ensayo y disolver en 2 ml de metanol
- Agitar en vórtex durante 60 segundos.
- Y se resguarda en refrigeración a una temperatura de 5 – 10 °C para su posterior uso.

51. Preparación de muestras a diferentes concentraciones, para lo cual se deberán rotular los tubos con el nombre del estándar o la concentración respectiva; según corresponda y agregar a cada tubo las cantidades correspondientes:

-blanco: esta muestra se prepara el mismo día que se realizaran las inyecciones en el equipo HPLC. 250 μ l de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agite en vórtex 60 segundos.

-estándar de cefotaxima: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 50) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 μ l)

-estándar de dipirona: 250 μ l solución madre de dipirona (paso 50) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 μ l)

-100 μ g/ml: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 50) y agitar en vórtex 60 segundos

-50 μ g/ml: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 50) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-25 μ g/ml: 250 μ l del tubo 50 μ g/ml + 250 μ l de metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-12.5 μ g/ml: 250 μ l del tubo 25 μ g/ml + 250 μ l de metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-6.25 μ g/ml: 250 μ l del tubo 12.5 μ g/ml + 250 μ l metanol/agitar en vórtex 60 seg.

-3.12 μ g/ml: 250 μ l del tubo 6.25 μ g/ml + 250 μ l metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-1.56 μ g/ml: 250 μ l del tubo 3.12 μ g/ml + 250 μ l metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-0.78 μ g/ml: 250 μ l del tubo 1.56 μ g/ml + 250 μ l metanol / agitar en vórtex 60 seg. (Desechar 250 μ l para mantener volumen)

-Agregar 50 μ l de la solución madre de dipirona (50 μ g/ml) a los tubos de diferentes concentraciones, excepto a los estándares y al blanco; agitar nuevamente en vórtex por 60 segundos.

-Colocar a todos los tubos tapones de papel aluminio perforados, dejar evaporar el metanol 24 hr

Equilibrio del sistema: fase móvil/fase estacionaria.

52. para garantizar la correcta resolución cromatográfica, se deberá llevar a cabo siempre el equilibrado del equipo un día antes del día en que se programen las inyecciones de las muestras, para ello seguir las siguientes indicaciones:

-Con la fase móvil des gasificada (punto 49) se pone a circular en el sistema (columna) a un flujo de 0.5 ml/min durante 12 horas, temperatura del controlador 40 °C.

-trascorridas las 12 horas, se continua la circulación de la fase móvil cambiando el flujo a 1.0 ml/min, durante 1 hora y temperatura del controlador 45 °C.

-cuando finalice la hora indicada se procede a programar el equipo para corridas de 10 minutos, flujo 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C, por lo que se deberá correr la línea base antes de cualquier inyección (verificación del equilibrado)

-si la línea base no presenta fluctuaciones se pueden inyectar individualmente cada una de las muestras preparadas.

Determinación de linealidad, intervalo de concentraciones en la curva patrón, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

53. Preparar muestras POR TRIPLICADO del blanco, estándar de cefotaxima, estándar de dipirona, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.12 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
54. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
55. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

Repetitividad

56. **DÍA 1:** Preparar muestras POR TRIPLICADO del blanco, estándar de Cefotaxima, estándar de dipirona, 100 µg/ml, 25 µg/ml, 6.25 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
57. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
58. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C
59. **DÍA 2:** repetir el procedimiento anterior, es decir del paso 56 al 58.

Reproducibilidad

Buscar otro analista (ANALISTA 2) que pueda repetir la parte experimental diseñada en el parámetro de Repetitividad en dos días distintos según las siguientes indicaciones:

60. **DÍA 1:** Preparar muestras POR TRIPLICADO del blanco, estándar de Cefotaxima, estándar de dipirona, 100 µg/ml, 25 µg/ml, 6.25 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
61. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
62. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C
63. **DÍA 2:** repetir el procedimiento anterior, es decir del paso 60 al 62

Robustez

Se determinara al realizar variaciones en las condiciones de trabajo y que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método, dichas condiciones fueron modificadas como sigue:

64. **Cambio de fase móvil 1:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 49; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las siguientes proporciones:
 - a) Buffer de fosfato de sodio monobásico: 81%=810 ml
 - b) Metanol grado HPLC: 17% = 170 ml
 - c) Acetonitrilo grado HPLC: 2% = 20 ml
 - d) cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda para su posterior uso
65. Preparar muestra blanco, estándar de Cefotaxima, estándar de dipirona y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
66. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
67. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

68. **Cambio de fase móvil 2:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 49; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las siguientes proporciones:
 - a) Buffer de fosfato de sodio monobásico: 79%=790 ml
 - b) Metanol grado HPLC: 18% = 180 ml
 - c) Acetonitrilo grado HPLC: 3% = 30 ml
 - d) cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda para su posterior uso
69. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de dipirona y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
70. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
71. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

72. **Cambio de fase móvil 3:** Se prepara 1 litro de fase móvil, donde la preparación del buffer de sodio monobásico no se modifica (consulte punto 49; inciso A), en un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en las siguientes proporciones:
- a) Buffer de fosfato de sodio monobásico: 79%=790 ml
 - b) Metanol grado HPLC: 17% = 170 ml
 - c) Acetonitrilo grado HPLC: 4% = 40 ml
 - d) cuando la fase móvil ya se encuentre lista, se procede a asonicar en el ultrasonido, durante 20 minutos. Y se resguarda para su posterior uso
73. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de dipirona y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
74. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
75. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C

Estabilidad de las muestras.

76. Preparar muestra blanco, estándar de cefotaxima, estándar de dipirona y 50 µg/ml para ello seguir las indicaciones del paso 51
77. Una vez que se ha evaporado todo el metanol, reconstituir agregando a los 3 últimos tubos 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agitar en vórtex por 60 segundos. Ocupando para el pull la fase móvil del punto 49.
78. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras periódicamente durante 3 días consecutivos en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C. durante este periodo se deberán conservar las muestras en refrigeración a 5-10 °C

RESULTADOS

LINEALIDAD

Con el objeto de evaluar la linealidad de la curva, se analizará la relación de las áreas bajo la curva de las soluciones estándar del fármaco y estándar interno (dipirona), ver **tabla 1 y gráfico 1**.

En la tabla 1 se presentan los valores de $Y_{\text{corregida}}$ empleando la relación $Y = \text{ABC}_{\text{cefotaxima}} / \text{ABC}_{\text{dipirona}}$ obtenidos de cada una de las 6 concentraciones por triplicado de los datos de las tres curvas patrón, inyectados por el analista 1

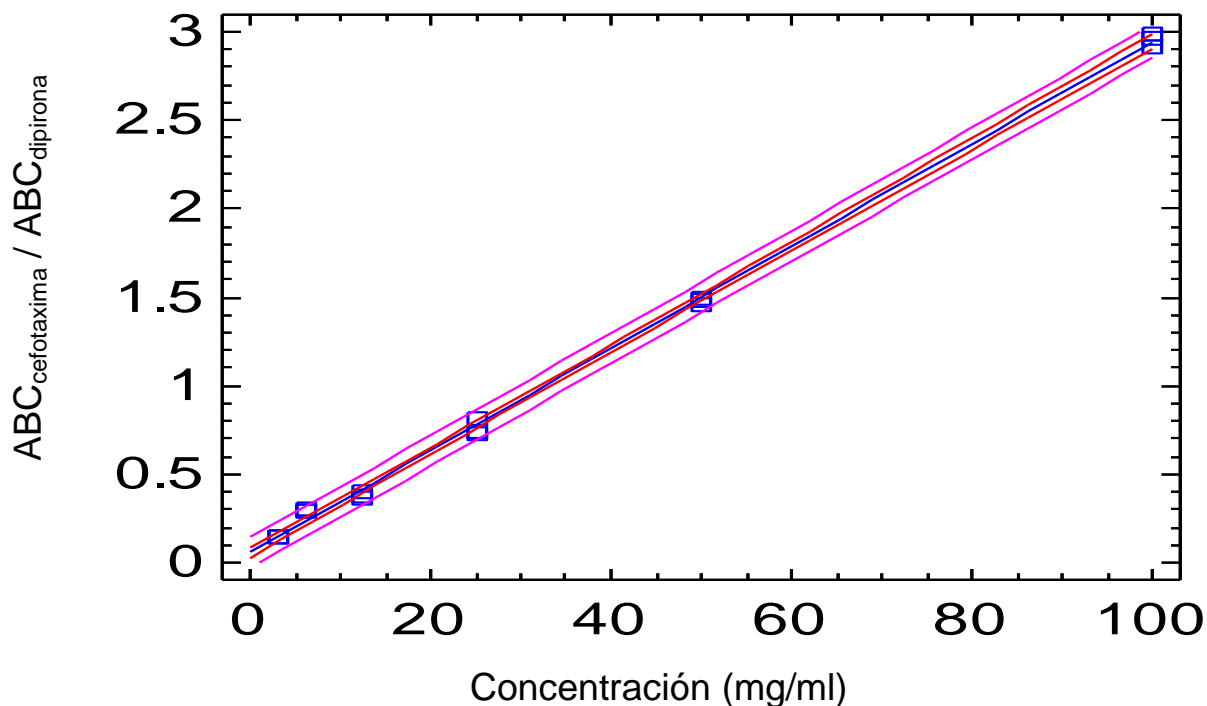
Curva	Concentración (µg / ml)	Y= ABCcefot/ABCdipir
1	3.25	0.1448
2	3.25	0.1526
3	3.25	0.1463
1	6.25	0.2896
2	6.25	0.3051
3	6.25	0.2925
1	12.5	0.3666
2	12.5	0.3738
3	12.5	0.4051
1	25	0.7331
2	25	0.7475
3	25	0.8101
1	50	1.4836
2	50	1.4956
3	50	1.4588
1	100	2.9672
2	100	2.9912
3	100	2.9176

Para determinar la linealidad los valores de la tabla 1, se sometieron a análisis de regresión lineal por medio del paquete estadístico Statgraphics, para lo cual los valores de R y R^2 para cefotaxima, fueron los siguientes:

R = 0.9992 y $R^2=99.8563\%$

Dada la ecuación de la recta: $Y = mx + b = \text{ABC}_{\text{cefotaxima}} / \text{ABC}_{\text{dipirona}}$

Gráfico 1
CURVA DE CALIBRACIÓN CEFOTAXIMA



En el gráfico 1 se presentan las curvas de calibración efectuadas por el analista 1, para Cefotaxima, donde se puede determinar de manera visual (cualitativa) la linealidad del sistema.

LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Empleando los resultados de la curva de calibración, se procedió a determinar la concentración mínima cuantificable y la concentración mínima detectable en el método, la cual se determinó mediante cálculos matemáticos, para lo cual se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = a + 3S_{y/x} \quad \text{Y} \quad \text{LOQ} = a + 10S_{y/x}$$

Donde:

a= Intercepto

$S_{y/x}$ = Error Estándar de estimación del intercepto

Intercepto 0.0565338

Error estándar de estimación del intercepto 0.0129043

LOD= 0.0565338 + 3(0.0129043)

LDO=0.09524

LOQ= 0.0565338 + 10(0.0129043)

LOQ=0.18557

REPETITIVIDAD

Esta se evaluó mediante la inyección de concentraciones conocidas (superior, intermedia, inferior) de cefotaxima por triplicado, llevadas a cabo por el mismo analista y en las mismas condiciones, pero en diferentes días. Para evaluarla se obtiene el % de variación de la inyección (Coeficiente de Variación) de la tabla 2.

Tabla 2: ANALISTA 1			
Concentración (µg/ml)		Y=ABC _{cef} /ABC _{dip}	Promedios
100	Día 1	2.8471	2.9337
		2.8239	
		3.0833	
	Día 2	2.9129	
		2.9240	
		3.0110	
25	Día 1	0.7830	0.8103
		0.6871	
		0.8993	
	Día 2	0.7867	
		0.8811	
		0.8247	
6.25	Día 1	0.2333	0.2256
		0.2465	
		0.1765	
	Día 2	0.2286	
		0.2324	
		0.2363	

CV= 1.4715%

Por consiguiente los valores de la tabla 2, se sometieron a análisis de regresión lineal por medio del paquete estadístico Statgraphics,, para lo cual los valores de R y R² para cefotaxima en el caso del analista 1, fueron los siguientes:

R = 0.998 y R²=99.6%

REPRODUCIBILIDAD

Se evaluó con respecto al cambio de analista, el efecto en el cambio de día a partir de concentraciones conocidas (superior, intermedia, inferior) de cefotaxima por triplicado y se determina también el % de variación de las inyecciones (CV) que permita verificar la reproducibilidad del método al comparar los resultados obtenidos con los resultados del analista 1

En la tabla 3 se presenta el promedio de los datos de las tres curvas patrón, inyectadas por triplicado empleando la relación $Y=ABC_{cefotaxima}/ABC_{dipirona}$, las cuales fueron efectuadas por el analista 2

Concentración (µg/ml)		$Y=ABC_{cef}/ABC_{dip}$	promedios
100	Día 1	2.9672	2.9432
		2.9912	
		2.9176	
	Día 2	2.9499	
		2.8812	
		2.9522	
25	Día 1	0.7331	0.7703
		0.6471	
		0.8101	
	Día 2	0.7941	
		0.7997	
		0.8375	
6.25	Día 1	0.2896	0.2966
		0.3051	
		0.2925	
	Día 2	0.2924	
		0.2993	
		0.3010	

CV= 1.7321%

Por consiguiente los valores de la tabla 3, se sometieron a análisis de regresión lineal por medio del paquete estadístico Statgraphics,, para lo cual los valores de R y R² para cefotaxima en el caso del analista 2, fueron los siguientes:

R = 0.999 y R²=99.8%

ROBUSTEZ

Modificación de la fase móvil.

Para el caso de la fase móvil 1; los tiempos de retención de ambos fármacos se prolongan ($T_{R_{cefotaxima}} = 6.1257$ minutos, $T_{R_{dipirona}} = 8.4827$ minutos), en la fase móvil 2 la presión se eleva demasiado sobrepasando la presión límite del equipo, de tal modo que se detiene automáticamente la corrida aproximadamente a los 2 minutos y para la fase móvil 3 los tiempos de retención disminuyen ($T_{R_{cefotaxima}} = 4.9717$ minutos, $T_{R_{dipirona}} = 6.6930$ minutos) pero el tiempo del ruido se prolonga hasta 4.5082, demasiado cercano al tiempo de retención de cefotaxima.

Estabilidad de las muestras. .

Cuando se lleva a cabo la inyección de las 3 muestras el primer día el proceso es normal, pero en el segundo y tercer día el tiempo de retención no se ve afectado para ningún fármaco; más sin embargo al evaluar el área bajo la curva de dipirona se observa que en todas las muestras esta área disminuye considerablemente, en el caso de cefotaxima no se observa ningún cambio.

Evaluación del método con muestras in vivo

79. seleccionar 3 voluntarios que cumplan con los criterios de exclusión e inclusión correspondientes (revisar anexo 3).
80. Cuando se disponga de los 3 voluntarios informar detalladamente sobre el proceso de administración, posibles consecuencias de dicha administración así como el fin y los objetivos del trabajo. Si el voluntario después de ser debidamente informado, acepta ser administrado se le entregara una responsiva (anexo 5) la cual deberá llenar con sus datos y firmarla.
81. Entregar a cada voluntario 2 frascos rotulados (ORINA BLANCO Y ORINA FARMACO), 1 ampula cefotaxima (contiene: frasco ampula con polvo cefotaxima sódica 500 mg, ampolleta con diluyente de 4 ml), una jeringa y las indicaciones para administración (anexo 6)
82. Llevar a cabo la recolección de las muestras, para ello consulte el anexo 2 punto 2.2
83. Al día siguiente se reciben los 6 frascos de los 3 voluntarios a la hora acordada.
84. Para el tratamiento de las muestras revise el anexo 2 punto 2.2
85. Verificar el equilibrado del equipo (punto 52) y posteriormente inyectar las muestras individualmente en corridas de 10 minutos, flujo de 1.0 ml/ min y temperatura del controlador a 45 °C.

Evaluación in vivo

Para poder determinar la concentración de Cefotaxima en la orina de los voluntarios, se realizó una nueva curva de calibración siguiendo el mismo proceso que se usó en el parámetro de linealidad (ver punto 53).

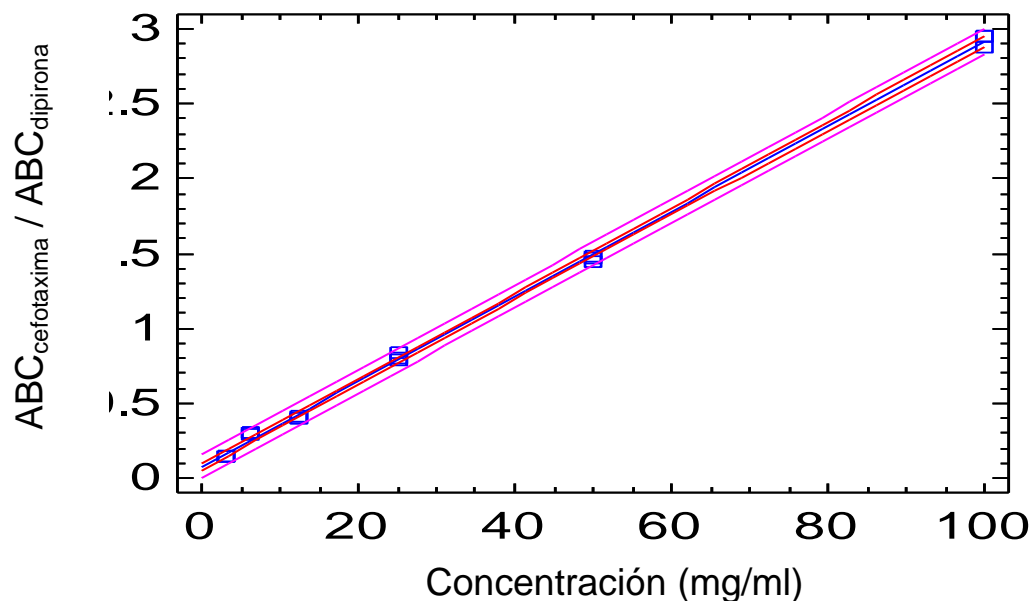
Curva	Concentración ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	$Y = \text{ABC}_{\text{cefot}} / \text{ABC}_{\text{dipir}}$
1	3.25	0.1462
2	3.25	0.1497
3	3.25	0.1505
1	6.25	0.2924
2	6.25	0.2993
3	6.25	0.3010
1	12.5	0.3971
2	12.5	0.3999
3	12.5	0.4188
1	25	0.7941
2	25	0.7997
3	25	0.8375
1	50	1.4750
2	50	1.4406
3	50	1.4761
1	100	2.9499
2	100	2.8812
3	100	2.9522

$R = 0.9994$ y $R^2 = 99.881\%$

Dada la ecuación de la recta: $Y = mx + b = \text{ABC}_{\text{cefotaxima}} / \text{ABC}_{\text{dipirona}}$

Pendiente $m = 0.0283968$ y ordenada $b = 0.0765813$

Gráfico 2
CURVA DE CALIBRACIÓN CEFOTAXIMA
(Muestras in vivo)



LIMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

$$LOD = a + 3S_{y/x}$$

Y

$$LOQ = a + 10S_{y/x}$$

Donde:

a= Intercepto

$S_{y/x}$ = Error Estándar de estimación del intercepto

Intercepto 0.0765813

Error estándar de estimación del intercepto 0.0115485

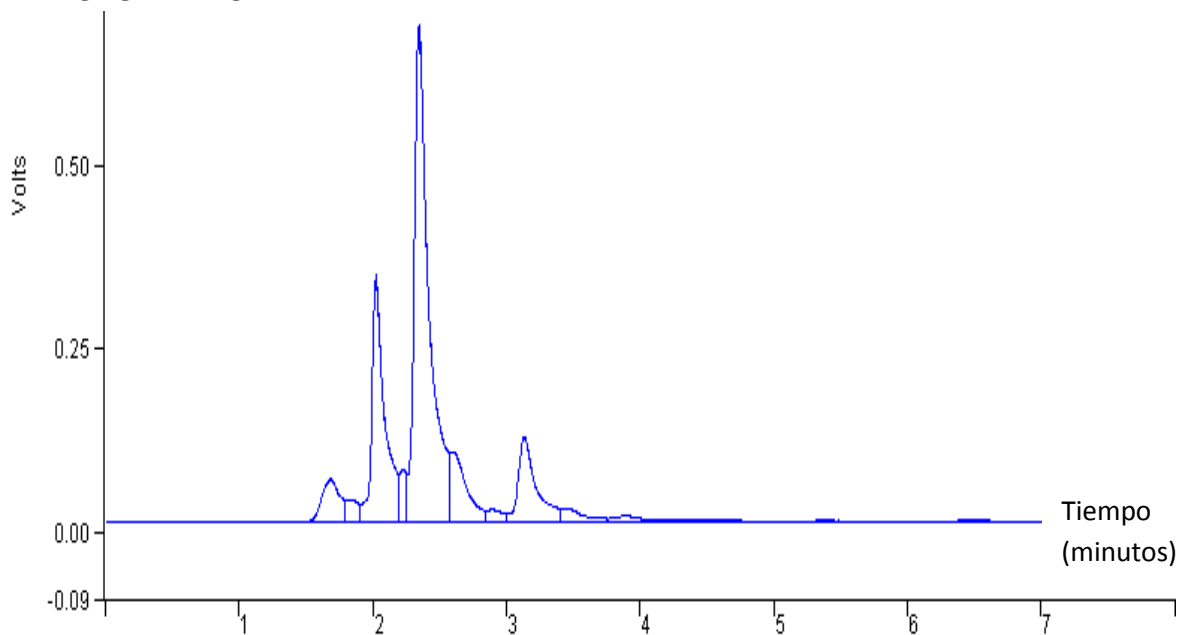
$$LOD = 0.0765813 + 3(0.0115485)$$

$$LDO = 0.1112$$

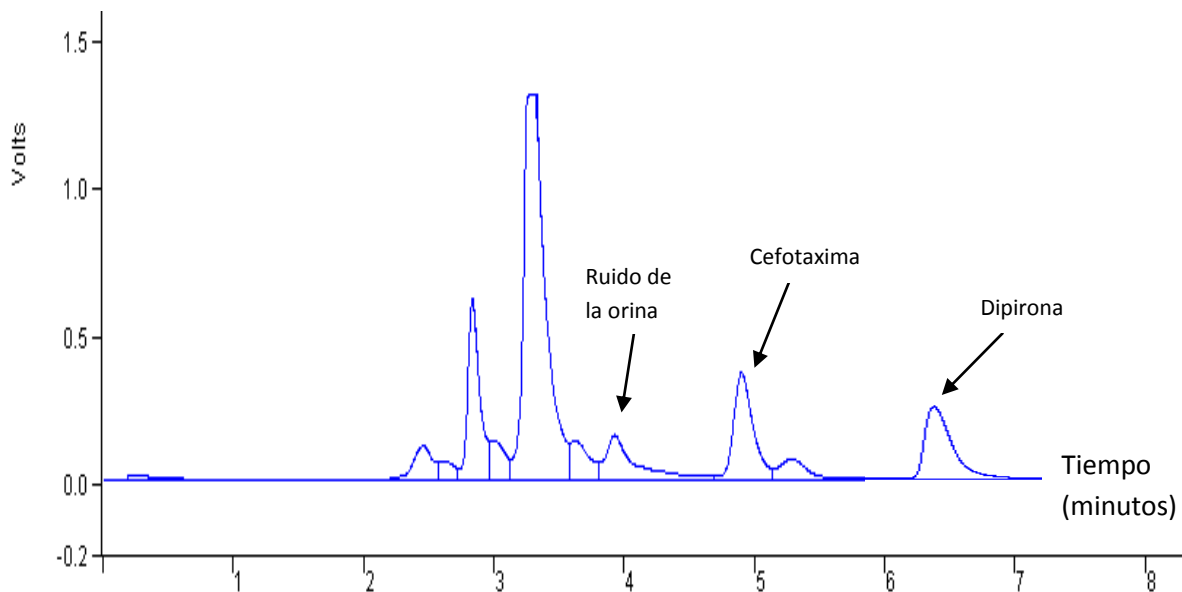
$$LOQ = 0.0765813 + 10(0.0115485)$$

$$LOQ = 0.1920$$

VOLUNTARIO 1.

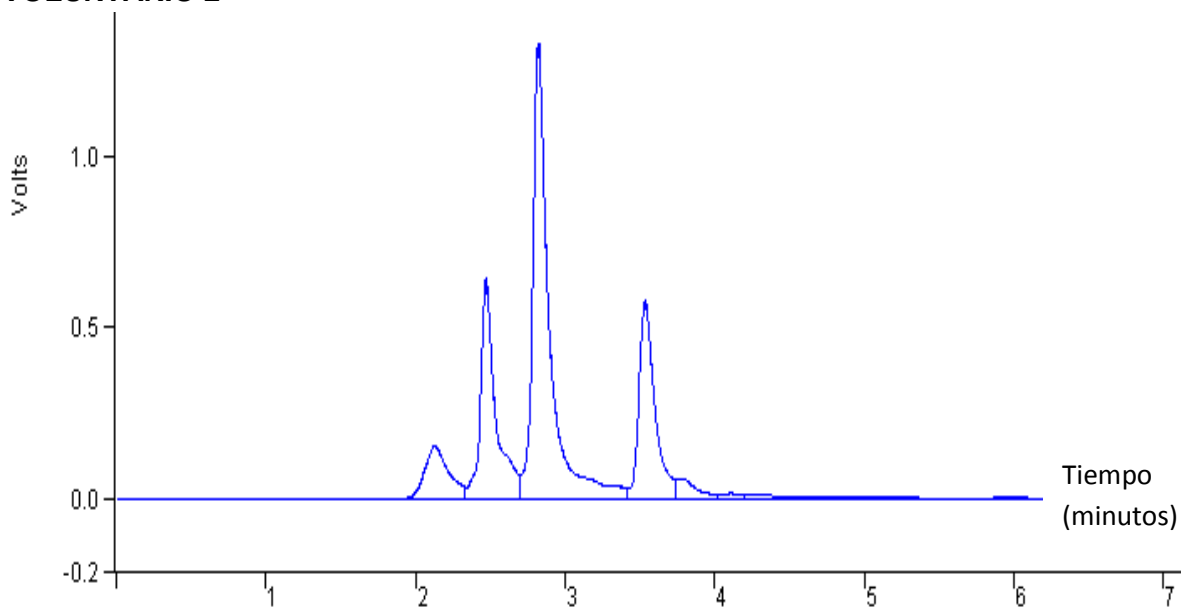


En la **figura 14** se presenta el blanco diluido (1 ml de orina + 15 ml de fase móvil)

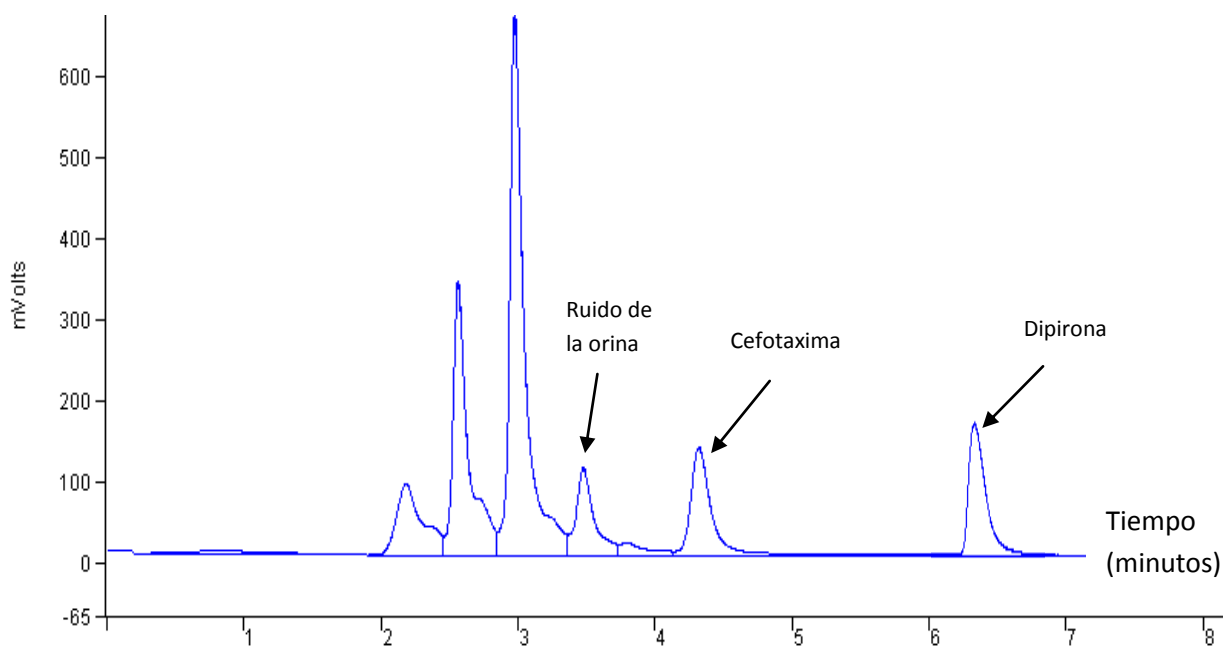


En la **figura 15** se observa el fármaco en orina del voluntario 1

VOLUNTARIO 2

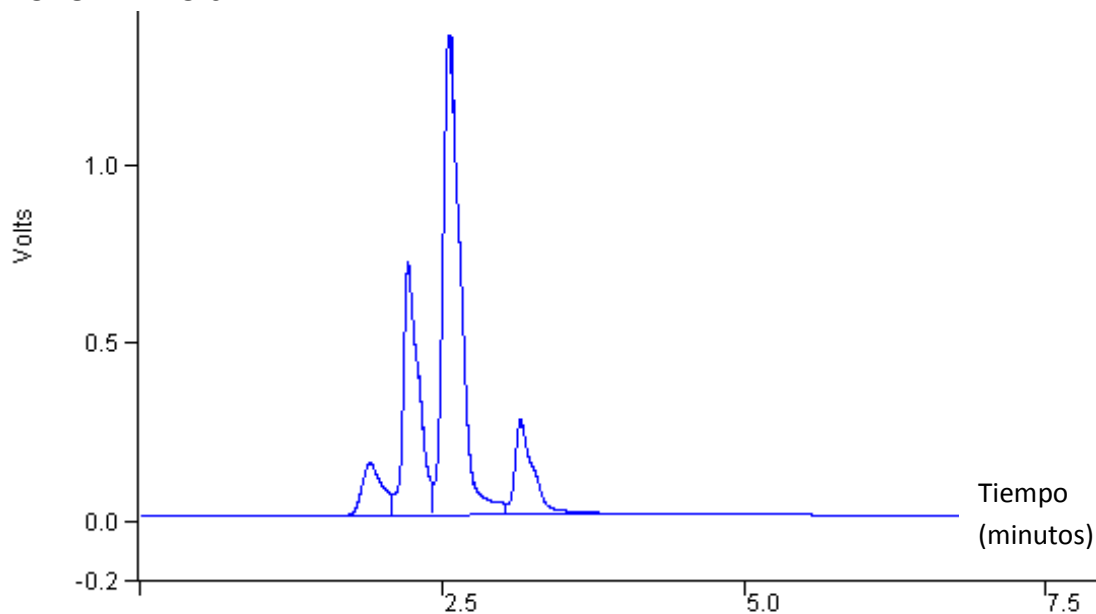


En la **figura 16** se presenta el blanco diluido (1 ml de orina + 15 ml de fase móvil)

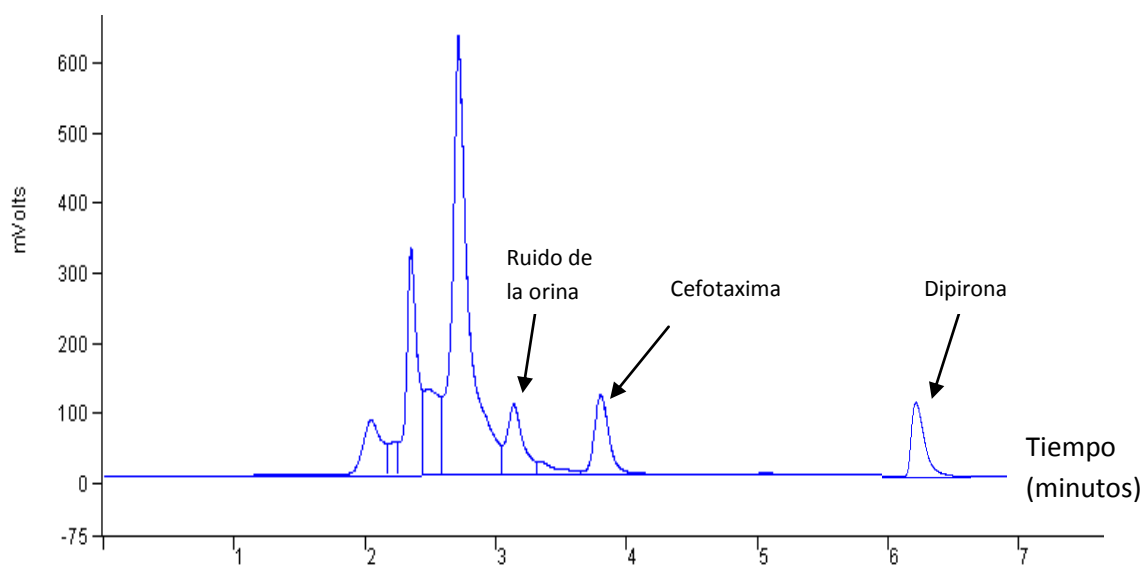


En la **figura 17** se observa el fármaco en orina del voluntario 2

VOLUNTARIO 3



En la **figura 16** se presenta el blanco diluido (1 ml de orina + 15 ml de fase móvil)



En la **figura 17** se observa el fármaco en orina del voluntario 3

Empleando la curva patrón de la página 52 se extrapolan los valores encontrados de la relación $Y=ABC_{\text{CEFOTAXIMA}} / ABC_{\text{DIPIRONA}}$ en cada uno de los voluntarios, para determinar la concentración; encontrando los siguientes valores

voluntarios	$Y=ABCC_{\text{EFOTAXIMA}}/ABC_{\text{DIPIRONA}}$	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
Voluntario 1	0.9828	31.91
Voluntario 2	0.3664	10.09
Voluntario 3	0.9495	30.74

Conociendo el volumen de orina de cada voluntario, determinamos la cantidad eliminada (intacta) durante 12 horas.

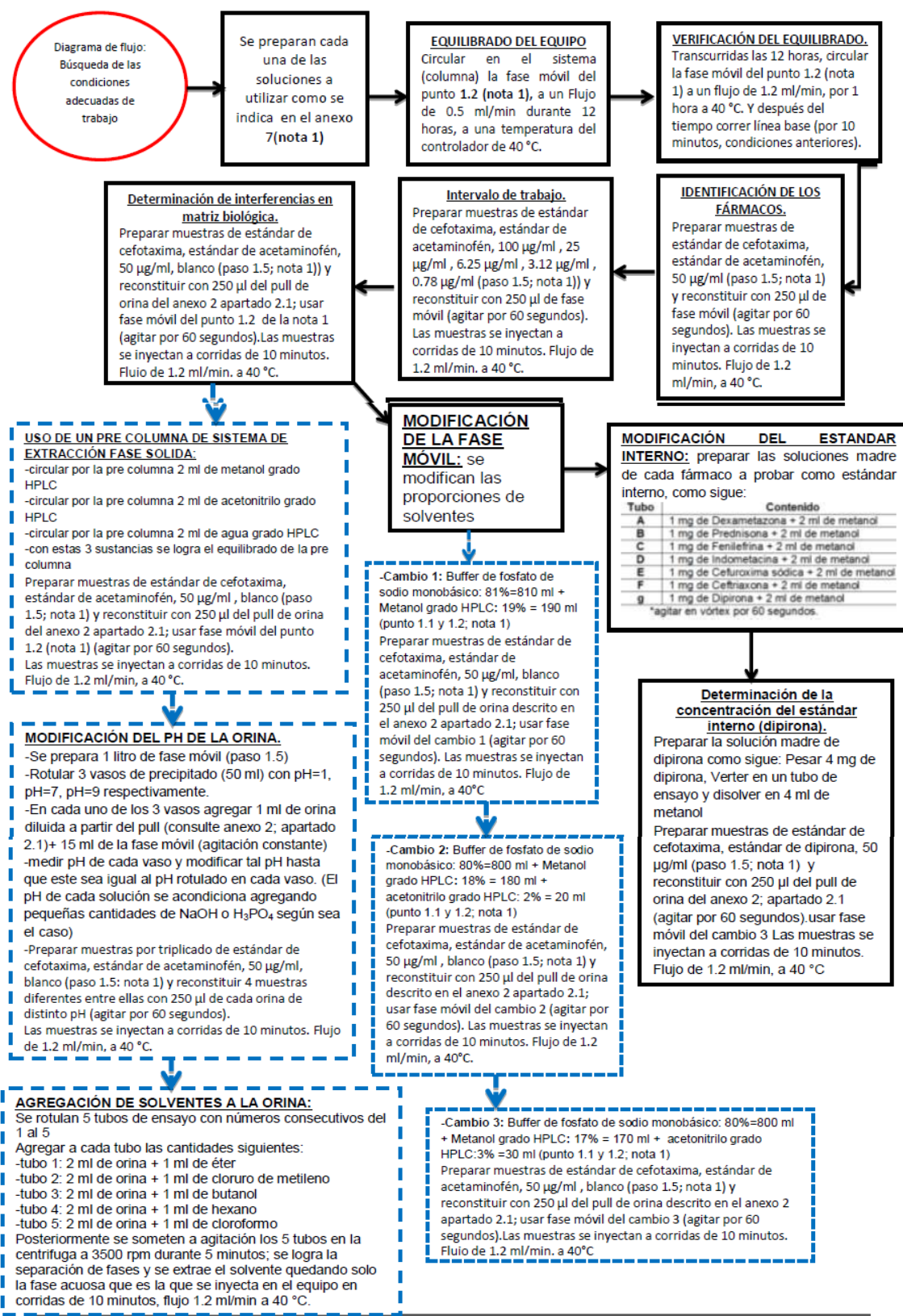
Voluntarios	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen final (ml)	Cantidad eliminada (mg)
Voluntario 1	31.91	165	78.97
Voluntario 2	10.09	610	93.42
Voluntario 3	30.74	175	80.69

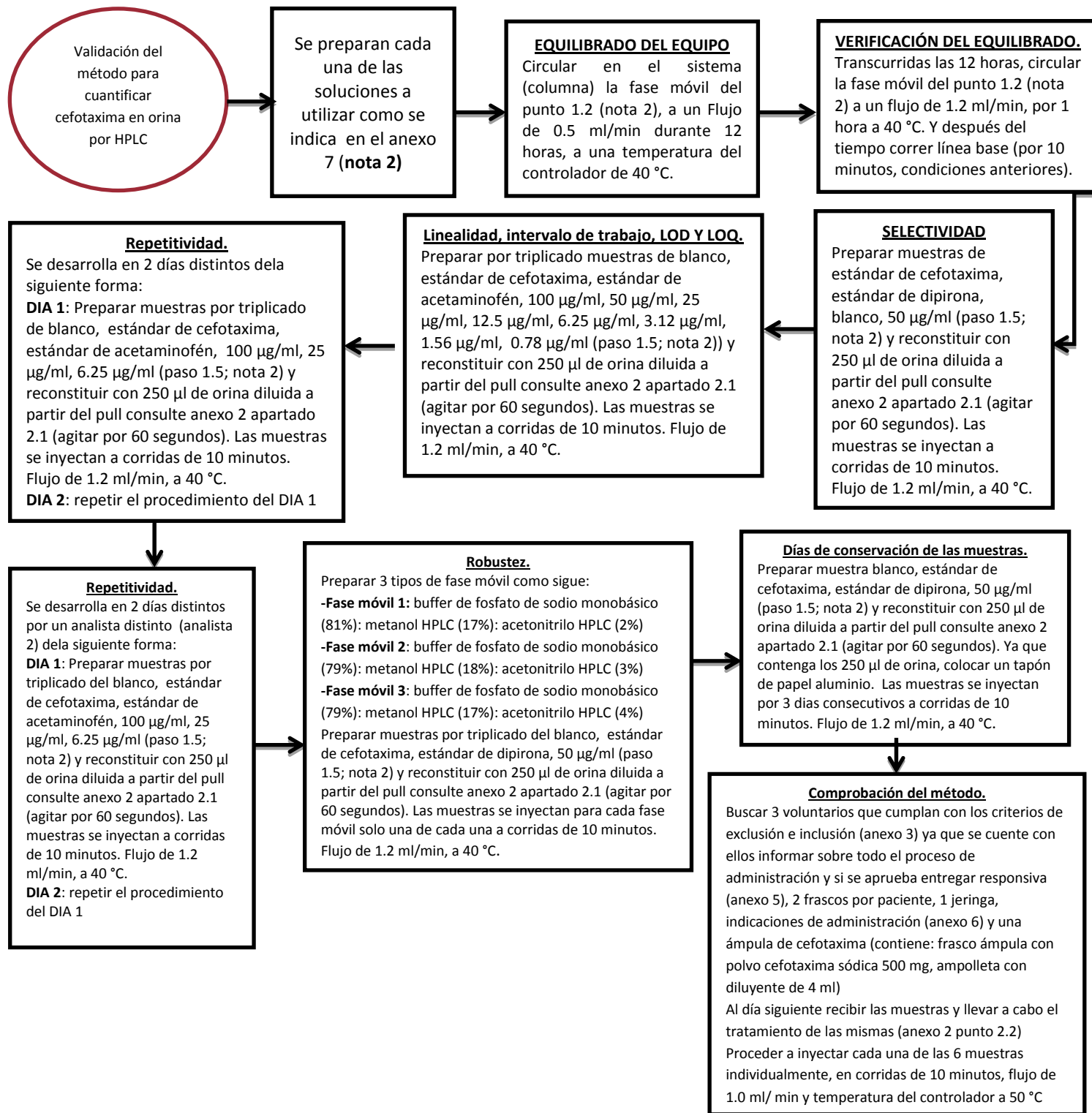
Dado que se administraron 500 mg por vía intramuscular, podemos determinar el porcentaje (%) de fármaco eliminado por vía renal.

Voluntarios	Cantidad administrada (mg)	Cantidad eliminada (mg)	Porcentaje de fármaco eliminado (%)
Voluntario 1	500	78.97	15.79
Voluntario 2	500	93.42	18.68
Voluntario 3	500	80.69	16.14

[VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC PARA CUANTIFICAR CEFOTAXIMA EN ORINA HUMANA]

ABRIL DE 2014





Discusión de resultados

La validación es un proceso por el cual se asegura la confiabilidad de los resultados proporcionados; estableciéndose parámetros que evalúen su desempeño. Sin embargo; a lo largo de este proceso se deben establecer las condiciones de trabajo; siendo este un paso fundamental en el proyecto. Es por ello que este trabajo se subdividió en dos partes; la primera fue la búsqueda de las condiciones para la validación y la segunda fue la validación del método como tal. En la primera parte tuvimos la facilidad de ya contar con un método no normalizado usado en el laboratorio de farmacocinética y biofarmacia desde hace tiempo y basándonos en este lo acondicionamos a nuestras necesidades.

Comenzamos por usar una fase móvil de 91% buffer de monofosfato de sodio y 9% de metanol para identificar Cefotaxima (fármaco de interés) y acetaminofén (estándar interno) reconstituidos en fase móvil; en esta prueba no existió problema alguno ya que el tiempo de retención (TR) de Cefotaxima y acetaminofén se alejan por dos minutos y medio aproximadamente, tiempo suficiente para poder identificarlos perfectamente (figura 3) esta selectividad se mantienen en todas las concentraciones establecidas en un rango de 100 µg/ml – 0.78 µg/ml (figura 4).

Ahora bien, el primer problema se presenta cuando se decide usar la matriz biológica (orina) como medio de reconstitución. Como sabemos por la orina se desechan una gran cantidad de sustancias que el equipo al ser altamente sensible las detecta y por consiguiente son perceptibles en el cromatograma, lo cual afecta en gran medida el TR de acetaminofén (figura 6) hasta el punto en que se mezcla con el tiempo del ruido. Este hecho hace que realicemos diferentes cambios para intentar separar dichos picos. Primero modificamos la fase móvil 3 veces, donde el incremento de la presión es excesivo; al punto que las corridas no finalizan y solo en una fase móvil de 80:17:3 (buffer de monofosfato de sodio: metanol: acetonitrilo) la presión es aceptable y el ruido disminuye considerablemente. Debemos recordar que ligeros cambios nos afectan a todo el sistema; cuando las interacciones físicas y químicas entre la fase móvil y la fase estacionaria cambian, razón por la cual los picos de Cefotaxima y acetaminofén se encuentran cercanos sin poder diferenciarlos (figura 8).

Se retoma la fase móvil inicial y se ocupa un sistema de extracción fase sólida (cartuchos), la disminución del ruido es inexistente y además se retiene más del 50% de cada fármaco (figura 9), en cuanto a la modificación del pH de la orina; en un pH ácido el tiempo del ruido se mezcla con el TR de acetaminofén y en un pH neutro y básico el Tiempo del ruido de la orina se prolonga hasta después de los 7 minutos lo cual afecta acetaminofén y Cefotaxima; eliminando con ello cualquier posibilidad de modificación del pH. La cuarta opción es el uso de solventes que precipiten las interferencias presentes en la orina y en las corridas no estén presentes; mas sin embargo los solventes no ejercen efecto alguno

Por los pocos efectos positivos ejercidos por las modificaciones realizadas se decide retomar la fase móvil modificada “cambio 3” donde se logró la disminución del ruido (figura 8) y eliminar acetaminofén como estándar interno. Ahora el objetivo es buscar un nuevo estándar interno que se resuelva en la fase móvil (80:17:3) y se aleje del TR de Cefotaxima para lo cual se prueban 7 fármacos en corridas de 20 minutos, se logran

resolver 3 fármacos; pero el que se elige es dipirona que presenta un TR= 6.1327 alejado 2 minutos aproximadamente de Cefotaxima y del ruido de la orina.

Con ello se logra establecer las condiciones de trabajo y se procede a la validación del método como tal. Con respecto a la selectividad cada fármaco presenta un tiempo de retención diferente (figura 13) y por lo tanto no interfiere en la separación

En la curva de calibración realizada donde se utilizaron 8 concentraciones, 2 de ellas se eliminan debido a que sus picos no son diferentes de la línea base, para las otras 6 concentraciones los resultados presentados en la tabla 1, demuestran una relación lineal entre la concentración de fármaco en la orina y la respuesta del equipo (ABC). Además se observa que el intercepto está muy próximo a cero esto indica que hay poco error sistemático en el desarrollo del proyecto, la pendiente por su parte y el coeficiente de correlación (r) es de 0.9963 nos indican que todos los datos están muy próximos a formar una línea recta.

En los parámetros de repetitividad y reproducibilidad si los comparamos; se observan resultados proporcionales entre ellos (tabla 2 y tabla 3), así como sus coeficientes de correlación (r) para repetitividad es de 0.998 y para reproducibilidad 0.999 lo cual nos asegura la continuación de la linealidad del método, así como una buena precisión y exactitud a la hora de reproducir el método por otros analistas en condiciones similares.

En el caso de la robustez en una fase móvil de 81: 17:2 (buffer de monofosfato de sodio: metanol. Acetonitrilo) el método continua produciendo resultados pero si aumentamos el metanol en más de un 17% la presión aumenta al punto en que las corridas se detienen automáticamente y la elevación de la temperatura no ejerce control alguno sobre este, el acetonitrilo también debe mantenerse <3% de lo contrario los picos se mezclaran con los de la orina. La temperatura si se mantienen en un rango de 45-60 °C el método se mantiene estable. Además las muestras reconstituidas con matriz biológica deben inyectarse el mismo día que se prepararon de lo contrario dipirona se degrada y se ven afectados los resultados.

En los estudios in vivo se observa que la cantidad eliminada por los voluntarios no es mayor del 18% aun cuando en la bibliografía se reporta de un 40 a 60% de eliminación de fármaco intacto en orina, esto pudiera deberse a que se sintetice una mayor cantidad del metabolito desacetil Cefotaxima en la población mexicana lo que podría explicar el bajo porcentaje cuantificado de Cefotaxima.

Conclusiones

Después del desarrollo de este proyecto se concluye que el método establecido es eficiente para la correcta separación y cuantificación de Cefotaxima en orina humana. Además de que se ha demostrado que se cuenta con un método selectivo, lineal, robusto, repetible y reproducible, cumpliendo con cada uno de los parámetros establecidos para la validación de métodos cromatográficos de manera confiable y garantizando la confiabilidad de los resultados proporcionados.

Además se cuenta con un método sencillo, relativamente económico y con corridas rápidas de 10 minutos, lo cual permite en su momento analizar varias muestras al día

En cuanto al estudio en pacientes encontramos que se elimina un porcentaje no mayor al 18% de fármaco intacto en orina, si consultamos la bibliografía veremos que se reporta una eliminación entre un 40-60%, se observan valores demasiado bajos de los reportados lo cual podría indicar que se esta sintetizando mayor cantidad del metabolito desacetil cefotaxima, comparado con otras poblaciones que es cercano al 40%.

ANEXO 1

Calibración del pH-metro.

1. Conectar y pulsar el botón ON/OFF para encender el pH-metro
2. Sumergir el electrodo sólo 2 cm en la solución tampón pH=4. Sometiendo a agitación lenta y constante con una barra magnética
3. Pulsar el botón READ del aparato.
4. Cuando se acerque a valores cercanos a pH=4 pulsar el botón CALIBRAR para proceder a la calibración.
5. Esperar a que se estabilice la lectura y cuando se observe pH=4 se retira de la solución tampón el electrodo, enjuagando y secando cuidadosamente con un pañuelo de papel.
6. Sumergir el electrodo sólo 2 cm en la solución tampón pH=7. Sometiendo a agitación lenta y constante con una barra magnética
7. Pulsar el botón READ del aparato.
8. Cuando se acerque a valores cercanos a pH=7 pulsar el botón CALIBRAR para proceder a la calibración.
9. Esperar a que se estabilice la lectura y cuando se pH=7 se retira de la solución tampón el electrodo, enjuagando y secando cuidadosamente con un pañuelo de papel.
10. Ya tenemos calibrado el pH-metro, ahora podemos proceder a la medición del pH de nuestra muestra.

ANEXO 2

Obtención, tratamiento y conservación de muestras biológicas.

2.1. Preparación del pull de orina.

- a) Se seleccionan 10 voluntarios aparentemente sanos mayores de 18 años, ambos sexos; que cumplan con los criterios del anexo 3.
- b) Una vez que se tiene el numero antes mencionado de voluntarios se acuerda un día en el que se puede hacer entrega del envase estéril a todos los voluntarios, para la recolección de la orina que será al día siguiente sin excepción.
- c) se hace la indicación de que posterior al día en se entregó el envase se deberá recolectar la primera orina del día (aseo previo) y hacer la entrega en el laboratorio de farmacocinética y biofarmacia en un horario de 8:00 a 9:00 am. (dirección: 14 sur y avenida san Claudio ciudad universitaria, edificio 105D laboratorio 101. Teléfono: 2295500 extensión 7524),
- d) se vacía el contenido de orina de los 10 voluntarios en un matraz Erlenmeyer (volumen necesario).

- e) Someter a agitación por medio de una bala magnética en una parrilla de agitación durante 3 minutos.
- f) Tomar 1 ml de la mezcla de orinas y colocarlo en un tubo de ensayo, posteriormente agregar 15 ml de fase móvil
- g) La mezcla de orina con la fase móvil del inciso f) es lo que llamaremos **orina diluida**
- h) La orina sobrante se rotula con la fecha de recolección y con el nombre de “pull de orina”
- i) Cubrir la boca del matraz con papel metálico y hule adherible
- j) Guardar en el refrigerador, para su posterior uso. (almacenar por un tiempo máximo de 7 días a partir de su recolección).

2.2. Recolección y tratamiento de muestras de individuos administrados con Cefotaxima.

- a) Se seleccionan 3 voluntarios aparentemente sanos mayores de 18 años, ambos sexos; que cumplan con los criterios del anexo 3
- b) Una vez que se tiene el numero antes mencionado de voluntarios se acuerda un día en el que se puede hacer entrega de 2 envases estéril a todos los voluntarios para la recolección de la orina que será al día siguiente sin excepción.
- c) Un día anterior a la administración se informa debidamente a cada voluntario de manera personal y entregando una responsiva (anexo 5) para su lectura, analizar y en dado caso de estar totalmente de acuerdo; firmar la misma (resguardadas por el tesista)
- d) Se hace entrega de 1 caja de Cefotaxima (contiene: frasco ampula con polvo Cefotaxima sódica 500 mg, ampolleta con diluyente de 4 ml), 1 jeringa, 2 frascos rotulados (ORINA BLANCO, ORINA FÁRMACO) y una hoja con las indicaciones para la correcta administración (anexo 6)
- e) se hace la indicación de que posterior al día en se entregó el envase se deberá recolectar las muestras como se indica y hacer la entrega en el laboratorio de farmacocinética y biofarmacia en un horario de 8:00 a 9:00 am. (dirección: 14 sur y avenida san Claudio ciudad universitaria, edificio 105D laboratorio 101. Teléfono: 2295500 extensión 7524),
- f) verificar que cuando se entreguen las muestras por parte de los voluntarios, estos se encuentren debidamente rotulados.
- g) Medir el volumen total de orina recolectada en cada uno de los 3 frascos que llevan el rotulo de “orina fármaco” de manera individual.
- h) Rotular 6 tubos con las iniciales de los nombres de cada voluntario y especificar si es “orina blanco” “orina fármaco”
- i) Agregar 1 ml de orina a cada tubo anterior según corresponda (verificar que los rótulos coincidan)
- j) Agregar 15 ml de fase móvil (punto 56) y agitar en vórtex por 60 segundos.

- k) Rotular 3 tubos con las iniciales de los nombres de cada voluntario y como subíndice el numero 2 (ejemplo: GCF₂)
- l) Tomar 250 µl de la mezcla anterior (inciso j) y colocarlo en un tubo de ensayo según corresponda el rotulo del punto k y agregar 250 µl de la solución madre de dipirona (punto 50)
- m) Agitar en vórtex por 60 segundos. Las muestras están listas para ser inyectadas.
- n) Guardar en el refrigerador la orina sobrante, por si se necesitara un futuro uso. (almacenar por un tiempo máximo de 7 días a partir de su recolección).

ANEXO 3

Criterios de exclusión e inclusión de pacientes.

Criterios de exclusión

- Si en su orina blanco se detecta alguna señal que interfiera en los resultados, no se incluye en el análisis.
- Se excluye todo aquel paciente que se encuentre administrado por algún otro medicamento o tratamiento; ya sea tratamiento farmacológico, tratamiento herbolario, etc.
- No incluir pacientes con daño renal, daño hepático o alguna otra enfermedad degenerativa o contagiosa.
- Excluir a pacientes que informen haber presentado o presentar sensibilidad a las penicilinas.
- En el caso de las mujeres estas no deberán de estar menstruando ni embarazadas.

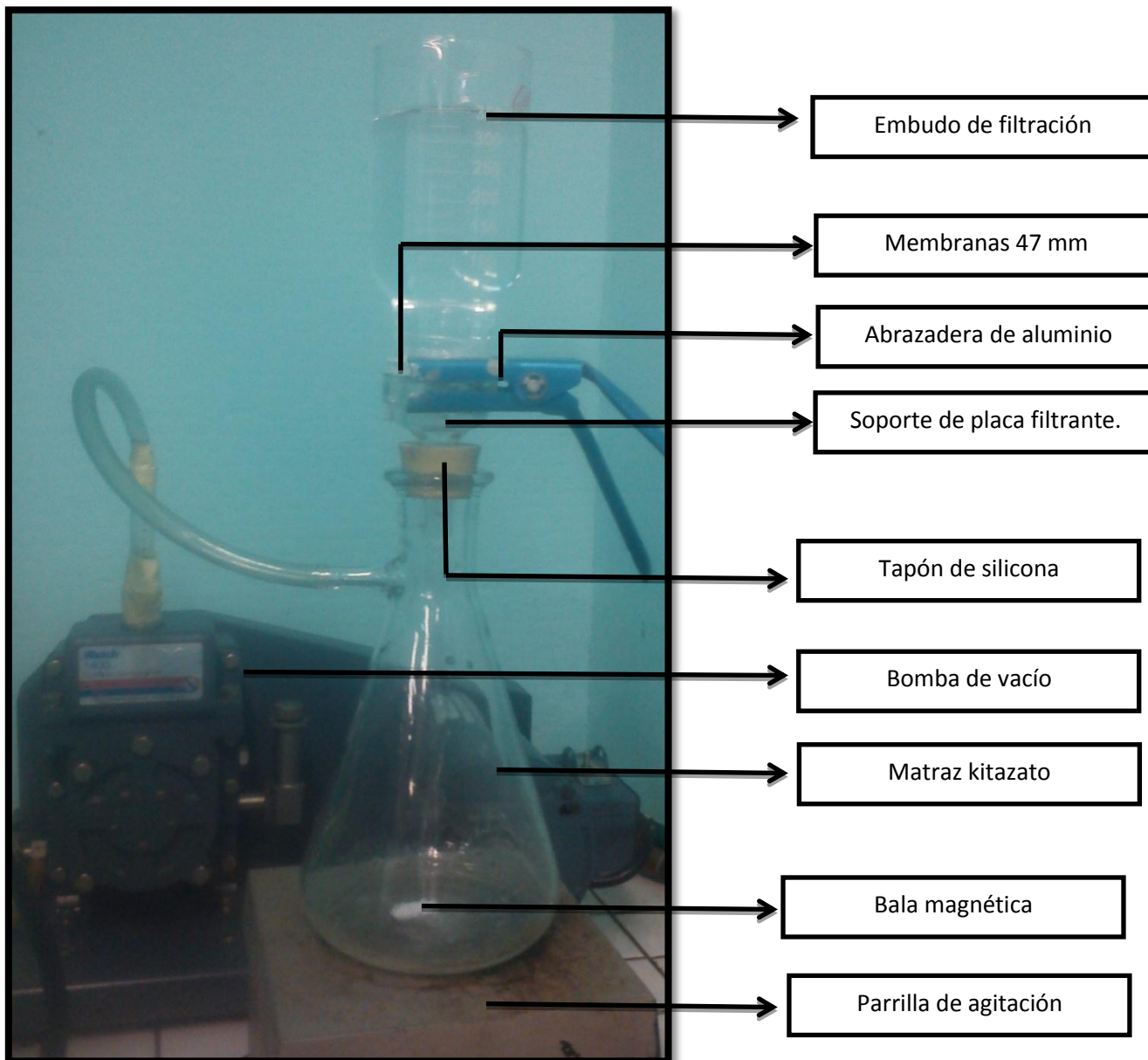
Criterios de inclusión.

- Tener cumplida la mayoría de edad (18 años)
- Encontrarse sanos.
- Proceder de padres mexicanos.

ANEXO 4

Sistema de filtración del buffer

Para filtrar el buffer, armar el sistema como se muestra en la figura siguiente:



ANEXO 5

Responsiva de los voluntarios administrados con Cefotaxima

Puebla, Pue., a _____ de 2013.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que acepto voluntariamente administrarme el medicamento de nombre **Cefotaxima** en solución inyectable (vía intramuscular), que contiene Cefotaxima sódica (500 mg), con la finalidad de apoyar las investigaciones que se llevan a cabo en el **Laboratorio de Biofarmacia (Facultad Ciencias Químicas, BUAP)** denominada: Validación de un Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Cefotaxima en orina humana. Donde se encuentra como responsable de dicha investigación el M.C. BENJAMÍN SANDOVAL GUZMÁN.

Hago constar que en este momento no padezco ninguna enfermedad y que no estoy consumiendo ningún otro medicamento.

Me informaron que la administración única del fármaco no tiene ningún efecto adverso, ya que estos solo se presentan durante la administración prolongada del mismo.

Me comprometo a seguir las instrucciones que me han sido entregadas junto con el fármaco, y entregar 2 muestras de orina, tal como se me indica, **al siguiente día de la administración en el laboratorio de farmacocinética y biofarmacia** (dirección: 14 sur y avenida san Claudio ciudad universitaria, edificio 105D laboratorio 101. Teléfono: 2295500 extensión 7524), con la tesista FLORES TEMOLTZI GUADALUPE CAROLINA.

Atentamente:

Nombre y Firma

ANEXO 6

Instrucciones para la administración del medicamento (Cefotaxima sódica) 500 mg:

1. No lo administres si estas menstruando o tomando algún otro medicamento. No ingerir bebidas alcohólicas, café, coca-cola, chocolate o bebidas con cafeína 24 horas antes de la administración del fármaco.
2. Tomar una muestra de orina antes de administrarse el fármaco. (Frasco con rotulo: ORINA BLANCO).
3. Administrar el medicamento vía intramuscular a las 8:00 p.m. y a partir de entonces y hasta las 8:00 a.m. del siguiente día; se deberá recaudar toda la orina producida es este tiempo, guardando en el galón proporcionado (galón con rotulo: ORINA FÁRMACO).
4. Colocar el nombre de quien se administra el fármaco a cada frasco.
5. Entregar al siguiente día de la administración en el laboratorio de farmacocinética y biofarmacia (dirección: 14 sur y avenida san Claudio ciudad universitaria, edificio 105D laboratorio 101. Teléfono: 2295500 extensión 7524), con la tesista FLORES TEMOLTZI GUADALUPE CAROLINA.

GRACIAS.

ANEXO 7

Nota 1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EN LA BUSQUEDA DE CONDICIONES ADECUADAS DE TRABAJO

1.1 Buffer de fosfato de sodio monobásico:

- Disolver 2.8 gr de fosfato de sodio en 1 L. de agua HPLC. (Agitación constante por 5 min)
- Medir el pH de la solución (calibrar el pH-metro, Anexo 1).
- Deberá tener pH=4.5, de lo contrario acondicionar con pequeñas cantidades de NaOH o H_3PO_4 según sea el caso.
- filtrar el buffer (anexo 4).

1.2 Fase móvil:

- En un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en sus respectivas proporciones: Buffer de fosfato de sodio monobásico: 91% =910 ml y Metanol grado HPLC: 9% = 90 ml.

Asonicar en el ultrasonido por 20 minutos

1.3 Solución madre cefotaxima

- Pesar 4 mg de patrón primario de cefotaxima
- Disolver y aforar en un matraz de 10 ml con metanol.

1.4 Solución madre acetaminofén

- Pesar 1 mg de acetaminofén
- Verter en un tubo de ensayo y disolver en 2 ml de metanol
- Agitar en vórtex durante 60 segundos.

1.5 Diferentes tipos de muestras a diferentes concentraciones:

Rotular los tubos con el nombre del estándar o la concentración respectiva; según corresponda y agregar a cada tubo las cantidades correspondientes:

- [blanco]**: esta muestra se prepara al día siguiente, cuando en las demás se encuentre evaporado el metanol, al contener solo orina diluida no es necesaria antes. 250 μ l de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agite en vórtex 60 segundos.
- [estándar de cefotaxima]**: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 1.3) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 μ l)
- [estándar de acetaminofén]**: 250 μ l solución madre de acetaminofén (paso 1.4) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 μ l)
- [100 μ g/ml]**: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 1.3) y agitar en vórtex 60 segundos
- [50 μ g/ml]**: 250 μ l solución madre de cefotaxima (paso 1.3) + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [25 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 50 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [12.5 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 25 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [6.25 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 12.5 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [3.12 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 6.25 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [1.56 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 3.12 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg.
- [0.78 μ g/ml]**:250 μ l del tubo 1.56 μ g/ml + 250 μ l de metanol / agitar en vórtex 60 seg. (Desechar 250 μ l)

-Agregar 25 µl de la solución madre de acetaminofén a los tubos de diferentes concentraciones, excepto a los estándares y agitar nuevamente en vórtex por 60 segundos.

-Colocar a todos los tubos tapones de papel aluminio perforados, dejar evaporar el metanol 24 hr

-preparar las soluciones madre de cada fármaco a probar como estándar interno, para ello preparar dichas soluciones como sigue:

Tubo	Contenido	Agitación (tiempo):
A	1 mg de Dexametazona + 2 ml de metanol	60 segundos
B	1 mg de Prednisona + 2 ml de metanol	60 segundos
C	1 mg de Fenilefrina + 2 ml de metanol	60 segundos
D	1 mg de Indometacina + 2 ml de metanol	60 segundos
E	1 mg de Cefuroxima sódica + 2 ml de metanol	60 segundos
F	1 mg de Ceftriaxona + 2 ml de metanol	60 segundos
g	1 mg de Dipirona + 2 ml de metanol	60 segundos

-[estándar de Dexametazona]: 250 µl del tubo A + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de Prednisona]: 250 µl del tubo B + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de Fenilefrina]: 250 µl del tubo C + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de Indometacina]: 250 µl del tubo D + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de Cefuroxima sódica]: 250 µl del tubo E+ 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de ceftriaxona]: 250 µl del tubo F + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

-[estándar de dipirona]: 250 µl del tubo G + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl de la mezcla para mantener volumen)

Nota 2: VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CEFOTAXIMA EN ORINA

1.1 Buffer de fosfato de sodio monobásico:

-Disolver 2.8 gr de fosfato de sodio en 1 L. de agua HPLC. (Agitación constante por 5 min)

-Medir el pH de la solución (calibrar el pH-metro, Anexo 1).

-Deberá tener pH=4.5, de lo contrario acondicionar con pequeñas cantidades de NaOH o H₃PO₄ según sea el caso.

-filtrar el buffer (anexo 4).

1.2 Fase móvil:

-En un reservorio de 1 litro mezclar las siguientes sustancias en sus respectivas proporciones: Buffer de fosfato de sodio monobásico: 80% =800 ml, Metanol HPLC: 17% = 170 ml y acetonitrilo HPLC: 3% = 30 ml

Asonicar en el ultrasonido por 20 minutos

1.3 Solución madre cefotaxima

-Pesar 4 mg de patrón primario de cefotaxima

-Disolver y aforar en un matraz de 10 ml con metanol.

1.4 Solución madre dipirona

-Pesar 2 mg de dipirona

-Verter en un tubo de ensayo y disolver en 2 ml de metanol

-Agitar en vórtex durante 60 segundos.

1.5 Diferentes tipos de muestras a diferentes concentraciones:

Rotular los tubos con el nombre del estándar o la concentración respectiva; según corresponda y agregar a cada tubo las cantidades correspondientes:

-**[blanco]:** esta muestra se prepara al día siguiente, cuando en las demás se encuentre evaporado el metanol, al contener solo orina diluida no es necesaria antes. 250 µl de orina diluida a partir del pull (consulte anexo 2; apartado 2.1) y agite en vórtex 60 segundos.

-**[estándar de cefotaxima]:** 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 1.3) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl)

-**[estándar de dipirona]:** 250 µl solución madre de dipirona (paso 1.4) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos. (Desechar 250 µl)

-**[100 µg/ml]:** 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 1.3) y agitar en vórtex 60 segundos

-**[50 µg/ml]:** 250 µl solución madre de cefotaxima (paso 1.3) + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[25 µg/ml]:**250 µl del tubo 50 µg/ml + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[12.5 µg/ml]:**250 µl del tubo 25 µg/ml + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[6.25 µg/ml]:**250 µl del tubo 12.5 µg/ml + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[3.12 µg/ml]:**250 µl del tubo 6.25 µg/ml + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[1.56 µg/ml]:**250 µl del tubo 3.12 µg/ml + 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 seg.

-**[0.78 µg/ml]:**250 µl del tubo 1.56 µg/ml+ 250 µl de metanol / agitar en vórtex 60 segundos (Desechar 250 µl)

-Agregar 50 µl de la solución madre de dipirona a los tubos de diferentes concentraciones, excepto a los estándares y agitar nuevamente en vórtex por 60 segundos.

-Colocar a todos los tubos tapones de papel aluminio perforados, dejar evaporar el metanol por 24 horas.

ANEXO 8

Glosario.

Analíto: Sustancia (química, física o biológica) buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método.

Blanco matriz: Matriz que no contiene el analíto de interés u objetivo para el método seleccionado.

Testigo reactivo o blanco: Es la solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos. Volúmenes y concentraciones, que son utilizados en el procesamiento de la muestra. Este blanco debe seguir todos los pasos indicados en la técnica y ayuda a detectar trazas de contaminación provenientes del material o reactivos usados.

Calibración: Operación que, en condiciones especificadas, establece primero una relación entre los valores con incertidumbres de medición proporcionados por las normas de medición y las indicaciones correspondientes con las incertidumbres de medición asociadas, y utiliza luego esta información para establecer una relación a fin de obtener un resultado de medición a partir de una indicación. (Referencia: VIM, JCGM 200:2008)

Material de Referencia (MR): Material suficientemente homogéneo y estable con propiedades especificadas, que se ha establecido es idóneo para uso en la medición o en el análisis de las propiedades nominales. (Referencia: VIM, JCGM 200:2008)

Método de ensayo validado: Método de ensayo aceptado para el que se han llevado a cabo estudios de validación (desempeño) con el fin de determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico. (Referencia: ICCVAM Guidelines for the nomination and submission of new, revised and alternative test methods, 2003).

Método cualitativo: Método que permite determinar la presencia o ausencia de un analíto en una muestra o matriz.

Método cuantitativo: Método que permite determinar la concentración de un analíto presente en una muestra o matriz.

Plan de Validación: Documento tipo protocolo en el cual se definen las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método.

Requerimiento del método: Corresponde a aquellas características del métodos que son esenciales para poder aplicarlo para el fin previsto. Cuando no están establecidas por el cliente o usuario, debe definir las el responsable del ensayo de manera confiable y científica.

Resolución: Parámetro cromatográfico que permite determinar la capacidad de separación entre 2 picos, de manera que se puedan diferenciar adecuadamente de la cromatografía los analítos de interés.

Validación: Verificación de determinados parámetros de un método en la que los requisitos especificados para estos, demuestran que el método es idóneo para un uso previsto. (Referencia: VIM, International Vocabulary for Basic and General Terms in Metrology: 2007)

Bibliografía:

- ¹ Luis cuadra, "cromatografía líquida de alta eficacia", México, diciembre de 2001, paginas 1-57
- ² Kohtaro Matsuo,† Albert B. DeMilo,‡ Robert F. W. Schroder and Phyllis A. W. Martin, "Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method To Quantitate Elaterinide in Juice and Reconstituted Residues from a Bitter Mutant of Hawkesbury Watermelon", Plant Sciences Institute, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland 20705 *J. Agric. Food Chem. USA*, 1999. Pag 24-29
- ³ Mc Master, Marvin (1994) HPLC: A Practical User's Guide. Wiley-VCH. Pag 2-9
- ⁴ Sandoval Guzmán Benjamín "Apuntes de Curso de cromatografía Líquida de Alta Resolución" Laboratorio de Biofarmacia y farmacocinética, BUAP, México, octubre de 2012, página 1-69
- ⁵ Skoog, Douglas A. y Leary, James J. (1994), Análisis Instrumental, Madrid: editorial McGraw-Hill. Pag 55-61
- ⁶ Boris Duffau, Fabiola Rojas, Isabel Guerrero, Luis Roa, Luis Rodríguez, Marcelo Soto, Marisol Aguilera, Soraya Sandoval. "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre validación de métodos", instituto de salud pública, Santiago de Chile, diciembre de 2010.
- ⁷ Proyecto de norma técnica que establece las guías generales de validación. Comité General de Validación; DIGESIS.
- ⁸ Guillermo Vega Rodríguez, criterios para la validación de métodos fisicoquímicos (clave: CCAYAC-P-058), comisión de control analítico y ampliación de cobertura, secretaria de salud, México, febrero de 2011, paginas 1-20
- ⁹ Jose Angel Arguedas Quezada, "cefalosporinas", www.ampmd.com, octubre de 2008.pagina 35-39
- ¹⁰ <http://www.vademecum.es/principios-activos-cefotaxima-j01dd01>
- ¹¹ Joachim E. "Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001. Pag. 11-17

- ¹² Martin – Smith M, Rudd DR. “The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals products”. *Acta Pharm J*, 1990.pag 107-118
- ¹³ Camacho MA. Torres AI, Gil ME, Obregon MM, Ruz V. “Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products”. *ATM Pharma Practique* 1993. Pag 38-44
- ¹⁴ Calpena AC, Escribano E, Fernandez C. “Validacion de métodos analíticos” *J. Farmacia clínica*, 1990. Pag. 1-16
- ¹⁵ Rampazoo P. “Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry”. 1990. Pag 1-74
- ¹⁶ DeSain C. Master method validation protocols. *Biopharm*, 1992. Pag 22-41
- ¹⁷ Martínez C, Agundez JAG, Olivera M, Llerena A, Ramírez R, Hernández M, Benitez J. “Influence of genetic admixture on polymorphisms of drug metabolizing enzymes. Analyses of mutations on *NAT2* and *CYP2E1* genes in a mixed hispanic population”. *Clin Pharmacol Ther, USA*, 1998. Pag 2-31
- ¹⁸ British Standard No. BS 5497. “Precision of test methods”, 1979. Pag 1284-1292
- ¹⁹ United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopeia. 22 ed. Easton: Mack Printing, 1990.
- ²⁰ Esquivel Soto Edgar Ernesto, Leal Guadarrama Lidia Irene, “Cromatografía de fase reversa”, Instituto de Biotecnología, UNAM, México, Junio 2004. pag 1-70
- ²¹ arribas Ignacio Andrés, variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos, México, pag 17- 21
- ²² cabaleiro teresa, abad santos francisco, “Farmacogenetica: presente y futuro”, universidad autónoma de Madrid, volumen 9, España, marzo 2011, pag 13-18.
- ²³ Goodman y Gilman “las bases farmacológicas de la terapéutica”, 12 edición, editorial MC Graw Hill
- ²⁴ Caroline Ashley and Aileen corode, “the renal drug handbook”, Radcliffe publishing, 3a edition, oxford New York 2009 page 128