



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO DE CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS  
FASE REVERSA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CIPROFLOXACINA EN PLASMA  
DE PRIMATE

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
PRESENTA:

JUAN CARLOS RAMÍREZ TAPIA

DIRECTOR DE TESIS  
M. en F. LETICIA CRUZ ANTONIO

MÉXICO, D.F. 2005



m345424



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE  
FARMACOCINÉTICA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
CAMINA PROYECTO PARA CURAR LA PARÁLISIS.

---



---

**TABLA DE CONTENIDO**

	Página.
I      Introducción	4
II.     Fundamentación teórica	6
1 0 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	6
1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa	9
1.1.1 Formas de Cromatografía en Fase Reversa.	10
1.1.1.1 Cromatografía de apareamiento iónico.	11
1.2 Nomenclatura utilizada en la cromatografía de líquidos de alta resolución	12
1.2.1 Cromatograma	12
1.2.2 Tiempo de retención	13
1.2.3 Tiempo de retención neto relativo	13
1.2.4 Número de platos teóricos	13
1.2.5 Resolución	14
1.2.6 Selectividad	14
1.2.7 Factor de capacidad	15
1.2.8 Factor de asimetría	15
1 3 Componentes de un sistema cromatográfico	16
1.3.1 Recipiente para la fase móvil	17
1.3.2 Bomba	17
1.3.3 Inyector	18
1.3.4 Columna	19
1.3.5 Detector	19
1.3.6 Fase móvil	23
2 0 Validación de métodos Bioanalíticos	26
2.1 Selectividad	28
2.2 Curva de calibración	28
2.3 Límite de cuantificación	29
2.4 Exactitud y Precisión	30
2.4.1 Exactitud	30
2.4.2 Precisión	30
2.4.2.1 Repetibilidad	30

2.4.2.2	Reproducibilidad intra-laboratorio	30
2.5	Estabilidad de la muestra	31
2.5.1	Condiciones de almacenamiento	31
2.5.2	Ciclos de congelación y descongelación	31
2.5.3	Estabilidad a corto plazo	32
2.5.4	Estabilidad de la muestra procesada	32
2.5.5	Tolerancia	32
3.0	Ciprofloxacina	33
3.1	Descripción	33
3.2	Solubilidad	33
3.3	Indicación terapéutica y usos	34
3.4	Farmacocinética y farmacodinamia en humanos	35
III	Planteamiento del problema	37
IV	Objetivos	39
V	Hipótesis	40
VI	Desarrollo Experimental	41
6.1	Material	41
6.2	Equipos e instrumentos	41
6.3	Reactivos	42
6.4	Parte experimental	42
6.4.1	Metodo analítico propuesto para la validación	42
6.4.1.1	Sistema cromatográfico	42
6.4.1.2	Fase móvil	42
6.4.1.3	Preparación de soluciones de referencia y ácido perclórico	43
6.4.1.4	Curva de calibración propuesta	43
6.5	Validación del método analítico	44
6.5.1	Linealidad del sistema	44
6.5.2	Selectividad	44
6.5.3	Curva de calibración	45
6.5.4	Límite de cuantificación	45
6.5.5	Precisión	45
6.5.5.1	Repetibilidad	45
6.5.5.2	Reproducibilidad intra-laboratorio	46

---

	6.5.5.3 Exactitud	47
	6.5.6 Estabilidad de la muestra	47
	6.5.6.1 Estabilidad de la muestra procesada	47
	6.5.6.2 Ciclos de congelación-descongelación	47
	6.5.6.3 Estabilidad a corto plazo	48
VII	Resultados y análisis de resultados	49
	7.1 Linealidad del sistema	50
	7.2 Selectividad	52
	7.3 Curva de calibración	54
	7.4 Limite de cuantificación	56
	7.5 Precisión	57
	7.5.1 Repetibilidad	57
	7.5.2 Reproducibilidad intra-laboratorio	57
	7.5.3 Exactitud	59
	7.6 Estabilidad de la muestra	60
	7.6.1 Estabilidad de la muestra procesada	61
	7.6.2 Ciclos de congelación-descongelación	62
	7.7 Aplicación del método analítico	63
VIII	Conclusiones	67
IX	Ventajas, desventajas y sugerencias	68
X	Bibliografía	69

---

## 1. INTRODUCCIÓN.

La ciprofloxacina es un antibacteriano del grupo de las quinolonas, efectivo contra un amplio espectro de patógenos grampositivos y gramnegativos cuyo mecanismo de acción disminuye el riesgo de resistencia bacteriana, ya que inhibe la DNA girasa lo que causa interferencia del DNA, y evita la transcripción y replicación bacteriana. La ciprofloxacina difiere de otros fármacos del grupo de las quinolonas en que esta posee un grupo ciclopropil en la posición uno, lo que le confiere una mayor actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas y gramnegativas.

En el Centro de Investigación CAMINA una de sus líneas de investigación es la evaluación del impacto de la lesión traumática de la médula espinal sobre la farmacocinética de fármacos, actualmente se pretende llevar a cabo una investigación preclínica sobre las alteraciones farmacocinéticas que sufren los primates después de administrar medicamentos post-lesión quirúrgica, en etapa aguda y crónica de la lesión.

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente.

Los métodos analíticos selectivos y sensitivos para la evaluación cuantitativa de fármacos y otros metabolitos (analitos) son críticos para la conducta sucesiva de estudios farmacológicos preclínicos, clínicos y/o biofarmacéuticos.

Los métodos publicados para análisis son frecuentemente modificados para adecuar los requerimientos del laboratorio que ejecuta el ensayo. Estas modificaciones tienen que ser validadas para asegurar el adecuado funcionamiento del método analítico.

Cuando los cambios se hacen previamente al método validado, el analista tiene el ejercicio de juzgar que tan necesario es realizar una validación adicional. Durante el curso del programa de desarrollo del fármaco típico, se define el método analítico bajo muchas modificaciones. Los cambios evolutivos son el soporte de estudios específicos y niveles diferentes de validación demuestran la ejecución de ensayos validados.

En este estudio se realizó la validación de un método analítico por cromatografía de líquidos fase reversa para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate, siguiendo los lineamientos que marca la NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un método analítico utilizado para la cuantificación de un fármaco en un fluido biológico es confiable. Esta validación además servirá como soporte para la obtención de resultados confiables en las investigaciones realizadas en el Centro de Investigación CAMINA donde la determinación de ciprofloxacina está involucrada.



---

## II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

### 1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.<sup>1,2,3,4</sup>

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

La Cromatografía de líquidos de alta resolución ha tenido una creciente difusión y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico. La cromatografía es un método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve

La cromatografía de líquidos es, en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo de mayor ó menor complejidad. En el caso más simple el cromatógrafo de líquidos está constituido por:

- ✓ Un contenedor de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- ✓ Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- ✓ Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- ✓ Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.

- ✓ Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil de líquidos. Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. La cromatografía de líquidos de alta resolución tiene ventajas diferenciadas sobre la cromatografía de gases para el análisis de los compuestos orgánicos. Los compuestos a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aún siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse por cromatografía sin descomposición o necesidad de hacer derivados volátiles.

Existen varios tipos de separación según la naturaleza de la muestra y los eluentes usados. Básicamente, se cambia el empaque de la columna para cada mecanismo. Los mecanismos de separación se pueden clasificar de la siguiente manera:

- ✓ Adsorción: lo más sencillo, aplicaciones reducidas.
- ✓ Partición (Fase normal o reversa): muy usado.
- ✓ Intercambio iónico: más complicado pero muy útil para análisis de productos ionizables.
- ✓ Exclusión: muy usado para análisis de moléculas de alto peso molecular.
- ✓ Separación por Adsorción.

La adsorción de los productos de la muestra sobre el empaque se hace por intermedio de fuerzas electrostáticas tipo de Van der Waals o puente de hidrógeno, existe una competición entre los solutos y el solvente, los productos no polares, que no tienden a formar puentes de hidrógeno con los

grupos -OH son menos retenidos que los productos polares, en esta separación se utilizan eluentes poco polares para evitar demasiada competencia con los solutos y una degradación del empaque.

✓ Separación por partición.

La separación se realiza gracias a la competencia de afinidad que existe para un producto entre la fase móvil y la fase estacionaria, el desarrollo de las dos técnicas de separación ( fase normal o fase reversa) depende de las propiedades de los solutos a separar.

Fase normal. La fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares

Fase reversa. La fase estacionaria es de naturaleza no polar (hidrocarburo), mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua con un modificador orgánico. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención, con esta técnica se tiene la posibilidad de separar productos no polares, polares ionizados y productos ionizables, por sus amplias posibilidades de separación es la técnica más usada en la Cromatografía de líquidos de alta resolución. Si el producto es un ácido débil, se baja el pH para trabajar con el producto protonado, si el producto es una base débil, se aumenta el pH para trabajar con el producto no protonado esta técnica se llama "Supresión de Ión". Para ácidos o bases fuertes o para productos ionizados sin propiedad ácido-básica, se usa la técnica de "Par iónico" en donde se forma un producto globalmente neutro usando un contraión (ejemplo de contraiones: aminas cuaternarias, alquilsulfatos).

✓ Separación por intercambio iónico.

La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución. Ejemplo si el producto es catiónico, se usa una resina aniónica: Ej.  $-\text{SO}_3^-$  grupo sulfonilo, y si el producto es aniónico, se usa una resina catiónica: Ej.  $-\text{NR}_4^+$  grupo tetraalkilamónio.

✓ Separación por Exclusión.

Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funcionan como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas según el orden decreciente de tamaño molecular, así pues las moléculas más grandes son las primeras en eluir y las más pequeñas son las últimas. Se aplica a moléculas de tamaño grande (peso molecular mayor a 2000) generalmente tiene su aplicación en poli estirenos, polímeros de vinil Ester, silicones y proteínas.

### 1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa.<sup>2</sup>

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave la silicagel (como también la alúmina) es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria.

Empleando solventes no polares la retención será mayor en silicagel sin agua adsorbida y la retención disminuirá con el aumento del agua adsorbida al relleno. La

consecuencia de esto es clara. Para conseguir resultados reproducibles en fase normal, se debe controlar rigurosamente la humedad de los solventes, lo cual no resulta tan sencillo. Con esta y otras dificultades que se presentan en fase normal llevaron las preferencias del analista hacia otro tipo de material, en el cual la reactividad de los grupos activos en términos cromatográficos no fuera tan intensa y donde el contenido de agua no incidiera de tal forma en los resultados.

En la actualidad, probablemente más del 70% de los análisis de cromatografía de líquidos se efectúan en fase reversa. A pesar de haber sido ampliamente estudiado, aún no se comprende totalmente el mecanismo de retención en fase reversa. Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos: partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa tiene marcadas ventajas, de las cuales pueden mencionarse que compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil; La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil, la adsorción irreversible raramente ocurre, la fase móvil predominantemente es agua, el orden de elusión es predecible en función de la hidrofobicidad del compuesto a analizar.

### **1.1.1. Formas de Cromatografía en fase reversa.<sup>2</sup>**

La cromatografía en fase reversa puede clasificarse, según su forma operativa en:

- Cromatografía de Partición Simple.
- Control de la ionización (Supresión Iónica).
- Cromatografía de Apareamiento Iónico.

- Complejación con iones metálicos.
- Fase reversa en medio no acuoso.

Se describe a continuación la cromatografía de apareamiento iónico que es el tipo de cromatografía utilizada durante la realización de este trabajo.

#### **1.1.1.1. Cromatografía de Apareamiento Iónico. <sup>4</sup>**

Frecuentemente nos encontramos con estructuras demasiado solubles en agua para ser analizadas por las técnicas convencionales de intercambio iónico. Bases o ácidos orgánicos que se mantienen en forma iónica dentro de los rangos de pH habituales o recomendados para preservar la integridad del relleno de fase reversa. Estos casos no pueden ser resueltos por control de la ionización, ya que llegar a la forma no iónica implicaría un pH demasiado ácido como para evitar la hidrólisis de la fase ligada o demasiado alcalino para evitar la disolución de la silicagel. En estos casos, es preferible mantener el estado iónico del compuesto de interés, aplicando la cromatografía de apareamiento iónico.

En este tipo de cromatografía, la fase móvil contiene un contraión, es decir, una especie química de carga opuesta a la del compuesto de interés. Puede suponerse, en un modelo muy simplificado, que el compuesto de interés y el contraión forman un complejo "neutro" que se transporta como tal dentro de la columna, ocurriendo un equilibrio de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Debe procurarse que el compuesto de interés esté en su forma iónica (necesaria para el apareamiento), regulando el pH a 6.5-7.5 para el tratamiento de ácidos y a pH de 2.5-3.5 para el de las bases.

El tipo de contraión dependerá de la funcionalidad del compuesto de interés. Para las bases, formadoras de cationes, se emplean contraiones aniónicos, en especial alquilsulfonatos (butil a dodecil sulfonato de sodio) y para los ácidos formadores de aniones, compuestos de alquil amonio (tetrabutil, tetraetil, tetrametil amonio, o trimetil alquilamonio).

## **1.2. Nomenclatura utilizada en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.<sup>2,3,5,6</sup>**

La nomenclatura en la cromatografía fue estandarizada por la American Society for Testing and Materials, ASTM y la International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC, y es naturalmente materia de constante debate y actualización. A continuación se describe brevemente los conceptos más utilizados en la cromatografía.

**1.2.1. Cromatograma.** El concepto actual corresponde según IUPAC a un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como medida de la concentración del efluente, versus el volumen del efluente o tiempo. Así en un cromatograma las abscisas corresponden al tiempo durante el cual se efectúa la medición. Si el caudal es constante, la proporcionalidad entre tiempo y volumen de elusión es directa. Las ordenadas corresponden a la señal analógica proveniente del detector y su significado dependerá del tipo de medición efectuada (absorción, índice de refracción, fluorescencia, etc). La altura de la señal indica en cada momento la intensidad de la respuesta, en general proporcional a la concentración del soluto la cuál se evalúa por medición manual o electrónica (área bajo la curva o altura del pico). Idealmente el pico tiene distribución normal, aunque algunos fenómenos pueden provocar el alejamiento de esta

condición y no es infrecuente encontrar asimetrías de mayor o menor intensidad.

**1.2.2. Tiempo de Retención ( $t_r$ ).** Es el tiempo que se queda un soluto en el sistema antes de pasar por el detector. Es característico de un producto dado y se toma al máximo del pico representativo de este producto. En otras palabras es el tiempo medido entre la inyección y la elusión de la concentración máxima de soluto (máxima señal). Cuando la muestra no experimenta ninguna interacción con la fase estacionaria, esta pasa sin ninguna retención y entonces dice que eluye en el volumen vacío o tiempo muerto de la columna.

**1.2.3. Tiempo de Retención neto o relativo ( $t_n$ ).** Es la diferencia del tiempo de retención del compuesto de interés y el tiempo muerto, que se calcula por la ecuación

$$t_n = t - t_m$$

donde:

$t_n$  = Tiempo de retención neto o relativo.

$t$  = Tiempo de retención de la muestra.

$t_m$  = Tiempo de retención de una sustancia no retenida (tiempo muerto).

**1.2.4. Número de platos teóricos (N).** Un plato teórico, es un corte imaginario dentro de la columna, donde se alcanza el equilibrio transitorio de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y se determina de acuerdo con la fórmula



$$N = 16 (tW)^2 \quad \text{ó} \quad N = 16 (t / W_{h/2})^2$$

donde:

- N = Número de platos teóricos.  
t = Tiempo de retención de la sustancia  
W = Ancho del pico en su base, obtenido al extrapolar los lados Relativamente rectos del pico con la línea base.  
W h/2 = Ancho máximo a media altura.

**1.2.5. Resolución (Rs).** Es una medida cuantitativa del grado de separación de dos componentes en una mezcla. Se expresa como el cociente entre la distancia del punto máximo de los dos picos y el valor medio de la anchura del pico en la base.

$$Rs = 2 (t_2 - t_1) / W_2 + W_1$$

donde.

- Rs = Resolución  
T1 y t2 = Tiempos de retención de los dos componentes  
W1 y W2 = Anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos de los picos con la línea base.

**1.2.6. Selectividad ( $\alpha$ ).** Es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Su valor debe encontrarse entre 1.0 y 2.0 se expresa como

$$\alpha = t_1 - t_m / t_2 - t_m$$

donde:

$\alpha$  = Selectividad

$t_1$  y  $t_2$  = Tiempo de retención del soluto 1 y 2

$t_m$  = Tiempo muerto

**1.2.7. Factor de capacidad (  $K'$  ).** La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo  $t$ , mientras  $t_m$  representa el tiempo en el que el soluto permanece en la fase móvil; por lo tanto el cociente entre ambos nos dará el valor de  $K'$  y su valor esta generalmente entre 1 y 10. se calcula de la siguiente manera

$$K' = t_r - t_m / t_m$$

donde:

$K'$  = Factor de capacidad

$t_r$  = tiempo de retención del compuesto

$t_m$  = Tiempo muerto.

**1.2.8. Factor de asimetría. (  $T$  ).** Es una medida de la asimetría del pico, tiene un valor de uno para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta o disminuye a medida que la asimetría es más pronunciada, se calcula con la siguiente formula:

$$T = W_{0.05} / 2 f$$

donde:

- T = Factor de asimetría
- $W_{0.05}$  = Ancho del pico al 5 % de su altura en centímetros
- F = Trazando una línea perpendicular a la línea base desde el vértice del pico, f es el ancho desde esa línea hasta el lado izquierdo del pico, al 5 % de la altura de este en centímetros.

### **1.3. Componentes de un sistema cromatográfico.<sup>2,3</sup>**

Básicamente, los equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes ( recipiente para solventes, bomba, inyector y detector ) están reunidas en un gabinete y su intercambio ó conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables tuberías y conexiones expuestas y quizás menos riesgos frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe. la visualización de cada componente permite no solo el mejor conocimiento y control visual del equipo, sino el mejor aislamiento y resolución de problemas cuando estos se producen.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son: una bomba que permite el transporte bajo presión de la fase móvil, un dispositivo de inyección que permita la introducción de la muestra al sistema , una columna que es el lugar en donde ocurre la separación y un detector que es el sistema que reconoce los productos de la muestra y permite analizarlos por medio de un sistema de datos donde se realiza un resguardo de todos los cromatogramas emitidos para posteriormente recuperarlos y realizar el tratamiento de datos.

### **1.3.1 Recipiente para la fase móvil.<sup>2,4</sup>**

Este es el recipiente que contiene la fase móvil y en general se ubica algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta, manteniendo llenas las conexiones.

Puede emplearse cualquier frasco de laboratorio de buena calidad ( de vidrio ó polímero resistente ), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema, la capacidad del frasco depende, del consumo esperado pudiendo ser desde pocos mililitros hasta varios litros. Al extremo del tubo de entrada del disolvente se conecta un filtro de acero con 2 a 10 micras de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

### **1.3.2 Bomba.<sup>2,3</sup>**

Las bombas impulsan la fase móvil hacia el inyector, y desde allí hacia la columna, su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Básicamente existen dos tipos de bombas las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento positivo (bombas jeringa), en las primeras el pistón se conecta al motor del equipo por medio de engranajes, y en su movimiento hacia adelante impulsa el disolvente despejando una esfera de rubí de su asiento de zafiro, y abriendo de esta forma la válvula de salida, y en las de jeringa el disolvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia delante del pistón.

Las bombas para HPLC tienen las siguientes características:

- Operan con caudales entre 0.1 y 10 ml/min.
- Trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- Tienen buena reproducibilidad y constancia en el flujo.

- Resistente a líquidos corrosivos.
- Tienen un sistema de corte que sirve de protección para evitar los excesos de presión.

### **1.3.3 Inyector.<sup>2,3,6</sup>**

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de disolvente a través del sistema, el inyector debe reunir una serie de características importantes entre ellas:

- debe ser de fácil operación.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Existen dos tipos de inyectores, manuales y automáticos.

Características del Inyector Manual:

- La muestra se introduce manualmente con una jeringa.
- 2 posiciones: carga e inyección.
- Se utiliza un loop (Manguera de acero de un volumen preciso predeterminado, correspondiendo al volumen de inyección.)
- El loop se limpia manualmente.

Características del Inyector Automático

- La inyección es automática.
- El sistema es autónomo y funciona un largo tiempo sin necesidad de mantenimiento

- Se utiliza un loop.
- El loop se lava automáticamente.
- La repetibilidad y la reproducibilidad son muy altas.
- Contienen un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja los viales donde se colocan las muestras.

#### **1.3.4 Columna.<sup>2,3</sup>**

Es la parte más importante del equipo, pues en ella se lleva a cabo la separación. Las características de la columna, como el material de empaque, las dimensiones etc., dependerán del tipo de separación que se quiera hacer. El empaque esta constituido por partículas de tamaño más o menos grande. Los empaques de diámetro promedio chico ( $3\mu\text{m}$ ) permiten una separación más fina que los empaques de diámetro grande ( $10\mu\text{m}$ ) que permiten una separación más rápida.

Químicamente pueden definirse como un Oxido de silicio hidratado, de tipo  $(\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ , en el cual sus átomos metálicos están ligados entre si por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales a grupos hidroxilo, constituyendo los grupos silanoles (Si-OH). Estos silanoles pueden ser de tipo libre, vecinal o germinal y son los responsables de la actividad superficial.

El relleno idealmente debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir solo pequeñas caídas de presión y ser económico.

#### **1.3.5 Detector.<sup>2,3,4,6</sup>**

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica

Los detectores deben reunir ciertas características, entre ellas están:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena señal / ruido.
- No destruir la muestra.
- Tener una constante de tiempo baja.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos.

a) Detectores generales.

Miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el compuesto de interés en comparación con la misma fase móvil pura.

- Detector de Índice de refracción.

Mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra, es no destructivo de la muestra y es muy útil para productos invisibles en UV o fluorescencia. Es muy sensible y se ve afectado por ligeros cambios de temperatura, lo cual limita su campo de aplicación. Es incompatible con técnicas de gradiente.

- Detector de Conductividad.

Se usa para la detección de algunos solutos iónicos en fases móviles acuosas, su respuesta depende de la temperatura, por lo que esta debe de controlarse, y también le afecta la velocidad de flujo de la fase móvil.

b) Detectores selectivos.

Son aquellos sensibles a alguna propiedad específica del soluto.

- Detector UV.

Es el detector más empleado en cromatografía de líquidos de alta resolución, gracias a que posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar al compuesto de interés en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. La concentración del compuesto de interés en la muestra se determina por la aplicación de la ley de Beer:  $A = abC$ , donde  $A$  es la absorbancia,  $a$  es la absorptividad molar del compuesto de interés,  $b$  es el camino óptico de la celda medido en centímetros y  $C$  es la concentración del compuesto de interés en la muestra expresada en moles / litro.

Existen tres tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija, de onda variable y de arreglo de foto diodos.

- Detector de onda fija.

Opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio a baja presión. Como longitudes de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de mercurio, especialmente la fuerte línea de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia.

-  
-  
-



- Detector de onda variable.

Posee una red de difracción que permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Podremos así, elegir la longitud de onda de máxima absorción del compuesto de interés para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea una lámpara de emisión continua de Deuterio o de Xenón.

- Detector de arreglo de fotodiodos.

Se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos montados sobre un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del compuesto de interés.

- Detector de fluorescencia

Se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierten en un detector adecuado para el análisis de trazas. La lámpara de Xenón es la fuente de emisión más ampliamente difundida por producir un espectro continuo en el rango de 260 a 660 nm y de muy alta intensidad. La detección se hace por emisión de una longitud de onda y recuperación de una luz reemitida cuando la muestra fluorescente pasa por el detector (una molécula es fluorescente cuando, excitada a una cierta longitud de onda, es capaz de reemitir luz a otra longitud de onda).

- Detector electroquímico.

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector UV y altamente selectivo. La selectividad se debe, no solo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados o reducidos, sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

La detección de compuestos electrooxidables ó electroreducibles ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del eluido de la columna. Este detector emplea tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar.

Su principal limitación esta dada por el tipo de fase móvil a emplear que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa o de intercambio iónico.

### **1.3.6 Fase móvil.<sup>2,3,4</sup>**

La fase móvil en cromatografía de líquidos de alta resolución cumple un papel fundamental, ya que puede por si misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal, y es a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase reversa, y es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan solo variando la composición de la fase móvil.

Se debe tener en cuenta que no todos los disolventes son adecuados para trabajar en cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por si misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un disolvente apropiado para cromatografía de líquidos de alta resolución

debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras.

La muestra a inyectar debe estar completamente disuelta y es conveniente que el disolvente de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el disolvente de la muestra y la fase móvil por la posible precipitación de los componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil.

- Baja reactividad.

Los disolventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

- Compatibilidad con el detector utilizado.

Teniendo en cuenta que el detector más ampliamente difundido en cromatografía de líquidos de alta resolución es el espectrofotométrico, es habitual elegir un disolvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo y que no contenga impurezas que puedan aumentar la absorbancia.

- Adecuado punto de ebullición.

En general se prefieren los disolventes con punto de ebullición intermedio. Si el disolvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general con alta viscosidad.

- Baja viscosidad.

La viscosidad de los disolventes esta estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con disolventes viscosos, se reduce la permeabilidad de la columna, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Seguridad.

En la cromatografía de líquidos de alta resolución, como en cualquier otro método analítico, debe evitarse el empleo de disolventes que por sus características, representen un serio riesgo para el operador.

- Alto grado de pureza.

La presencia de impurezas puede inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y contribuir a una señal de base importante en el detector.

- Disolventes y aditivos de fase reversa.

Las fases móviles de fase reversa están constituidas por mezclas de disolventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano), con o sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico).

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Otros aditivos comunes son los reactivos de apareamiento iónico, empleados para el análisis de sustancias orgánicas iónicas o ionizables. Básicamente existen dos tipos de reactivos de apareamiento iónico: las sales de tetraalquilamonio empleadas para el análisis de solutos ácidos y

los alquilsulfonatos, para los solutos básicos. Estos aditivos, al igual que los disolventes, deberán tener un alto grado de pureza.

## **2.0 Validación de métodos bioanalíticos.**<sup>7,8,9</sup>

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas de un estudio de bioequivalencia deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente, como es el caso de los métodos basados en técnicas inmunológicas u otras.

Los métodos analíticos selectivos y sensitivos para la evaluación cuantitativa de fármacos y otros metabolitos (analitos) son críticos para la conducta sucesiva de estudios farmacológicos preclínicos, clínicos y/o biofarmaceuticos. La validación de métodos bioanalíticos incluye todos los procedimientos para demostrar que un método particular usado para medir cuantitativamente los analitos administrados dentro de la matriz biológica es confiable, los parámetros para esta validación incluye (1) Exactitud, (2) Precisión, (3) Selectividad, (4) Sensibilidad, (5) Reproducibilidad y (6) Estabilidad. La validación implica documentación, para el uso en investigaciones de laboratorio, el cumplimiento de características del método deben ser adecuadas y confiables para la aplicación analítica propuesta y la aceptabilidad de los datos analíticos corresponde directamente del criterio usado para validar el método.

Métodos publicados para análisis de fármacos y/o metabolitos en fluidos biológicos son frecuentemente modificados para adecuar los requerimientos del laboratorio que ejecuta el ensayo. Estas modificaciones deben ser validadas para asegurar el adecuado funcionamiento del método analítico. Cuando los cambios se hacen previamente al método validado, el analista tiene el ejercicio de juzgar que tan necesario es una validación adicional

Diferentes tipos y niveles de validación se pueden definir y caracterizar como sigue:

- Validación Completa.

La validación completa es importante cuando se desarrollan e implementan métodos bioanalíticos por primera vez. Este tipo de validación es importante para nuevos fármacos.

- Validación Parcial.

La validación parcial son modificaciones realizadas a los métodos bioanalíticos validados, puede extenderse a partir de un pequeño intra-ensayo en la determinación de exactitud y precisión de una validación casi completa. Típicamente los cambios en los métodos bioanalíticos caen dentro de las siguientes clasificaciones:

- ✓ Transferencia de métodos bioanalíticos entre laboratorios.
- ✓ Cambios en la metodología analítica (Ej Cambio en el sistema de detección).
- ✓ Cambio en el anticoagulante del fluido biológico recolectado.
- ✓ Cambio en la matriz de la especie (Ej. Plasma de rata a plasma de ratón).
- ✓ Cambio relevante en el rango de concentración.
- ✓ Matrices poco comunes.
- ✓ Demostración de selectividad de el analito en presencia de medicación concomitante.
- ✓ Demostración de selectividad del analito en presencia de metabolitos específicos.

- Validación Cruzada.

Es una comparación de parámetros de validación cuando dos o más métodos bioanalíticos son usados para generar información dentro de un mismo estudio o a través de diferentes estudios. Un ejemplo de validación cruzada es cuando una

situación de un método bioanalítico validado es útil como referencia y es usado como comparador.

Cuando las muestras analizadas dentro de un estudio único es conducida a más de un sitio o más de un laboratorio, la validación cruzada con matriz estándar y sujetos muestra deben ser conducidos a cada sitio o laboratorios para establecer la confiabilidad inter laboratorio.

La validación del método deberá incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

### **2.1 Selectividad.**

La selectividad es la habilidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito con la presencia de otros componentes dentro de la muestra.

Se evalúa al analizar muestras blanco de la matriz biológica de por lo menos seis donadores. Evaluar en cada uno de los blancos, el método contra posibles interferencias en la concentración más baja de la curva de calibración por ejemplo compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante. No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

### **2.2 Curva de calibración.**

Una curva estándar ó curva de calibración es la relación entre la respuesta del instrumento y concentraciones conocidas del analito. La curva de calibración debe ser generada para cada analito en la muestra, un número suficiente de puntos estándar debe ser usado para definir la relación entre concentración y respuesta.

La curva de calibración debe ser preparada en la misma matriz biológica que las muestras en estudio preparando la matriz con concentraciones conocidas del analito. El número de concentraciones estándar usados en la construcción de la curva de calibración esta en función del rango anticipado de valores analíticos y la naturaleza

de la relación entre analito y respuesta.

Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima de la curva de calibración. Se deberá definir un modelo que describa adecuadamente la relación entre la concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración. Las siguientes condiciones deben cumplirse en el desarrollo de la curva de calibración:

- 20% de desviación en el límite de cuantificación a partir de la concentración nominal.
- 15% de desviación de otros estándares a partir de la concentración nominal.

### **2.3 Límite de cuantificación.**

El estándar inferior de la curva de calibración es aceptado como límite de cuantificación de acuerdo a las siguientes condiciones:

- La respuesta del analito en el límite de cuantificación es mínimo cinco veces mayor comparado con la respuesta del blanco.
- El pico del analito (respuesta) debe ser identificable, discreto y reproducible con una precisión del 20% y exactitud de 80-120%.

Analizar por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20% para métodos cromatográficos.



## 2.4 Exactitud y Precisión.

### 2.4.1 Exactitud

La exactitud del método analítico describe la proximidad del promedio de los resultados obtenidos por el método del valor exacto (concentración) del analito.

La exactitud tiene que ser medida usando un mínimo de cinco determinaciones por concentración, un mínimo de tres concentraciones dentro del rango de concentración esperado es recomendado. El valor promedio esta dentro del 15% del valor actual excepto en el límite de cuantificación donde no tiene que desviarse más del 20%. la desviación del promedio a partir del valor real sirve para medir la exactitud.

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración en métodos cromatográficos.<sup>(8)</sup>

### 2.4.2 Precisión

Describe la proximidad de medidas individuales de un analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de volúmenes homogéneos solos de la matriz biológica. Se determina como:

#### 2.4.2.1 Repetibilidad.

Analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración y deben estar incluidas en la curva de calibración. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% en métodos cromatográficos.

#### 2.4.2.2 Reproducibilidad intra-laboratorio.

Analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones

conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, y deben estar incluidas en el intervalo de trabajo. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% en métodos cromatográficos.

## **2.5 Estabilidad de la muestra.**

La estabilidad de fármacos en fluidos biológicos es en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz y el sistema que lo contiene. Los procedimientos de estabilidad deben evaluar la estabilidad del analito durante la colección de muestras, después de periodos largos de almacenamiento, y de ciclos de congelación y descongelación de las muestras. Las condiciones usadas en estabilidad experimental deben reflejar situaciones probables encontradas durante la preparación y análisis de muestras

Se deben determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por triplicado, a dos niveles de concentración cercanos al nivel alto y bajo de la curva de calibración, considerando al menos los siguiente:

**2.5.1 Condiciones de almacenamiento:** Evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

**2.5.2 Ciclos de congelación-descongelación:** evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar preparando al menos por triplicado muestra a un nivel bajo y alto de la curva de calibración, almacenadas a la temperatura en que estarán las

muestras reales por 24 hrs, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por 24 hrs bajo las mismas condiciones. Repetir el ciclo de congelación-descongelación dos veces más y analizar las muestras al menos en el tercer ciclo.

**2.5.3 Estabilidad a corto plazo:** se prepararán al menos por triplicado muestras al nivel bajo y alto de la curva de calibración las cuales se descongelarán y se mantendrán a temperatura ambiente durante el máximo tiempo requerido para su preparación y se analizarán posteriormente.

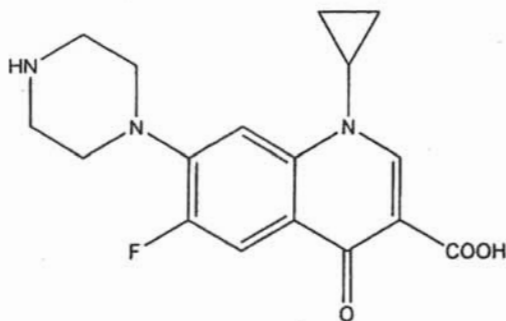
**2.5.4 Estabilidad de la muestra procesada:** Se deberá demostrar la estabilidad del compuesto de interés y del estándar interno durante el máximo tiempo que dure su análisis.

Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad expresados en los numerales 2.4.2.

**2.5.5 Tolerancia:** Evaluar la tolerancia del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones, por ejemplo: pH, fase móvil, longitud de onda, temperatura, etc., al analizar las muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica. Las modificaciones que se consideren, deben ser las que se cumplan con los criterios de exactitud y precisión.

### 3.0 Ciprofloxacina.<sup>1,12</sup>

Estructura química.



1-Ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico.

Formula condensada:



Peso Molecular

331.35 gramos/mol.

Contiene no menos del 98.0 y no más del 102.0 por ciento de ciprofloxacino clorhidrato, calculado como referencia a la sustancia seca.

#### 3.1 Descripción.

Polvo cristalino amarillo pálido.

#### 3.2 Solubilidad.

Poco soluble en agua, ligeramente soluble en ácido acético y en metanol; muy ligeramente soluble en alcohol anhidro; casi insoluble en acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, hexano y en cloruro de metileno.

### **3.3 Indicación Terapéutica y Usos.<sup>10,11,13</sup>**

Las quinolonas son agentes eficaces contra bacterias gramnegativas, y especialmente útiles para el tratamiento de las infecciones de vías urinarias, tubo digestivo y ciertas enfermedades de transmisión sexual e infecciones óseas. Penetran bien en los tejidos y alcanzan concentraciones séricas altas. Por lo general, las quinolonas son bien toleradas y causan pocos efectos adversos, pero en ocasiones los pacientes refieren molestias gastrointestinales como náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal. Son mucho menos frecuentes las reacciones del sistema nervioso central como somnolencia, cefalea, insomnio, inquietud, mareo, alteraciones visuales, y crisis convulsivas.

Debido a que las quinolonas pueden interactuar con la cafeína, la teofilina, la warfarina sódica o cationes divalentes y trivalentes como los que se encuentran en los antiácidos y el sucralfato, la administración concomitante de estos agentes debe vigilarse, ajustando la dosis según sea necesario.

Las quinolonas suelen ser menos activas que otros agentes contra microorganismos grampositivos como estreptococos y estafilococos, y en general no tienen actividad contra anaerobios. El aumento en la resistencia ha hecho que las quinolonas sean menos eficaces contra los estafilococos y ha modificado su actividad contra microorganismos gramnegativos como *Pseudomona aeruginosa*. Sin embargo, en algunos casos las quinolonas pueden combinarse con otros antibióticos para atacar a estos patógenos.

La ciprofloxacina es un antibacteriano del grupo de las quinolonas, efectivo contra un amplio espectro de patógenos grampositivos y gramnegativos cuyo mecanismo de acción disminuye el riesgo de resistencia bacteriana, ya que inhibe la DNA girasa bacteriana lo que causa interferencia del DNA, y evita la transcripción y replicación bacteriana. La ciprofloxacina difiere de otros fármacos del grupo de las quinolonas en

que esta posee un anillo ciclopropil en la posición uno, lo que le confiere una mayor actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas y gramnegativas.

Dentro de los principales usos terapéuticos de la ciprofloxacina son:

- Infecciones del tracto genitourinario: uretritis complicadas y no complicadas, cistitis, pielonefritis, prostatitis, epididimitis y gonorrea.
- Infecciones de las vías respiratorias: Bronquitis aguda, reagudización de bronquitis crónica, fibrosis quística, bronquiectasia y empiema.
- Infecciones osteoarticulares: Artritis infecciosa y osteomielitis, etcétera.
- Infecciones de la piel y tejidos blandos: Ulceras, quemaduras y heridas infectadas, abscesos, etcétera.

La acción de la ciprofloxacina alcanza el siguiente espectro bacteriano:

- Organismos grampositivos: *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* Moderadamente sensibles, *S. faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Chlamydia trachomatis*
- Organismos gramnegativos *Escherichia coli*, *Klebsiellas Pneumoniae* y *oxitoca*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Edwarsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus mirabilis* y *vulgaris*, *Providencia stuartii* y *rettgeri*, *Morganella morganii*, *Serratia*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Haemophilus influenzae* y *ducreyi*, *Neisseria gonorrhoeae* y *meningitidis*, *Branhamella catarrhalls*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Brucella melitensis*, *Pasteurella multocida* y *legionella*.

### 3.4 Farmacocinética y farmacodinamia en humanos.<sup>13,14</sup>

La ciprofloxacina actúa por inhibición de la ADN girasa bacteriana, lo que causa interferencia del DNA, evitando así la transcripción y replicación bacteriana. La absorción por vía oral es de 95%, en dos horas y de 100% en tres horas; ofrece una biodisponibilidad del  $60 \pm 12\%$  y sus concentraciones hemáticas máximas se

alcanzan aproximadamente, una hora después de su administración. Las concentraciones máximas son del rango de 1.4 a 3.6  $\mu\text{g/ml}$ . Ofrece un alto volumen de distribución y alcanza concentraciones muy superiores a las concentraciones séricas en diversos tejidos y líquidos. La vida media independientemente de la dosis es de tres a cuatro horas.

La ciprofloxacina se une a las proteínas plasmáticas en un 40%, se elimina principalmente por vía renal por filtración glomerular y excreción tubular como ciprofloxacina sin cambios y en forma de sus cuatro metabolitos activos (oxiciprofloxacina, sulfociprofloxacina, desmetilenciprofloxacina y formilciprofloxacina). La excreción urinaria es del rango de  $50 \pm 5\%$ , también puede ser eliminada por el sistema hepático biliar cuando alguno de los dos primeros mecanismos no tuviera una función correcta. Para infusión intravenosa se alcanzan concentraciones plasmáticas de 1.5 a 3.1  $\mu\text{g/ml}$  para las dosificaciones de 100 y 200 mg, respectivamente, después de la infusión intravenosa, 75% de la dosis administrada se elimina por la orina y 14% por las heces. Más del 90% de la sustancia activa es eliminada durante las 24 horas

### **III Planteamiento del problema.**

Los métodos analíticos usados para la determinación cuantitativa de fármacos y otros metabolitos en muestras biológicas juegan un papel importante en la evaluación e interpretación de la biodisponibilidad, bioequivalencia y datos farmacocinéticos. Es esencial el uso bien caracterizado de métodos completamente validados que produzcan resultados confiables que puedan ser interpretados satisfactoriamente.

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas de un estudio de bioequivalencia, biodisponibilidad y/o farmacocinética deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente. Los métodos analíticos selectivos y sensitivos para la evaluación cuantitativa de fármacos y metabolitos son críticos para la conducta sucesiva de estudios farmacológicos preclínicos, clínicos y/o biofarmacéuticos. La validación de estos métodos incluye todos los procedimientos para demostrar que un método particular usado para medir cuantitativamente los analitos administrados dentro de la matriz biológica es confiable.

En el Centro de Investigación CAMINA una de sus líneas de investigación es la evaluación del impacto de la lesión traumática de la médula espinal sobre la farmacocinética de fármacos, actualmente se pretende llevar a cabo una investigación preclínica sobre las alteraciones farmacocinéticas que sufren los primates después de administrar medicamentos (un fármaco analgésico no esterooidal y una fluoroquinolona) post-lesión quirúrgica. (lesión medular), en etapa aguda y crónica de la lesión. Por lo que surge la necesidad de validar un método analítico por cromatografía de líquidos de fase reversa para la cuantificación de ciprofloxacina en



plasma de primate, que cumpla con los requisitos que marca la NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas, y que contempla la validación de métodos bioanalíticos. Para que de esta manera los resultados obtenidos sean confiables y tengan la validez que sustente la investigación realizada.

#### **IV Objetivos.**

##### **Objetivo General**

- ✓ Validar el método analítico por cromatografía de líquidos fase reversa para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate.

##### **Objetivos Particulares**

- ✓ Determinar la adecuabilidad del sistema para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate
- ✓ Comprobar que las condiciones de análisis establecidas son específicas para el analito en cuestión, de no ser así hacer los ajustes necesarios hasta obtener la especificidad requerida.
- ✓ Establecer la exactitud, repetibilidad y reproducibilidad del método para el analito de interés en la matriz biológica empleada (plasma de primate).
- ✓ Establecer la funcionalidad del método validado a través de la obtención de un curso temporal de Concentración plasmática de ciprofloxacina contra tiempo.

## V Hipótesis.

Al realizar los parámetros de validación que marca la NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Se cumplirá con la regulación vigente que marca que todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas de un estudio de bioequivalencia deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito, además de que los resultados obtenidos en la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate, tendrán el respaldo científico que avalará la veracidad de los resultados reportados en la investigación realizada en el Centro de Investigación CAMINA.

## **VI Desarrollo Experimental.**

### **6.1 Material**

- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 500 ml.
- Pipeta volumétrica de 1.0 ml.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
- Matraces volumétricos de 10, 200, 250 y 1000 ml.
- Espátula
- Probetas graduadas de 500 y 1000 ml.
- Cronómetro
- Tubos eppendorf
- Papel glassin
- Frascos de plástico de 20 ml.
- Jeringas de 10 ml
- Tubos de Ensayo de 13 X 18 cm
- Gradilla

### **6.2 Equipos e Instrumentos**

- Balanza analítica Ohaus.
- Equipo desionizador de agua System MILLI-Q water MILLIPORE
- Equipo de filtración MILLIPORE
- Cromatógrafo de líquidos waters
  - Detector waters 486
  - Bomba waters 510
  - Inyector manual
- Membranas de filtración Millipore de 0.45  $\mu$  de tamaño de poro
- Bomba para vacío.
- Parrilla de agitación (vortex)

- Centrifuga Fisher Scientific Marathon 26 KM.
- Columna Zorbax SB-C18 4.6 x 75 mm 3.5 micras.

### **6.3 Reactivos**

- Acetonitrilo J.T. Baker lote Y26C59
- Ciprofloxacina Clorhidrato. Estándar secundario lote 6700047004.
- Enrofloxacin estandar secundario lote 04-02-6017
- Trietilamina Productos quimicos Monterrey lote 005136
- Ácido perclórico Baker Analizad. LoteS/L Fecha de caducidad enero 2007.
- Metanol JT Baker grado HPLC, varios lotes.
- Ácido Fosfórico 85% grado HPLC Fisher Scientific lote 872923.
- Heparina varios lotes.
- Tiras indicadoras de pH, Merk lote OC317128.
- Plasma de primate

### **6.4 Parte Experimental**

#### **6.4.1 Método analítico propuesto para la validación.**

##### **6.4.1.1 Sistema Cromatográfico.**

Columna Zorbax SB-C18 7.5 X 4.6 mm DI 5  $\mu$

Longitud de onda 278 nm.

Velocidad de flujo 1.0 ml/min

Volumen de inyección 20  $\mu$ L.

##### **6.4.1.2 Fase móvil.**

Se preparó una solución de acetonitrilo-Ácido fosfórico 0.025M (pH=3), en una proporción de 13 87 v/v

La solución de ácido fosfórico 0.025M a un pH de tres, es ajustado con trietilamina.

Preparado de la siguiente manera:

Se midió 1.7 ml de ácido fosfórico, se llevo a un matraz de 1000 ml. Y se aforó con agua, el pH fue ajustado con trietilamina.

#### **6.4.1.3 Preparación de las soluciones de referencia y de ácido perclórico.**

- ✓ Solución madre: Se pesaron 20 mg. de ciprofloxacina estándar secundario y se llevo a una matraz de 250 ml. se disolvió y aforó con fase móvil. Para obtener una concentración de 80 µg/ml. De esta solución se tomo una alícuota de 1 ml se llevo a un matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con plasma de primate. Esta solución tiene una concentración de 8.0 µg/ml.
- ✓ Solución Estándar interno: Se pesaron 20 mg de enrofloxacin estándar secundario y se llevo a un matraz de 200 ml. se disolvió y aforó con fase móvil. Esta solución tiene una concentración de 100 µg/ml.
- ✓ Solución de ácido perclórico al 6.0 %: Se midieron 4.1 ml de ácido perclórico y se llevaron a un matraz de 50 ml se diluyó hasta el aforo con agua y se agito.

#### **6.4.1.4 Curva de calibración propuesta.**

El intervalo de concentraciones de ciprofloxacina para la curva de calibración consta de seis puntos: 0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 2.4 y 3.2 µg/ml y la concentración utilizada de estándar interno fue de 4.0 µg/ml.

Preparación de la curva de calibración.

A seis tubos eppendorf se adicionaron 100 µl de fase móvil (linealidad del sistema) o plasma de primate (linealidad del método), a cada tubo se le adicionaron 20 µL de la

solución de estándar interno, posteriormente se adicionaron a cada tubo alícuotas de 25, 50, 75, 125, 150 y 200  $\mu\text{L}$  de la solución madre de ciprofloxacina y por último a cada tubo se adicionó el volumen necesario de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu\text{L}$  como volumen final de cada tubo. Todos los tubos se agitaron en un vórtex durante un minuto y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, se tomó de la fase líquida 20  $\mu\text{L}$  y se inyectaron al cromatógrafo.

## **6.5 Validación del método analítico.**

### **6.5.1 Linealidad del sistema.**

Se evaluó al determinar la relación que existe entre la concentración "X" y la respuesta "Y" al preparar una curva de calibración con seis niveles de concentración conocida de ciprofloxacina (0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 2.4, 3.2  $\mu\text{g/ml}$ ) por triplicado como se describe en el numeral 6.4.1.4.

La prueba se basa en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Posteriormente se determinó el modelo que mejor describe la relación entre la concentración y la respuesta, en donde el coeficiente de determinación calculado debe ser mayor al 2.0%, verificando que en cada nivel de concentración el coeficiente de variación por nivel de concentración no sea de más del 2.0% y la resolución obtenida entre la ciprofloxacina y la enrofloxacin es mayor a 1.5.

### **6.5.2 Selectividad.**

Se obtuvo plasma de seis primates y en cada uno se evaluó el método contra posibles interferencias en la concentración más baja de la curva de calibración (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ), por ejemplo compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante. No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por

analizar.

### **6.5.3 Curva de calibración.**

La curva de calibración propuesta se preparó en la matriz biológica a ser usada en los estudios posteriores (plasma de primate) en concentraciones conocidas de ciprofloxacina (0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 2.4, 3.2 µg/ml) por sextuplicado como se describe en el numeral 6.4.1.4

Posteriormente se determinó el modelo que mejor describe la relación entre la concentración y respuesta, además se verificó que se cumplan con las condiciones de precisión y exactitud, en la concentración más baja de la curva su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20% y en los demás niveles de concentración debe ser del 15%.

### **6.5.4 Limite de cuantificación.**

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración (0.4 µg/ml) se consideró que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%

### **6.5.5 Precisión.**

#### **6.5.5.1 Repetibilidad.**

Se analizó en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas como baja, media y alta del compuesto por analizar en la matriz biológica, las concentraciones equivalen a 0.64, 1.6 y 2.8 µg/ml y se prepararon de la siguiente manera.

- ✓ Concentración baja (0.64 µg/ml) A cinco tubos eppendorf se adicionaron 100 µL de plasma de primate a cada tubo se le adicionaron 20 µL de la solución



de estándar interno, posteriormente se adicionaron a cada tubo 40  $\mu\text{L}$  de la solución madre de ciprofloxacina y por ultimo a cada tubo se adicionaron 340  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu\text{L}$  como volumen final de cada tubo. Todos los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos.

- ✓ Concentración media (1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): A cinco tubos eppendorf se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  plasma de primate, a cada tubo se le adicono 20  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar interno, posteriormente se adicionó a cada tubo 100  $\mu\text{L}$  de la solución madre de ciprofloxacina y por ultimo a cada tubo se le adicionó 280  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu\text{L}$  como volumen final de cada tubo. Todos los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos.
  
- ✓ Concentración alta (2.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): A cinco tubos eppendorf se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  plasma de primate, a cada tubo se le adicono 20  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar interno, posteriormente se adicono a cada tubo 175  $\mu\text{L}$  de la solución madre de ciprofloxacina y por ultimo a cada tubo se le adicionó 205  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu\text{L}$  como volumen final de cada tubo. Todos los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos.

Estas concentraciones utilizadas son diferentes a las de la curva de calibración pero caen dentro del intervalo de la curva. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

#### **6.5.5.2 Reproducibilidad intra-laboratorio**

Se realizó el análisis por duplicado durante tres días, de las concentraciones baja, media y alta (0.64, 1.6 y 2.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) el coeficiente de variación no debe ser mayor a

15%.

### **6.5.5.3 Exactitud**

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

### **6.5.6 Estabilidad de la muestra.**

Se realizaron los siguientes estudios de estabilidad:

#### **6.5.6.1 Estabilidad de la muestra procesada.**

Se prepararon muestras por triplicado de las concentraciones baja y alta (0.64 y 2.8  $\mu\text{g/ml}$ ) se dejaron 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se realizó el análisis para observar la estabilidad que presenta la muestra.

#### **6.5.6.2 Ciclos de congelación-descongelación.**

Se prepararon muestras por triplicado de las concentraciones baja y alta de la siguiente manera: a cada tubo eppendorf se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de plasma de primate y 40  $\mu\text{L}$  de la solución madre de ciprofloxacina para la concentración baja y 175  $\mu\text{L}$  para la concentración alta, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por 24 horas a las mismas condiciones y se repitió el ciclo dos veces más para que en el tercer ciclo después de descongelar las muestras a temperatura ambiente se realizó el siguiente procedimiento: a cada tubo eppendorf se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar interno y para las muestras de concentración baja se le adicionaron 340  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico y para la concentración alta se adicionaron 205  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico, todos los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, se tomo de la fase líquida 20  $\mu\text{L}$  y se inyectó al cromatógrafo.

### **6.5.6.3 Estabilidad a corto plazo.**

Se prepararon muestras por triplicado al nivel alto y bajo de la curva de calibración como se describe en el numeral 6.5.5.2 se congelaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron a las 24 horas, a los 7, 14 y 28 días para realizar el análisis y determinar la estabilidad de la muestra

Para que el compuesto de interés se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad expresados en los numerales 6.5.4.1 y 6.5.4.3.

## **VII Resultados y Análisis de Resultados.**

En función de las características fisicoquímicas del compuesto de interés y la información de la investigación bibliográfica realizada,<sup>(15-23)</sup> se obtuvieron métodos analíticos que sirvieron de base para establecer las condiciones más adecuadas de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, que facilitaron el manejo de muestras y permitieron obtener resultados rápidos y confiables.

Con el propósito de optimizar la precisión en la cuantificación, en métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución, se recurre frecuentemente al empleo de una sustancia patrón de referencia interna, que debe reunir las siguientes características:<sup>2</sup>

- Similar estructuralmente al compuesto de interés.
- Poseer un tiempo de retención cercano al del compuesto de interés sin interferir con este
- No formar parte de la muestra
- Ser estable a las condiciones de trabajo

Condiciones que cumplió la enrofloxacin, sustancia elegida en este estudio como estándar interno el uso de la enrofloxacin hace al método más preciso, menos susceptible a errores técnicos y compensa algunas fallas que hallan ocurrido durante los pasos de obtención y preparación de muestras. tales como errores aleatorios asociados a la toma de muestras, alícuotas y las debidas a las variaciones instrumentales, todo ello en virtud de que la cantidad del analito de interés y el estándar interno se conservan en una proporción constante durante todos los pasos de la preparación de la muestra para el análisis, y el valor de esta proporción es el que se utiliza para fines de cuantificación.

### 7.1 Linealidad del sistema.

Los datos que se presentan en la cuadro 1, son los obtenidos del análisis de los seis puntos de la curva estándar y la relación de alturas reportada corresponde al cociente obtenido entre la respuesta de la Ciprofloxacina y la respuesta de la Enrofloxacin (estándar interno).

El coeficiente de variación reportado en el cuadro 1. corresponde a cada nivel de concentración y los resultados obtenidos en la linealidad del sistema son aceptables ya que se encuentran por debajo del 2.0% que es el límite máximo permitido de variación para la linealidad del sistema.

Punto	[ ] µg/ml	Rel Alturas 1	Rel Alturas 2	Rel Alturas 3	Promedio	Desvest	C V
1	0.4	0.1387	0.1385	0.1396	0.1389	0.0006	0.4365
2	0.8	0.2628	0.2665	0.2680	0.2658	0.0027	1.0162
3	1.2	0.3899	0.3953	0.3917	0.3923	0.0028	0.7013
4	2	0.6495	0.6517	0.6490	0.6501	0.0014	0.2187
5	2.4	0.7807	0.7712	0.7737	0.7752	0.0049	0.6296
6	3.2	1.0197	1.0303	1.0211	1.0237	0.0058	0.5645

Cuadro 1 Linealidad del sistema

En la figura 1 se muestra de manera gráfica la relación que existe entre la concentración y la respuesta obtenida, pudiéndose observar de manera visual el comportamiento lineal que siguen los datos obtenidos, a los cuales se les realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) a la concentración y como variable dependiente (Y) a la respuesta (relación de alturas), obteniéndose un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98, por lo que se demuestra que existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la respuesta obtenida, del tipo  $y = mx + b$ , donde la ecuación de la recta se describe como:

$$y = 0.3168x + 0.013$$

$$r^2 = 1$$

En la figura 2 se presenta un cromatograma típico obtenido durante la prueba de linealidad del sistema, El tiempo de retención obtenido para la ciprofloxacina es de 4.43 minutos y para el estándar interno (enrofloxacina) es de 6.56 minutos. La resolución entre los dos componentes fue de 1.74, por lo que cumple con la última condición que se marca para la linealidad del sistema en donde se indica que no debe de ser menor a 1.5. Como se puede apreciar en el cromatograma el sistema es adecuado para la separación de los picos de ciprofloxacina y enrofloxacina como lo demuestra la resolución obtenida.

Dado que el coeficiente de correlación es mayor a 0.98, el coeficiente de variación para cada nivel de concentración es menor de 2.0%, y la resolución obtenida en el sistema es mayor a 1.5, se considera que el sistema es lineal en el intervalo de 0.4 a 3.2 µg/ml de ciprofloxacina, ya que cumple con los criterios para la evaluación de la linealidad del sistema

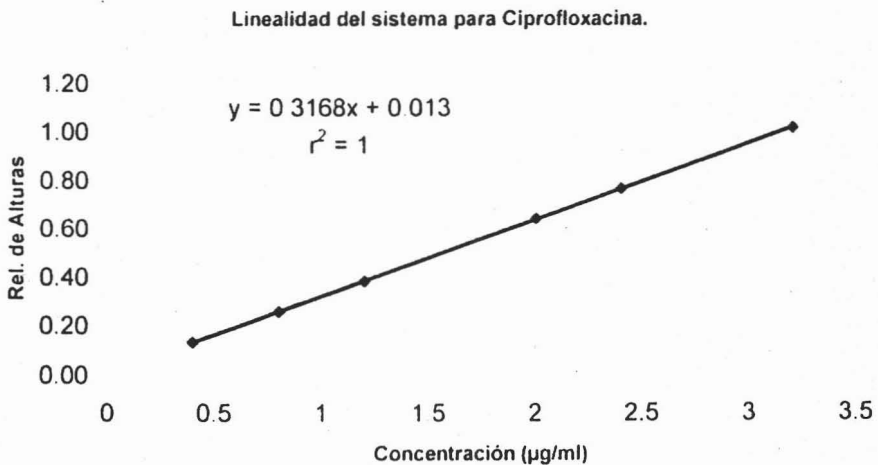


Figura 1 Gráfica de Linealidad del sistema para Ciprofloxacina

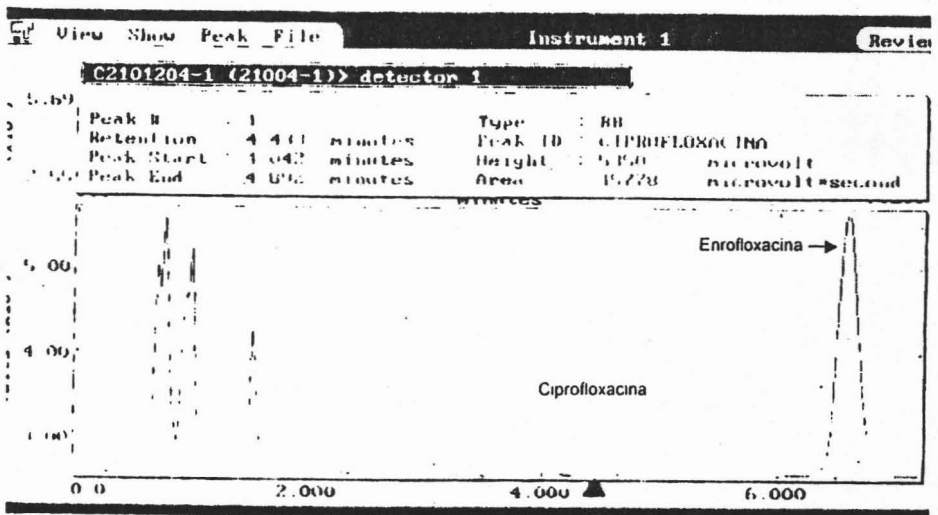


Figura 2 Cromatograma de referencia. para la linealidad del sistema

## 7.2 Selectividad.

Para la selectividad del método se analizaron muestras blanco de seis primates y muestras con la concentración más baja de la curva de calibración (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) no se detectó interferencia por posibles metabolitos, sustancias endógenas u otro medicamento que se estuviese administrando de forma concomitante (acetaminofen), como se puede observar en la figura 3. el cual presenta uno de los seis cromatogramas obtenidos del análisis de plasma de primates bajo el método propuesto, la cuantificación de ciprofloxacina en el nivel más bajo de concentración no se ve alterada al no determinarse interferencia alguna por productos endógenos de la matriz (Fig. 4), presentando una buena exactitud y precisión en cuanto a la cuantificación se refiere. Por lo que se confirma que el método empleado para la cuantificación de ciprofloxacina es selectivo para dicho fármaco.

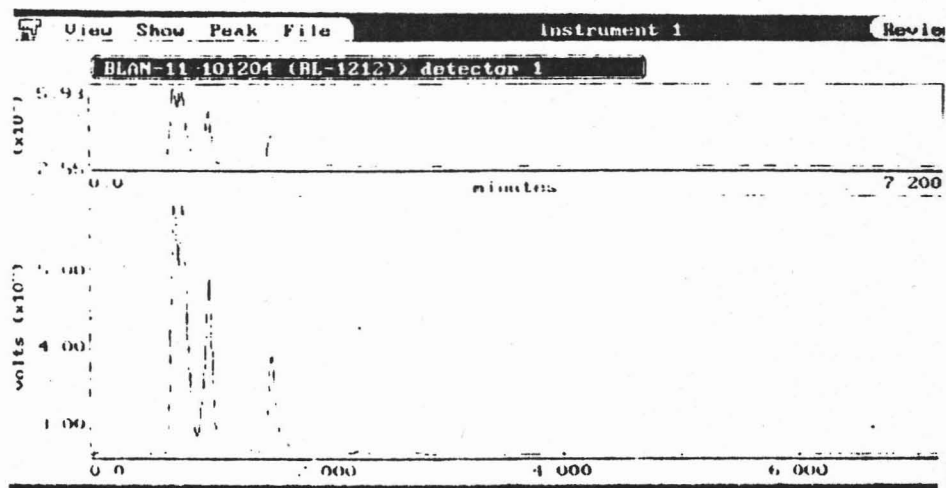


Figura 3 Cromatograma de muestra blanco con plasma de primate

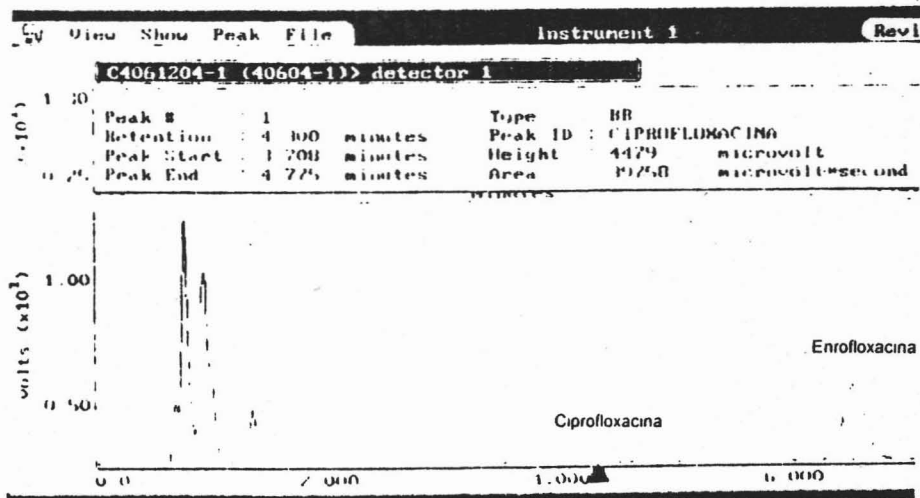


Figura 4 Cromatograma de la concentración más baja de la curva de calibración. (0.4 µg/ml de ciprofloxacina)



### 7.3 Curva de calibración.

La curva de calibración en plasma de primate constó de seis niveles de concentración como se indica en el cuadro 2, y se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados con los datos reportados en el mismo cuadro, para determinar la ecuación de la recta que describa el comportamiento que siguen los resultados obtenidos.

En la figura 5. se observa que los resultados siguen un comportamiento lineal y que las respuestas obtenidas están en función de la concentración y se describen mediante la ecuación de la recta  $y = mx + b$  ( $y = 0.3858x + 0.0211$ ) el coeficiente de determinación que nos arrojan los datos está por encima de 0.98 ( $r^2=0.9995$ ) comprobando de esta manera que la relación que existe entre la concentración y la respuesta es lineal y continua para el intervalo de trabajo de 0.4 a 3.2  $\mu\text{g/ml}$ . por lo que se considera que el método es lineal en dicho intervalo.

[ ] $\mu\text{g/ml}$	Rel Alturas 1	Rel Alturas 2	Rel Alturas 3	Rel Alturas 4	Rel Alturas 5	Rel Alturas 6	Promedio	Desvest	% C.V.
0.4	0.1647	0.1689	0.1766	0.1706	0.1758	0.1784	0.1725	0.0053	3.0748
0.8	0.3225	0.3197	0.3239	0.3178	0.3339	0.3375	0.3259	0.0080	2.4473
1.2	0.4690	0.4737	0.4785	0.4820	0.4841	0.5100	0.4829	0.0144	2.9765
2	0.7944	0.8037	0.8060	0.7707	0.7895	0.8392	0.8006	0.0227	2.8374
2.4	0.9623	0.9627	0.9742	0.9291	0.9602	0.9692	0.9596	0.0158	1.6499
3.2	1.1507	1.1433	1.1679	1.3348	1.3223	1.3388	1.2430	0.0980	7.8814

Cuadro 2 Resultados estadísticos para la curva estándar (La relación de alturas reportada corresponde al cociente de la respuesta de la ciprofloxacina y la enrofloxacina)

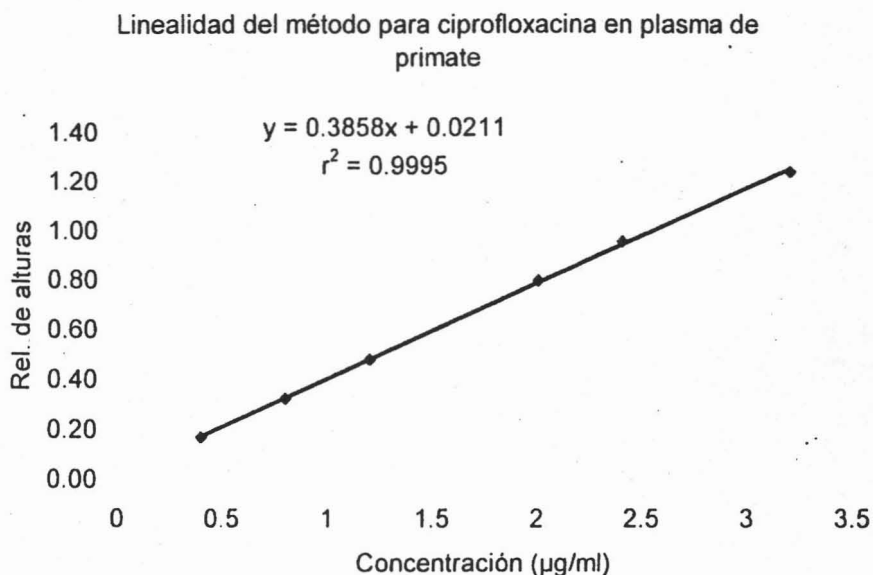


Figura 5 Linealidad del método para ciprofloxacina en plasma de primate.

La exactitud y precisión para cada nivel de concentración en el intervalo de trabajo establecido fueron determinadas. Los datos presentados en el cuadro 3, señalan que la exactitud para cada nivel, la cual fue calculada como el por ciento de recobro con respecto al valor nominal de cada nivel, para este estudio la exactitud estuvo comprendida de 84.9 % a 108.7%, en tanto la precisión en los niveles trabajados no tuvieron un coeficiente de variación mayor al 10.57 %, resultados que están dentro de los criterios de aceptación para exactitud y precisión requerida para métodos analíticos utilizados en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos<sup>(7,8)</sup>.

Nivel de concentración (µg/ml)	[ ] Experimental (µg/ml)	% Exactitud <sup>a</sup>	Criterio (%)	Precisión (%C.V.)	Criterio de aceptación (%)
0.4	0.39 ± 0.045	84.9 – 108.7	80-120	10.57	20
0.8	0.78 ± 0.025	95.68 – 103.19	85-115	3.20	15
1.2	1.19 ± 0.027	97.95 – 104.07	85-115	2.26	15
2.0	2.02 ± 0.089	94.44 – 105.03	85-115	4.42	15
2.4	2.43 ± 0.117	94.89 – 105.41	85-115	4.82	15
3.2	3.16 ± 0.117	94.59 – 102.59	85-115	3.72	15

Cuadro 3 Determinación de ciprofloxacina en plasma de primate en los seis niveles de concentración de la curva estándar. (<sup>a</sup> Valor de exactitud mínimo y máximo determinado en cada nivel).

#### 7.4 Limite de cuantificación.

En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate, en el nivel más bajo de la curva (0.4 µg/ml), de acuerdo a la norma en este punto para poderlo considerar como limite de cuantificación el valor promedio obtenido debe caer dentro del ±20 % con respecto al valor nominal adicionado con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

La exactitud determinada oscila en el intervalo del 84.9% al 108.7% con un valor promedio determinado de 97.60% con respecto al valor nominal y el coeficiente de variación que se obtuvo es del 10.57%, por lo tanto se considera como limite de cuantificación válido para este método analítico la concentración de 0.4 µg/ml.

Nivel de concentración (µg/ml)	[ ] Experimental (µg/ml)	% Exactitud <sup>a</sup>	Criterio (%)	Precisión (%C V)	Criterio de aceptación (%)
0.4	0.39 ± 0.041	84.9 – 108.7	80-120	10.57	20

Cuadro 4 Limite de cuantificación. La [ ] experimental reportada corresponde al promedio de cinco determinaciones realizadas ± su desviación estándar (<sup>a</sup> Valor de exactitud mínimo y máximo determinado)

## 7.5 Precisión

### 7.5.1 Repetibilidad.

Los resultados que se presentan en el cuadro 5 son los obtenidos del análisis por quintuplicado de las concentraciones baja, media y alta, se puede observar que para los porcentajes recuperados de ciprofloxacina, en la concentración más baja es en donde presenta un mayor porcentaje en el coeficiente de variación estando en un 3.88 %, esto debido a que a menor concentración de ciprofloxacina la preparación de muestra presenta una mayor dificultad para poder obtener resultados reproducibles y ya en concentraciones media y alta de la curva la precisión mejora y se mantiene con un coeficiente de variación menor al 1.5% el cual comparado con el 15% que permite la norma es un valor pequeño que indica la buena precisión con la que cuenta el método analítico para la determinación de ciprofloxacina.

Nivel de concentración (µg/ml)	[ ] Experimental (µg/ml)	Precisión (%C V)	Criterio de aceptación (%)
0.64	0.65 ± 0.025	3.88	15
1.60	1.56 ± 0.017	1.13	15
2.80	2.81 ± 0.040	1.42	15

Cuadro 5 Resultados de la repetibilidad del método. Los datos de [ ] experimental representan el promedio de cinco determinaciones ± su desviación estándar.

### 7.5.2 Reproducibilidad intra-laboratorio.

En el cuadro 6 se presentan los resultados obtenidos del análisis de tres concentraciones (baja, media y alta) en tres diferentes días tal como lo marca la norma, se puede apreciar que los coeficientes de variación están por debajo del 5% para cada nivel de concentración, cumpliendo con lo establecido; no obstante comparados con los coeficientes de variación de los resultados de repetibilidad se observa que no siguen la misma tendencia ya que mientras el coeficiente de

variación para la concentración más baja en la prueba de repetibilidad es del 3.88%; para la concentración más baja en la reproducibilidad intradía, dicho coeficiente es de 4.37%, lo que reafirma el comentario realizado con anterioridad donde se mencionaba que a menor concentración de ciprofloxacina la preparación de muestras requiere de más cuidado y un dominio muy bueno de la técnica de preparación.

Nivel de concentración (µg/ml)	[ ] Experimental (µg/ml)	Precisión (%C.V.)	Criterio de aceptación (%)
0.64	0.63 ± 0.027	4.37	15
1.60	1.59 ± 0.041	2.58	15
2.80	2.88 ± 0.13	4.65	15

Cuadro 6 Resultados de reproducibilidad intra laboratorio. Los datos representan la media de seis determinaciones ± su desviación estándar

Los resultados obtenidos en las concentraciones media y alta, son contrastantes con respecto a la prueba de repetibilidad, ya que en la reproducibilidad intradía se esperaba un coeficiente de variación menor para estas concentraciones, comparando con la concentración más baja, puesto que al trabajar cantidades mayores de muestra se facilita la preparación y por tanto la reproducibilidad de los resultados, sin embargo al obtener valores de 2.58% y 4.65% para las concentraciones media y alta respectivamente, estos resultados de variación no presentan el comportamiento esperado, sin embargo con los resultados ya mencionados se puede observar que con la técnica de extracción utilizada, en las concentraciones más altas de ciprofloxacina se tiene un poco de dificultad para obtener una mejor reproducibilidad en los resultados, ya que en la preparación de las muestras más concentradas se tiene una mayor cantidad de plasma de primate y una menor cantidad de ácido perclórico lo que dificulta la precipitación de proteínas plasmáticas y por ende el proceso de extracción.

### 7.5.3 Exactitud.

En el cuadro 7 se pueden observar los promedios obtenidos de exactitud en la prueba de repetibilidad de las determinaciones de las tres concentraciones conocidas como baja, media y alta, las cuales se inyectaron por quintuplicado y el valor promedio de las determinaciones esta dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal. Comparando con los resultados obtenidos de exactitud en la prueba de reproducibilidad intralaboratorio (cuadro 8), en donde se observa la misma tendencia en cuanto a la variación de resultados; para el primer punto (concentración baja) se obtuvo un coeficiente de variación de  $\pm 2.0\%$  con respecto al valor nominal, lo cual indica que el método de extracción trabajado en el procesamiento de las muestras es altamente eficiente. En lo concerniente al segundo punto (concentración media), en cuanto al porcentaje de exactitud, la variación obtenida entre reproducibilidad y repetibilidad, es de 176%, lo que confirma una alta precisión en el método y además con respecto a un 100% de recobro de ciprofloxacina, la cantidad recuperada supera el 97%, lo cual implica menos de un 3% de diferencia comparado con el valor nominal. Finalmente, para el tercer punto (concentración alta), se observa un comportamiento similar al de la concentración media, ya que el por ciento de recobro tiene una variación de menos del 3% con respecto a la cantidad adicionada. Así, por lo antes mencionado se considera que el método es exacto en el intervalo de concentraciones evaluadas.

[ ] adicionada µg/ml	[ ] Recuperada µg/ml	Exactitud %	Criterio de aceptación %
0.64	0.65 $\pm$ 0.025	101.56	85 - 115
1.6	1.56 $\pm$ 0.017	97.55	85 - 115
2.8	2.81 $\pm$ 0.040	100.41	85 - 115

Cuadro 7 Resultados de exactitud de los datos de repetibilidad ( el valor reportado en [ ] Recuperada corresponde al promedio de las cinco determinaciones realizadas en cada nivel de concentración)

[ ] adicionada µg/ml	[ ] Recuperada µg/ml	Exactitud %	Criterio de aceptación %
0.64	0.63 ± 0.027	98.38	85 – 115
1.6	1.59 ± 0.041	99.31	85 – 115
2.8	2.88 ± 0.134	102.85	85 – 115

Cuadro 8 Resultados de exactitud de los datos de reproducibilidad intralaboratorio. (el valor reportado en [ ] Recuperada corresponde al total de seis determinaciones de tres días diferentes).

### 7.6 Estabilidad de la muestra.

En el cuadro 9 se presentan los resultados de estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a 24 horas y a los 7 días a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los resultados reportados de concentración determinada corresponden al promedio de las tres determinaciones realizadas para cada nivel de concentración, obteniendo de esta manera la exactitud y la repetibilidad de las determinaciones, como se puede observar la exactitud obtenida en las determinaciones realizadas caen dentro del rango permitido que es del  $\pm 15\%$  del valor nominal, tomando en cuenta este dato el valor que más se aleja de la concentración nominal es el de la concentración alta (2.8 µg/ml) a los siete días de almacenamiento dando un resultado del 109.19% con respecto al valor nominal es decir 9.19% más, pero manteniéndose dentro del límite permitido del 15%.

Condición	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA			
	[ ] adicionada µg/ml	[ ] determinada. µg/ml	Exactitud (%)	%C.V.
Inicial	0.64	0.628 ± 0.065	98.13	10.2854
	2.8	2.8504 ± 0.036	101.80	1.2651
24 hrs. Congelación a -20°C	0.64	0.6088 ± 0.017	95.13	2.8246
	2.8	2.7848 ± 0.128	99.46	4.6056
7 días Congelación a -20°C	0.64	0.6795 ± 0.009	106.17	1.3495
	2.8	3.0572 ± 0.075	109.19	2.4568

Cuadro 9 Resultados de estabilidad de la muestra de ciprofloxacina en plasma de primate.

Con los resultados obtenidos se garantiza que las muestras se mantienen estables a las condiciones de almacenamiento ya mencionadas hasta los siete días, obteniendo durante este periodo de tiempo resultados confiables y reproducibles, que además cumplen con el parámetro de exactitud, ya que el porcentaje de recobro en todas las muestras analizadas permanecen con una variación de  $\pm 10\%$  con respecto a la cantidad adicionada.

#### 7.6.1 Estabilidad de la muestra procesada.

Establecer la estabilidad de una muestra procesada, brinda la ventaja de conocer y definir si una vez que se ha procesado la muestra, ésta es capaz de mantenerse sin cambio significativo durante un lapso corto de tiempo. Idealmente para permitir su análisis de manera automatizada o manual sin presión alguna para el analista.



ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA				
Condición	[ ] adicionada µg/ml	[ ] determinada µg/ml	Exactitud (%)	%C.V.
Inicial	0.64	0.628 ± 0.065	98.13	10.2854
	2.8	2.8504 ± 0.036	101.80	1.2651
24 hrs Temperatura ambiente	0.64	0.6394 ± 0.018	99.91	2.8988
	2.8	2.6975 ± 0.200	96.34	7.4327

Cuadro 10 Estabilidad de la muestra procesada

En el cuadro 10 se presentan las respuestas obtenidas en la prueba de estabilidad de la muestra procesada en donde los resultados reportados para cada nivel de concentración son el promedio de las tres determinaciones realizadas, como se puede observar las muestras se mantienen estables durante un periodo de 24 horas después de su preparación, tiempo más que suficiente para poder llevar a cabo el análisis de cualquier muestra procesada garantizando que la determinación de ciprofloxacina en plasma de primate tienen un margen de 24 horas bien definido, para ser analizado y obtener resultados confiables, exactos y reproducibles.

### 7.6.2 Ciclos de congelación-descongelación.

Después de someter las muestras preparadas a la concentración baja y alta de la curva (0.64 y 2.8 µg/ml) se realizó el análisis de las mismas en el tercer ciclo de descongelación y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 11. La importancia de establecer la estabilidad de la muestra, es para garantizar que tanto el analito (ciprofloxacina) como el fluido biológico que lo contiene (plasma de

primate) son capaces de resistir estos ciclos sin que por ello se afecte la cuantificación de ciprofloxacina en las muestras, así si existiese la necesidad de reanalizar una muestra previamente descongelada, se tenga la confianza de que este hecho no afectará los resultados obtenidos. Finalmente al observar los resultados obtenidos de exactitud en el tercer ciclo, estos no difieren en más del 4% con respecto a la cantidad inicial adicionada, lo que significa que la matriz biológica y el analito, aún después de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento no presentan cambio significativo que altere la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate.

Condición	Ciclos de congelación-descongelación.			
	[ ] adicionada µg/ml	[ ] determinada µg/ml	Exactitud (%)	%C.V
Inicial	0.64	0.628 ± 0.075	98.13	10.28
	2.8	2.8504 ± 0.036	101.80	1.26
tercer ciclo	0.64	0.6376 ± 0.019	99.63	3.07
	2.8	2.9081 ± 0.086	103.86	2.98

Cuadro 11 Estabilidad de la muestra en el tercer ciclo de congelación-descongelación

### 7.7 Aplicación del método analítico.

Después de concluir la validación del método analítico propuesto, se procedió a verificar la funcionalidad del mismo a través de la cuantificación de ciprofloxacina en muestras de plasma de primate obtenidas de un estudio farmacocinético en el cual al primate se le administro una dosis de 10 mg/kg de peso a través de una infusión intravenosa del fármaco por treinta minutos. Con las concentraciones plasmáticas

obtenidas en cada tiempo de muestreo del estudio (cuadro 12) se construyo el perfil farmacocinético (Fig.6) y se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos

Concentración máxima ( $C_{max}$ ) = 1.1860  $\mu\text{g/ml}$

Tiempo máximo ( $T_{max}$ ) = 15 min.

Tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) = 234.83 min.= 3.9139 horas

Volumen de distribución ( $V_2$ ) = 15.6800 ml/kg.

Depuración (CL) = 0.0463  $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$

Muestra	[ ] determinada $\mu\text{g/ml}$
0	0
7.5	0.9319
15	1.186
30	0.7634
45	0.4284
60	0.4106
75	0.4143
90	0.5289
120	0.443
150	0.2997 (N C )
180	0.3711
240	0.3256 (N C )
360	ND
480	ND

Cuadro 12 Curso de concentración plasmática de ciprofloxacina (N C = No cuantificable, N D = No detectable)

## Curso de concentración plasmática de ciprofloxacina

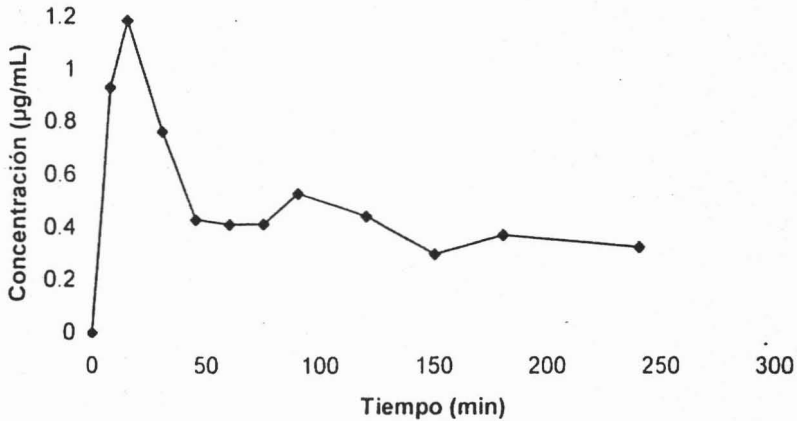


Figura 6 Grafica de Concentracion plasmatica contra tiempo

De manera gráfica podemos ver en la figura 6. que las concentraciones están en el intervalo de concentración validado (de 0.4 a 3.2 µg/mL), como se puede observar la concentración plasmática máxima obtenida es de 1.19 µg/ml y el tiempo de vida media calculado es de 3.91 horas, que es congruente con lo reportado en la bibliografía<sup>13</sup>, ya que marca que el tiempo de vida media de la ciprofloxacina independientemente de la dosis es de 4.0 horas, en tanto que las concentraciones a partir de los 150 minutos están por debajo del límite de cuantificación, por lo que los resultados obtenidos en los siguientes muestreos la ciprofloxacina es detectable pero no cuantificable, por lo que para la determinación de los parámetros farmacocinéticos no se toman en cuenta.

A partir de perfiles plasmáticos como el obtenido en este estudio se puede predecir de una manera clara la tendencia que sigue el fármaco administrado a través del tiempo permitiendo de esta forma, realizar el análisis farmacocinético del mismo, desde su administración hasta su eliminación. Con esto se espera que las

investigaciones realizadas en el centro de investigación CAMINA tengan el sustento necesario que avale las determinaciones de ciprofloxacina en plasma de primate durante los estudios farmacocinéticos a realizar en el futuro.

### **VIII. Conclusiones.**

- El método analítico propuesto cumple satisfactoriamente con los parámetros de validación evaluados, es decir es lineal, exacto, preciso, estable y específico parámetros que marca la NOM-177-SSA1-1998 en su apartado 9 donde indica los parámetros que deben cumplir los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológica.
- El intervalo de concentración validado cumple satisfactoriamente con las necesidades del laboratorio de farmacocinética del Centro de Investigación CAMINA ya que demostró ser funcional durante la evaluación de un curso temporal de concentración plasmática de ciprofloxacina contra tiempo.
- Las condiciones de análisis propuestas para la obtención y manejo de muestras son las adecuadas ya que permiten tener una muy buena extracción de fármaco y además es reproducible en el laboratorio.
- Con la validación de este método analítico se cumple con la regulación vigente que marca que todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y para el propósito, es decir que los resultados obtenidos en la cuantificación de ciprofloxacina de plasma de primate, tienen el sustento científico que avala la veracidad de los resultados reportados en la investigación realizada en el Centro de Investigación CAMINA.

### **IX Ventajas, desventajas y sugerencias.**

- La técnica de extracción utilizada en el método analítico es muy sencilla de realizar, ya que no presenta problemas en cuanto al porcentaje recuperado de ciprofloxacina y no se requiere de técnicas sofisticadas de extracción.
- La fase móvil empleada favorece en cuanto a la separación de ciprofloxacina y enrofloxacin, pero se debe poner especial cuidado en el lavado de la columna ya que por las proporciones utilizadas en la fase móvil (87% de ácido fósfórico) la presencia de sales es elevada por lo que es necesario realizar una limpieza exhaustiva del equipo luego de terminada una corrida analítica.
- Se sugiere utilizar pre-columnas Zorbax SB-C18 durante el análisis de muestras biológicas ya que de esta manera se alarga la vida útil de la columna al evitar entrar pequeñas partículas de fluidos biológicos que pudiesen contaminar la columna.
- El método validado tiene gran utilidad en las cuantificaciones de ciprofloxacina en plasma de primate, se recomienda hacer un análisis más extenso de la estabilidad de la molécula, ya que de acuerdo a las necesidades del laboratorio es probable que se necesite almacenar durante más tiempo las muestras biológicas.

**X Bibliografía**

1. Secretaria de Salud. Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 7ª Ed. México. Editorial talleres gráficos de publicaciones e impresiones de calidad. 2000. Tomo I 226, 234-237, 687-688.
2. Quattrocchi O.A. Introducción a la HPLC. Buenos Aires, Argentina. Laboratorios Dr. Gador. 1992:3-7, 10-36, 42-51, 66-88, 92-98.
3. Curso de Inicialización de HPLC. Beckman Coulter. México D.F. Julio 2001:4-75.
4. Yost R W., Ettre L S y Conlon R D. Introducción a la cromatografía de líquidos práctica. U S A Perkin-Elmer Corp. 1981: 17-57, 112-1154.
5. Snyder. L R y Kirkland. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition U S A John Wiley & Sons, Inc 1979: 125-234, 453-482.
6. U S. Pharmacopeia XXIII. National Formulary 19. U.S.A. 1999: 1914-1926
7. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville, MD20857. May 2001.
8. NOM-177-SSA1-1998. que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.



9. Shah, P.V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Shelly, J.P., Yacobi, A., Laylof, T., Viswahathan, C.T., Cook, E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., y Spector S. (1992). Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Sci.*, 81(3):309-312.
10. Nelson M. Gants, George A. Pankey, Charles D. Ponte.(1995). Uso eficaz de las quinolonas. *Rev Atn Med.*, 49-60.
11. Hooper DC, Wolfson JS.(1991). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med*; 324:384-394.
12. George, L. HPLC method for pharmaceutical analysis. A Wiley-Interscience Publication Volume 2 U.S.A. John Wiley & Sons INC. 1463-1473.
13. Vademecum Farmaceutico Información Profesional Especializada. 10ª Ed. México. Rezza Editores, S A 2001 496-499.
14. Kenneth, E Shen. D. (2003) Diseño de regímenes de dosificación y optimización de los mismos: datos farmacocinéticos En: Las bases farmacológicas de la terapéutica Hardman, J.G., Limbird L.E., Goodman Gilman A. Editores Décima edición. McGraw-HILL Interamericana Editores, S.A. de C.V.(Vol II) 1962.
15. Kamberi, M., Tsutsumi, K., Kotegawa T., Nakamura K., y Nakano S.(1998). Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection *Clin Chem* 44(6).1251-1255.
16. Imre. S., Dogaru. MT Vanu CE, Muntean T, Kelemen L (2003) Validation of HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma. *J Pharm*

Biomed Anal. 33(1):125-30.

17. Wright, DH., Herman, VK., Konstantinides, FN., Rotschafer, JC. (1998). Determination of quinolone antibiotics in growth media by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 709(1):97-104.
18. Manceau, J., Gicquel, M., Laurentie, M., Sanders, P. (1999). Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetics studies in pig and rabbit. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl;* 726(1-2):175-184.
19. Birmingham, M.C., Guarino, R., Heller, A., Wilton, J.H., Shah, A., Hejmanowski, L., Nix, D.E., Schentag, J. (1999). Ciprofloxacin concentrations in lung tissue following a single 4 mg intravenous dose. *J Antimicrob Chemother.* 43 (Suppl A):43-48.
20. Iduwu, O.R., Peggins, J.O., (2004). Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 35(1):143-153.
21. Mckellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A., y Bregante, M. (1999). Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Danofloxacin in plasma, Inflammatory Exudate, and Bronchial Secretions of Calves following Subcutaneous Administration. *Antimicrob Agents and Chemother.*, 43(8):1988-1992.
22. Shah, A., Liu, M-Ch., Vaughan, D. y Heller, A. H. (1993). Oral Bioequivalence of three ciprofloxacin formulations following single-dose administration: 500 mg

tablet compared with 500 mg/10 ml or 50 mg/5 ml suspension and the effect of food on the absorption of ciprofloxacin oral suspension. *J of Antimicrob Chemother.* 443(suppl A):49-54.

23. Vega, E., Dabbene, V., Nassetta, M., Sola, N. (1999). Validation of a reversed-phase LC method for quantitative analysis of intravenous admixtures of ciprofloxacin and metronidazole. *J Pharm Biomed Anal.* 21(5):1003-1009.