



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CLAR PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN
PLASMA**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
GUILLERMINA COVA PÉREZ**



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ
Vocal	JUAN MANUEL RODRÍGUEZ
Secretario	JUAN RAMÓN MARTÍNEZ DE LÉON
1er. Suplente	Ma. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRÍA
2do. Suplente	ANEL VERÓNICA GARDUÑO GARCÍA

Sitio donde se desarrolló el tema

El trabajo fue realizado en el Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A.

Asesor del Tema: Q.B.P. JUAN RAMÓN MARTÍNEZ DE LÉON

Sustentante: GUILLERMINA COVA PÉREZ

Ningún obstáculo real existe para alcanzar la victoria: sólo hace falta enfocar la meta y no retroceder en el esfuerzo.

Filosofía coviana.

Quiero agradecer:

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a todos los profesores de la Facultad de Química, que tuvieron que ver con mi formación profesional. Especialmente a Isaura Carrera, Víctor Ugalde, Rebecca Franco, Juan Manuel y el jurado designado para la revisión de esta tesis.

Por mi raza hablara el espíritu

AL CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS

Deseo agradecer muy particularmente al Centro A. F. de Estudios Tecnológicos, S.A. (CAFET) el apoyo recibido.

Además, me da un enorme gusto agradecer por las valiosísimas aportaciones tanto de *Myriam Cortés* y *Juan Ramón Martínez*, ya que tuvieron que leer, corregir y discutir este "Escrito", por apoyarme siempre con paciencia y conocimiento.

Especialmente agradezco a *Paty Valadez y Vidal Tovar* por haber colaborado conmigo en la realización de este trabajo.

Me gustaría hacerles saber que los comentarios y sugerencias de un sin número de compañeros del Centro; cuyos nombres no cabrían en esta página, me han servido de mucho para mi desarrollo personal y laboral. A todos les extiendo mi más sincero agradecimiento.

Mi más profunda deuda es la que tengo con Dios y toda mi Familia, por que a lo largo de toda mi vida han compartido conmigo sencillamente la suya.

A ustedes les Dedico esta Tesis.

A Dios.

Sencillamente Grande

El cerebro humano. Exactamente como sinfonía, mientras pensamos y sentimos, imaginamos y soñamos, construimos y destruimos, en fin tenemos la capacidad de canalizar para bien o mal toda nuestra inteligencia y aunque tratemos de explicarlo científicamente, Dios es el único posible autor de esta grandeza.

A mis padres

Soy su esencia.

No tengo palabras para agradecer todo lo que soy. Simplemente "Gracias", por la comprensión, apoyo y lo más importante colaborar en la formación de la Mujercita que soy.

A mis hermanos

Mis amigos

Gracias a cada uno de ustedes, por el esfuerzo de mantenernos Unidos y dispuestos a Ayudarnos. Todos son especiales y creo no tengo que escribirlo lo saben.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.	7
2	ANTECEDENTES	11
2.1	ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA VALIDACIÓN	11
2.2	TIPOS DE VALIDACIÓN	13
2.3	VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS SEGÚN LA NORMA MEXICANA VIGENTE	14
2.3.1	<i>Características o parámetros de validación</i>	15
2.3.1.1	Rango	15
2.3.1.2	Recuperación absoluta	16
2.3.1.3	Linealidad del método	16
2.3.1.4	Precisión y exactitud	19
2.3.1.5	Estabilidad	20
2.4	MONOGRAFÍA DE LA AMOXICILINA	26
2.4.1	<i>Descripción del fármaco</i>	26
2.4.2	<i>Nomenclatura</i>	27
2.4.3	<i>Propiedades químicas</i>	28
2.4.4	<i>Propiedades fisicoquímicas</i>	29
2.4.5	<i>Farmacocinética</i>	31
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS REPORTADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	33
3	JUSTIFICACIÓN	36
4	OBJETIVO	37
4.1	OBJETIVO GENERAL	37
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	37
5	DISEÑO EXPERIMENTAL	37
5.1	SUSTANCIAS DE REFERENCIA, REACTIVOS Y EQUIPO	37
5.2	PARTE EXPERIMENTAL: RESULTADOS Y ANÁLISIS	38

5.2.1	<i>Desarrollo (diseño) del método analítico para cuantificar Amoxicilina en plasma</i>	38
5.2.1.1	Evaluación de la selectividad y recuperación absoluta del método	39
5.2.1.2	Diseño del sistema cromatográfico	39
5.2.1.3	Diseño del procesamiento de la muestra	40
5.2.1.4	Estrategia para implementar la extracción en línea en fase sólida (cromatografía bidimensional)	43
5.2.2	<i>Evaluación de (1) la linealidad, (2) rango y (3) límite de cuantificación</i>	51
5.2.3	<i>Resumen del método cromatográfico propuesto</i>	53
5.2.3.1	Sistema cromatográfico	53
5.2.3.2	Procesamiento de la muestra	54
5.2.4	<i>Validación del método analítico</i>	55
5.2.4.1	Rango	56
5.2.4.2	Recuperación absoluta	57
5.2.4.3	Linealidad del método	61
5.2.4.4	Exactitud y Precisión	69
5.2.4.5	Estabilidad	74
5.2.4.6	Límite de cuantificación	78
5.2.4.7	Límite de detección	80
5.2.4.8	Selectividad	80
6	CONCLUSIONES	86
7	ANEXOS	87
7.1	ANEXO 1	87
7.1.1	<i>Cromatografía Bidimensional (Column Switching)</i>	87
7.1.2	<i>Estrategia para implementar el acoplamiento CL-CL.</i>	90
7.1.3	<i>Ventajas y limitaciones del acoplamiento CL-CL.</i>	91
7.1.4	<i>Conclusiones</i>	92
7.2	ANEXO 2	93
7.2.1	<i>Fórmulas empleadas en los cálculos</i>	93
7.2.2	<i>Ejemplo de los cálculos</i>	97
7.2.2.1	<i>Linealidad del método-Curva de calibración (Día 1)</i>	97
8	BIBLIOGRAFÍA	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de Amoxicilina en solución acuosa (20µg/mL).	40
Figura 2. Eficiencia del tratamiento de la muestra por precipitación selectiva en plasma humano adicionado con Amoxicilina (20 µg/mL). (a) precipitación con metanol. (b) precipitación con HClO ₄ al 40 %.	42
Figura 3. Cromatograma representativo del límite de cuantificación de Amoxicilina en plasma obtenido con el método propuesto (0.2 µg/mL).	51
Figura 4. Cromatogramas típicos obtenidos con las condiciones cromatográficas y de extracción de la muestra del método propuesto. A) blanco de plasma. B) Amoxicilina 0.2 µg/mL. C) Amoxicilina 1µg/mL	53
Figura 5. Cromatograma del Límite de cuantificación de la Amoxicilina 20 µg/mL.	79
Figura 6. Cromatograma de la concentración mínima detectable de Amoxicilina, 0.05 µg/mL.	80
Figura 7. A-F) Cromatogramas representativos de Blancos de Plasma provenientes de diferentes sujetos, G) Heparina y H) Cafeína; I) Plasma adicionado con Amoxicilina y Enalaprilat.	81, 82, 83 y 84
Figura 8. Cromatograma representativo del tiempo de retención del principal metabolito (ácido penicílico) de la Amoxicilina en plasma. Se observa que la señal del ácido penicílico no interfiere con la señal del tiempo de retención de la Amoxicilina.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma empleando extracción en fase sólida.	33
Tabla 2. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma por inyecciones directas posteriores a una desproteinización.	34
Tabla 3. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma y extracción en línea.	35
Tabla 4. Sistema cromatográfico 1.*El Artículo publicado Muth Peter y cols. ¹¹ sirvió como referencia para establecer estos parámetros.	39
Tabla 5. Evaluación de la selectividad del método con el uso de agentes precipitantes.	41
Tabla 6. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en la columna Oasis HLB 2.1x20 mm.	45
Tabla 7. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en la columna Xterra RP 18 3.9*20 mm en diferentes proporciones de la fase móvil.	46 y 47
Tabla 8. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en un sistema de cromatografía bidimensional.	49
Tabla 9. Lista de sustancias evaluadas como estándar interno.	52
Tabla 10. Concentraciones máximas plasmáticas de Amoxicilina a diferentes vidas medias ⁵ .	56
Tabla 11. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas de Amoxicilina.	58
Tabla 12. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras plasmáticas de Amoxicilina	58
Tabla 13. Porcentaje de recuperación absoluta de la Amoxicilina. La recuperación absoluta se evaluó al comparar el área promedio de la Amoxicilina en plasma con su área correspondiente en agua expresando esta relación en forma de porcentaje.	59
Tabla 14. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas del Enalaprilat.	59

Tabla 15. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras plasmáticas del Enalaprilat y el porciento de recobro.	60
Tabla 16. Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del método.	62
Tabla 17. Resultados del análisis por mínimos cuadrados obtenidos de las curvas de calibración por cada día. (n=número de puntos a concentraciones diferentes de Amoxicilina, b= ordenada al origen, m=pendiente, r=coeficiente de correlación, r ² =coeficiente de determinación y C.V.= coeficiente de variación).	63
Tabla 18. Curva de calibración para evaluar la linealidad del método bioanalítico, a partir de los valores transformados, aplicando el log ₁₀ a cada variable involucrada (independiente y dependiente).	64
Tabla 19. Resultados del análisis por mínimos cuadrados obtenidos de las curvas de calibración para cada día, utilizando el factor de ajuste (log ₁₀).	65
Tabla 20. Análisis de varianza para un α=5% y análisis de regresión de la curva global.	67
Tabla 21. Diferencia relativa entre la concentración nominal y la concentración calculada a partir de las curvas generadas durante la evaluación de la linealidad del método (y=mx+b).	68
Tabla 22. Evaluación de la Precisión y Exactitud Día 1.	70
Tabla 23. Evaluación de la Precisión y Exactitud del Día 2.	71
Tabla 24. Evaluación de la Precisión y Exactitud día 3.	72
Tabla 25. Evaluación de la precisión y exactitud.	73
Tabla 26. Estabilidad a ciclos de congelación – descongelación.	75
Tabla 27. Estabilidad en la mesa de trabajo.	76
Tabla 28. Estabilidad en el disolvente de inyección.	77
Tabla 29. Condiciones de almacenamiento durante 66 días a -70°C	78
Tabla 30. Límite de cuantificación.	79

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Linealidad del método.

Gráfica 2. Análisis de residuales.

Gráfica 3. Curvas de calibración transformadas (\log_{10}) por día.

Gráfica 4. Análisis de residuales.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Validación de Métodos Bioanalíticos.

El objetivo de la validación de los métodos analíticos es demostrar con evidencia experimental y razones estadísticas, que éstos son adecuados para el objetivo que son diseñados.

Las características típicas de comportamiento que se evalúan durante la validación de métodos, son las siguientes:

- 1) Exactitud
- 2) Precisión
 - a. Reproducibilidad
 - b. Repetibilidad
- 3) Especificidad
- 4) Límite de Detección
- 5) Límite de Cuantificación
- 6) Linealidad
- 7) Rango

Las características que deben incluirse en la validación dependen del objetivo propuesto para el método; por ejemplo, si el objetivo del método es identificar a un compuesto X, entonces la característica a evaluar es la especificidad. Por tanto, el objetivo del método debe ser claramente establecido, puesto que éste decide las características a evaluar en la validación.

Un método bioanalítico* diseñado para la determinación cuantitativa de un fármaco y / o sus metabolitos en un fluido biológico, tiene un papel importante por su transcendencia en la evaluación e interpretación de los datos derivados de un estudio de Biodisponibilidad, Bioequivalencia o Farmacocinética¹⁹. La validación de éste tipo de metodologías deberá incluir aquellas características que aseguren la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados. Las características principales que se evalúan en la validación de métodos bioanalíticos son: (1) Exactitud), (2) Precisión, (3) Selectividad, (4) Reproducibilidad y (5) Estabilidad.

Para determinar la *aceptabilidad* de los resultados se deben establecer criterios de

* N.b. En este trabajo por método bioanalítico se entiende a aquellas metodológicas que implican el uso de un fluido biológico (plasma, suero, orina o sangre).

aceptación considerando la variación propia del método.

Antes de la validación, se deben establecer los criterios para aceptar o rechazar los experimentos, deben sustentarse científicamente estos criterios y documentar las medidas correctivas.

Durante años la validación de métodos bioanalíticos ha sido un tema de estudio y consenso a nivel nacional e internacional que ha derivado en la creación de normas y/o guías que buscan homogenizar las características mínimas que deben incluirse en la validación, así como los criterios de aceptación.

En este sentido, la Secretaría de Salud emitió la norma NOM-177-SSA1-1998¹, que en el punto 9, menciona los criterios y requisitos para validar un método bioanalítico que se empleará en el análisis químico de muestras biológicas. Otra referencia es la guía de validación de métodos bioanalíticos emitida por la FDA^{2, 21}.

En otro aspecto, la validación de métodos bioanalíticos se conforma de dos grandes procesos: el primero se refiere a la Validación y el segundo a la Aplicación rutinaria del método. El primer proceso a su vez se subdivide en dos subprocesos que son: El Diseño o desarrollo y la Validación propia del método.

Durante el diseño se definen las variables independientes, éstas delimitan a las características generales a considerar por el método, como son: el objetivo planteado, la sensibilidad (concentración mínima que se requiere cuantificar), la naturaleza de la muestra y las propiedades físicas y químicas del o los compuestos de interés.

Posteriormente, las variables dependientes se caracterizan para determinar las variables críticas a controlar. Se definen los alcances, la variabilidad del método y se verifican los resultados. En general, durante el diseño del método se observa el comportamiento de las variables independientes, se investiga las capacidades y limitaciones con el objetivo de diseñar métodos robustos, reproducibles y de fácil aplicación.

El proceso de diseño o desarrollo debe considerar aspectos como son: (1) la implementación de la metodología analítica experimental u operacional, (2) el procesamiento de la muestra y (3) la verificación de resultados. Todos estos aspectos son dependientes entre sí, por tanto la interpretación de los resultados es clave para el diseño de métodos validables.

La sensibilidad del método es un aspecto crítico en la determinación del procesamiento de la muestra; por lo tanto al cuantificar cantidades pequeñas (del orden de los microgramos o nanogramos) de muestras en matrices biológicas, es necesario diseñar tratamientos de extracción que permitan concentrar el fármaco para facilitar su cuantificación.

En la verificación se evalúan algunas características de la validación como son: linealidad, exactitud, precisión, etcétera; si durante la verificación no se cumple con los criterios de aceptación establecidos, se determina la causa, se corrige, se documentan y se debe evaluar nuevamente.

Se elabora el plan o protocolo de validación, éste incluye una descripción operacional o experimental del método analítico, los reactivos, los equipos, los criterios de aceptación, una descripción de los experimentos para determinar las características que incluirá la validación etcétera. El protocolo describe en forma detallada la forma en se llevará a cabo la validación del método, tanto en el aspecto práctico así como el de análisis estadístico de los resultados, su interpretación y los criterios de aceptación.

Una vez concluido el diseño y la parte experimental de la validación se presenta por escrito un informe con los resultados obtenidos. La documentación debe incluir:

- (1) Una descripción operacional o experimental del método analítico.
- (2) Evidencia de la pureza e identidad de los estándares utilizados, tanto del fármaco y/o metabolito como el del o los estándares internos usados en experimentos.
- (3) Una descripción de los estudios estabilidad y de los resultados obtenidos.
- (4) Una descripción de los experimentos realizados para determinar exactitud, la precisión, la recuperación absoluta, la selectividad, el límite de la cuantificación, la curva de calibración (ecuaciones y funciones), y los resultados obtenidos.
- (5) Cromatogramas representativos
- (6) Desviaciones al protocolo (si es aplicable), y justificaciones para las desviaciones.

El informe debe ser aprobado por el responsable sanitario o autoridad legal antes de ser aplicado en un análisis rutinario muestras.

Se aplica el método y la validación continua; de la misma manera al finalizar se presenta por escrito un informe. La documentación debe incluir:

- (1) Evidencia de la pureza e identidad de los estándares.
- (2) Tablas de resultados que contengan la información sobre el proceso y el almacenamiento de las muestras, así como cualquier desviación a los protocolos.
- (4) Métodos analíticos para el análisis de muestras clínicas o pre clínicas. La información debe incluir la identificación del método, fecha del análisis, los analistas, duración, los cambios significativos del equipo y del material, y cualquier cambio o desviación potencial del método establecido.
- (5) Ecuaciones y cálculos.
- (6) Resumen de los datos de exactitud y precisión de las curvas de calibración y de las muestras control.
- (7) Los gráficos y el análisis de tendencia de las muestras control además de la información estadística.
- (8) Documentación de la repetición de los análisis (cuando aplique).
- (9) Desviaciones al protocolo de análisis, con razones y justificaciones para las desviaciones.

Lo anterior fue un panorama general del proceso de validación que debe cumplir idealmente un método bioanalítico. El proceso de validación aquí descrito se basó en la normatividad nacional e internacional vigente, ya que el cumplimiento de las normas es esencial para la comercialización de cualquier medicamento.

2 ANTECEDENTES

2.5 Antecedentes históricos de la Validación

Debido a la creciente necesidad de emplear métodos bioanalíticos durante la evaluación y la interpretación de los datos derivados de los estudios de Farmacocinética, Biodisponibilidad o Bioequivalencia¹⁹, se reguló la validación de los mismos. Además, se establecieron lineamientos aceptables internacionalmente que asegura la estandarización del proceso de validación.

Los primeros grupos de trabajo que participaron en el diseño de la primera guía de validación se formaron en 1990, convocados por la FDA (Federal Drug Administration). A partir de éstos se definieron los objetivos que deben cubrirse y normarse en las guías de validación; asimismo, se definieron los dos procesos distintos que conforman a la validación de los métodos bioanalíticos: el primero se refiere a la Validación y el segundo a la Aplicación rutinaria del método.

De estos grupos de trabajo se concluyeron y definieron los siguientes puntos; se:

- Establecieron las necesidades (requerimientos o exigencias) que deben cumplir los métodos bioanalíticos.
- Planteó la necesidad de procedimientos que establezcan la confiabilidad de los resultados obtenidos con el método bioanalítico.
- Definieron las características o parámetros de validación y otros términos relacionados con la validación como son: criterios de aceptación y corrida analítica, entre otros; también se establecieron los parámetros que aseguran la aceptabilidad de los resultados obtenidos.
- Estableció la importancia del diseño del método.
- Sugirió expandir la validación hasta la etapa de la aplicación del método.
- Proveyó de especificaciones para cada uno de las características o parámetros de validación.
- Definieron los criterios de aceptación del análisis de muestras.
- Sugirieron protocolos de reanálisis de las muestras.

Se propuso regular la validación de los métodos bioanalíticos de forma independiente a otros métodos, dada la problemática que estos generan; además se establecieron los criterios estándar de aceptación para la validación de este tipo de métodos con el objeto de armonizarlos.

En enero de 1999, la FDA emitió el primer anteproyecto sobre la Validación de Métodos bioanalíticos con el que se pretendió dar a conocer los consensos logrados en los primeros grupos de trabajo. En enero del 2000, después de una década de revisión, la FDA convocó a una segunda revisión de la Guía de validación de métodos bioanalíticos.

Las conclusiones de esta segunda revisión fueron las siguientes; se:

- Definieron los diferentes tipos de validación que pueden realizarse.
- Dieron a conocer los avances en la tecnología aplicada a los métodos bioanalíticos referentes a las bases de los métodos inmunológicos y la espectrometría de masas.
- Discutieron consideraciones acerca del recobro y la curva de calibración.
- Discutieron los criterios de aceptación definidos para la selectividad de los métodos inmunológicos y los que emplean espectrometría de masas.

Finalmente la FDA², en el 2001, emite la Guía de validación de los métodos bioanalíticos vigente hasta ahora. La guía de la FDA busca la armonización en la validación de los métodos bioanalíticos y ha servido como base a otros países para establecer sus propias normas, debido al impacto que tienen los resultados en las conclusiones derivadas de este tipo de métodos. Éstos deben cumplir los requisitos indicados por las autoridades oficiales de la salud del propio país para ser aceptadas.

En México, la Secretaría de Salud en cumplimiento con los acuerdos del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, expidió la siguiente: Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1998¹, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

La norma establece los parámetros analíticos así como los criterios de aceptación que deben cumplirse.

En resumen ambos documentos (Norma oficial mexicana y la Guía de la FDA) se basan en las deliberaciones de dos talleres: (1) Validación Analítica de los Métodos: Biodisponibilidad, Bioequivalencia, y estudios de Farmacocinética¹⁷ y (2) Validación de los métodos de Bioanalíticos: Una visita posterior con una década de progreso ²⁶.

2.5 Tipos de Validación²

Los métodos de análisis validados a menudo se modifican para satisfacer los requisitos del laboratorio que realiza el análisis. Estas modificaciones deben validarse para asegurar el adecuado funcionamiento del método analítico. Cuando se realiza un cambio a un método previamente validado, el analista debe decidir si es necesaria una validación adicional. Los diversos tipos de validación así como sus niveles se definen y se caracterizan a continuación:

A. Validación completa.

La validación completa es cuando se valida por primera vez en su totalidad un método bioanalítico.

B. Validación parcial

La validación parcial se lleva a cabo cuando se validan las modificaciones realizadas a métodos bioanalíticos previamente validados. La validación parcial puede incluir la evaluación de una o más características. El número de características por validar depende del impacto de la modificación.

Las modificaciones más comunes que sufren los métodos bioanalíticos son:

- Transferencia del método de Bioanalítico entre los laboratorios y/o analistas
- En la metodología analítica (e.j., cambio en el sistema de detección)
- En el tipo de anticoagulante
- En matriz biológica (e.j., plasma humana por orina humana)
- En el procesamiento de la muestra
- En origen de especie (e.j., plasma de rata por plasma de ratón)
- En la concentración
- Cambios en instrumentos y/o plataformas del software

- Cambios en el volumen de muestra
- Demostración de la selectividad en la presencia de medicaciones concomitantes
- Demostración de la selectividad en la presencia de metabolitos específicos

C. Validación Cruzada

Este tipo de validación es una comparación de los parámetros o características de validación entre métodos, que se han empleado para generar datos de un mismo estudio o a través de diversos estudios. Un ejemplo de la validación cruzada es cuando se compara un método bioanalítico validado (referencia) con otro método (prueba) y viceversa. Otro ejemplo, se da cuando el análisis de las muestras de un estudio en particular se conduce en más de un sitio o laboratorio, se debe realizar una validación cruzada con estándares adicionados en la matriz y con muestras problema para establecer la confiabilidad entre laboratorios. La validación cruzada debe también ser considerada cuando los datos se generaron con diversas técnicas analíticas (e.j., Cromatografía líquida contra. ELISA).

2.5 Validación de métodos bioanalíticos según la norma mexicana vigente

En la NOM-177-SSA1-1998¹, en el punto 9, se indican los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia. La norma¹ establece los parámetros mínimos que deben incluirse en la validación de métodos, así como los criterios de aceptación o rechazo de cada uno de ellos. La norma¹ establece la necesidad de elaborar una estrategia de validación, la cual debe incluir entre otros puntos, los criterios de aceptación; así como las medidas correctivas en caso de fallas. Los criterios de aceptación pueden variar respecto a la norma, pero estas variaciones deben documentarse y sustentarse científicamente.

La norma¹ establece que se debe validar el método bioanalítico con el mismo tipo de matriz biológica que las muestras provenientes del estudio de bioequivalencia. Además, indica que la validación se debe de establecer las condiciones para el tratamiento de las muestras durante el diseño del método.

2.4.5 Características o parámetros de validación

La validación del método de acuerdo a la norma debe incluir como mínimo las siguientes características o parámetros:

2.3.1.1 Rango

De acuerdo a la norma mexicana¹, el rango se define como el intervalo de concentraciones esperadas del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

La NOM-177-SSA1-1998¹ señala que el rango puede estar caracterizado por uno o más intervalos constituido al menos de cinco concentraciones distintas cada uno, sin incluir las muestras blanco; siempre y cuando estos intervalos contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y la concentración máxima del rango.

La Guía de la FDA² no incluye al rango como un parámetro específico, pero en la evaluación de la linealidad (curva de calibración) se indica que la curva de calibración debe establecerse con base al rango de concentraciones esperadas en un estudio en particular.

En resumen, ambos documentos regulatorios establecen que, el rango del método depende del objetivo del mismo, indica que para establecer el rango debe realizarse un análisis minucioso del objetivo y alcance requerido del método. Es recomendable que las concentraciones esperadas en las muestras se encuentren dentro del rango establecido, ya que las extrapolaciones de las concentraciones cuantificadas, tanto de las bajas concentraciones como de las altas concentraciones, deben evitarse.

En este sentido la NOM-177-SSA1-1998¹ menciona que cuando se obtengan concentraciones por debajo del límite de cuantificación, estas concentraciones no deben incluirse en los cálculos y cuando se obtengan concentraciones por encima del rango, la muestra puede diluirse con el mismo tipo de matriz biológica.

La guía de la FDA² por su parte, indica que si se obtienen concentraciones por debajo del rango se debe definir nuevamente el rango, y cuando se obtengan concentraciones por encima del rango la muestra se debe diluir y analizar nuevamente.

Ambos documentos contemplan la posibilidad de obtener concentraciones fuera del rango, por tanto podría considerarse la dilución de las muestras dentro de los parámetros considerados en la validación; por lo contrario, las muestras que están por debajo de la concentración mínima del rango no se podrán considerar, como un plan de acciones preventivas dentro de la validación, ya que lo más recomendable es definir nuevamente el rango y revalidar el método.

2.3.1.2 Recuperación absoluta

La recuperación absoluta evalúa la eficiencia del método de extracción del compuesto de interés; aunque no debe ser necesariamente del 100%, ésta debe ser reproducible, precisa y consistente a lo largo del rango. La recuperación absoluta se determina mediante la comparación de la respuesta obtenida de una cantidad de compuesto adicionado y extraído de la matriz biológica contra la respuesta debida a la misma cantidad de compuesto en solución.

Si el método analítico requiere del uso de un estándar interno, se debe determinar su porcentaje de recuperación absoluta de manera independientemente, esto es necesario porque el estándar interno se adiciona a las muestras antes de la inyección para compensar los problemas de reproducibilidad y se extrae de la misma forma que el compuesto de interés.

Para evaluar la recuperación absoluta, tanto la NOM-177-SSA1-1998¹ como la guía de la FDA² indican que, se deben analizar al menos tres concentraciones conocidas por triplicado: baja, media y alta, dentro del rango; y comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones sin extraer. La recuperación absoluta debe ser reproducible a lo largo del rango.

2.3.1.3 Linealidad del método

La Linealidad del método es una relación matemática que describe el comportamiento de la respuesta (medida instrumental) y la concentración conocida del compuesto, que se desea cuantificar. Al conjunto de concentraciones que describen el comportamiento del rango, se le denomina curva de calibración. La NOM-177-SSA1-1998¹ menciona que

esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango y en la sección de definiciones dice que la respuesta debe ser proporcional a la concentración. La guía de la FDA² define la curva de calibración como la relación matemática entre la respuesta y la concentración conocida del compuesto. La relación matemática debe ser un modelo simple y adecuado a la relación concentración-respuesta obtenida. Asimismo, menciona que para describir una relación concentración-respuesta compleja (que no se ajusta a un modelo lineal) se puede recurrir al uso de modelos de regresión complejos o a la ponderación, siempre y cuando estén bien justificados.

Para cada compuesto presente en la muestra se debe generar una curva de calibración. Se requiere un número suficiente de concentraciones (niveles) para poder definir mejor la relación entre la concentración y la respuesta. Los niveles que constituirán una curva de calibración se eligen con base en el rango de concentraciones esperadas para un estudio en particular.

Una curva de calibración debe ser preparada con la misma matriz biológica que las muestras problema, mediante la adición de una concentración conocida del compuesto. La curva de calibración se constituye de una muestra blanco (matriz biológica procesada sin la adición de estándar interno), una muestra cero (matriz biológica procesada con la adición de estándar interno) y de 6 a 8 diferentes concentraciones (niveles) que cubran el rango esperado incluyendo el límite de cuantificación (LDC).

Para muchos de los métodos bioanalíticos los rangos de concentración usualmente son muy amplios, p.ej. 1-100 a 1-1000; en general el ajuste lineal de este tipo de rangos produce pequeñas desviaciones que pueden conducir a errores substanciales en la predicción de las concentraciones de los extremos del rango. El análisis de la linealidad es complicado por las interacciones entre el compuesto y los componentes de la matriz; por tanto la función respuesta debe ser evaluada tanto visualmente (gráficamente) como estadísticamente (análisis de varianza).

A continuación se enlistan algunos puntos críticos que se deben considerar como son: (1) el diseño del modelo durante el desarrollo, (2) la planeación de los experimentos, (3) la evaluación visual del modelo seleccionado, (4) eliminación de datos fuera de especificaciones, (5) la definición del comportamiento de la varianza en el rango establecido y (6) el análisis estadístico del modelo establecido.

La evaluación visual del modelo matemático frecuentemente se basa en la gráfica clásica de regresión lineal. Sin embargo, sería más fácil observar el comportamiento del modelo en una gráfica de residuales (un residual es la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad predicha por una curva de calibración). Si en la gráfica de residuales observamos un comportamiento homogéneo y cercano a cero, significa que el modelo matemático es adecuado. Si el comportamiento es heterogéneo, podría deberse a un modelo inadecuado o a errores de preparación. Una gráfica de residuales también indica la relación de cambio de las varianzas respecto a la concentración.

La frecuencia de datos fuera de especificaciones es indicativa del comportamiento del modelo matemático. Esto se vuelve complicado, porque se debe distinguir entre los datos fuera de especificaciones respecto al modelo matemático, de los datos aberrantes de un grupo de mediciones debidas a errores aleatorios. Por lo tanto, no se deben de eliminar estos datos antes de determinar claramente la razón, para evitar errores en la descripción del modelo de calibración.

Una vez establecido el modelo de calibración, se debe evaluar la varianza del rango ya que el modelo más simple de regresión es el método de mínimos cuadrados. Este modelo se basa en asumir que la varianza es constante (homoscedástico) y no cambia con la concentración. Si en un rango dado las varianzas no son constantes, entonces se debe de realizar una transformación o ponderación de los datos; una vez transformados o ponderados se debe nuevamente evaluar la gráfica de residuales y la curva de calibración. Con la ponderación o transformación de una curva de calibración se sacrifica la exactitud de las concentraciones altas del rango pero se mejora la exactitud de las concentraciones más pequeñas del mismo¹⁴.

Para evaluar la calidad de una curva de calibración se deben interpolar las respuestas obtenidas en la curva, calcular las concentraciones por nivel y compararlas contra con las concentraciones nominales; calcular el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen¹⁵.

La guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA², recomienda los siguientes criterios de aceptación para una curva de calibración. -La NOM-177-SSA1-1998¹ no menciona criterios de aceptación en el apartado de la Linealidad.

- La curva de calibración debe cumplir los siguientes criterios:
 - a) 20% de desviación de la concentración experimental respecto a la concentración nominal para el límite de cuantificación
 - b) 15% de desviación de la concentración experimental respecto a la concentración nominal para los otros niveles, excepto para el límite de cuantificación
 - c) Al menos 4 de 6 de los niveles deben estar dentro de los criterios anteriores, incluyendo el límite de cuantificación y la concentración máxima de la curva de calibración. Excluyendo los puntos que no cumplan los criterios anteriores, el modelo propuesto no debe ser nunca modificado.

2.3.1.4 Precisión y exactitud

La NOM-177-SSA1-1998¹ define a la exactitud como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia; y a la precisión como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

La reproducibilidad se refiere a la concordancia entre los resultados obtenidos con un mismo método bajo diferentes condiciones (tiempo, analistas, equipos, reactivos y laboratorios); y la repetibilidad se refiere a la concordancia entre sucesivas mediciones en la misma muestra.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998¹, para evaluar la repetibilidad se analizan por quintuplicado en el mismo día un mínimo de tres concentraciones conocidas; y para evaluar la reproducibilidad intralaboratorio se analizan 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, pero deben estar incluidas en el rango.

Al respecto, la guía de la FDA² sugiere que las concentraciones estudiadas se distribuyan de la siguiente manera: (1) nivel bajo (tres veces la concentración del límite de cuantificación), (2) nivel medio (cercano al centro de la curva de calibración) y (3) nivel alto (cercano al límite superior de la curva de calibración).

La guía de la FDA² a diferencia de la NOM-177-SSA1-1998¹ menciona que para evaluar la reproducibilidad se deben analizar por quintuplicado un mínimo de tres concentraciones; y la norma mexicana¹ menciona que por duplicado.

Para la determinación de la precisión intra-día o repetibilidad se deben calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas; procesadas por quintuplicado en cada uno de los días de análisis, a los tres niveles de concentración estudiados. Considerando al método preciso, si el promedio del coeficiente de variación en cada uno de los días de análisis es menor al $\pm 15.0\%$.

Para la determinación de la precisión inter-día o reproducibilidad se deben calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas; procesadas por quintuplicado o duplicado en los 3 diferentes días, a los tres niveles de concentración estudiados. Considerando al método preciso, si el promedio del coeficiente de variación de los tres días de análisis es menor al $\pm 15.0\%$.

La exactitud se evalúa al verificar que el promedio de la concentración interpolada, en los experimentos de precisión (reproducibilidad y repetibilidad), estuvieran dentro del $\pm 15.0\%$ de la concentración nominal.

2.3.1.5 Estabilidad

La estabilidad de un compuesto en una matriz biológica depende (1) de las condiciones de almacenamiento de la muestra, (2) de las características químicas del compuesto, (3) de las características químicas de la matriz biológica y (4) de las características físicas del contenedor.

La NOM-177-SSA1-1998¹ establece que la evaluación de la estabilidad del compuesto en la matriz biológica es útil para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, entre otros, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica.

Las condiciones que deben evaluarse durante el análisis de la estabilidad del compuesto en la matriz biológica deben reflejar las situaciones probables que pudieran ocurrir

durante la recolección y el análisis de las muestras. Las pruebas deben diseñarse para establecer las condiciones de estabilidad del compuesto durante la recolección y el transporte de las muestras, durante el almacenamiento de las muestras por períodos largos (estabilidad a la temperatura prevista de almacenamiento) y durante el procesamiento.

Adicionalmente, la guía de la FDA² indica que la estabilidad de un compuesto en una matriz biológica y un contenedor determinado, es particular de ese sistema y no puede extrapolarse a otras matrices y otro tipo de contenedores y recomienda incluir, también, la evaluación de la estabilidad del compuesto en solución.

Para evaluar la estabilidad la NOM-177-SSA1-1998¹ indica que se deben analizar muestras en la matriz biológica mediante el método propuesto, sometidas a diferentes condiciones de temperatura y almacenamiento, al menos por duplicado, a tres niveles de concentración. Para que el compuesto se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir con los criterios de exactitud y precisión antes mencionados. Además, las muestras analizadas deben ser interpoladas en curvas de calibración recién preparadas.

La NOM-177-SSA1-1998¹ recomienda evaluar la estabilidad de las muestras mínimo bajo las siguientes condiciones:

1. De muestreo y manejo de las muestras
2. De almacenamiento a largo plazo
3. A varios ciclos de congelación-descongelación
4. A temperatura ambiente
5. En el disolvente de inyección

De muestreo y manejo de las muestras

Evaluar la estabilidad del compuesto en la matriz biológica a las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su almacenamiento. Dentro de las variables a evaluar están el rango de pH en el que el compuesto es estable y el pH final de la muestra, el efecto de la luz, el tipo de anticoagulante, etcétera. Todas estas condiciones dependen de las características químicas del compuesto. Si se determina

que el compuesto es inestable en la matriz biológica, la adición de un aditivo apropiado: amortiguador, antioxidante o una enzima de inhibición, puede ser crucial para minimizar la degradación del compuesto.

De almacenamiento a largo plazo

Evaluar la estabilidad del compuesto en la matriz biológica, a la temperatura en que se almacenarán las muestras por un periodo de tiempo que abarque el tiempo necesario para demostrar la estabilidad del compuesto.

A varios ciclos de congelación-descongelación

Se debe determinar la estabilidad del compuesto, en la matriz biológica, después de dos ciclos de congelación-descongelación. Al respecto la guía de la FDA² recomienda realizar dos ciclos consecutivos de congelación-descongelación y analizar las muestras al tercer ciclo.

La guía de la FDA² señala que para evaluar la estabilidad de las muestras a ciclos de congelación-descongelación, se debe descongelar gradualmente a temperatura ambiente durante 24 horas, tres fracciones de al menos tres concentraciones conocidas de muestras. Una vez completada la fase anterior, las fracciones deben ser nuevamente congeladas por espacio de 12 a 24 horas bajo las mismas condiciones de almacenamiento de las muestras. El ciclo de congelación-descongelación anterior debe repetirse dos veces más. Al finalizar el tercer ciclo se deben analizar las muestras con el método propuesto.

Si el compuesto en la matriz biológica determinada es inestable a la temperatura indicada para su almacenamiento propuesto entonces las muestras deben ser almacenadas a -70°C.

A temperatura ambiente

Para evaluar la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente, tres fracciones provenientes de al menos tres concentraciones diferentes de muestras deben ser descongeladas gradualmente a temperatura ambiente y conservadas bajo esta condición durante un período de 4 a 24 horas (dependiendo de la duración esperada de

un día de análisis normal). Una vez completada la fase anterior, las muestras deben ser analizadas con el método propuesto.

Se considera a las muestras estables durante el período de tiempo evaluado a temperatura ambiente si, la concentración cuantificada no difiere en $\pm 15.0 \%$ de la concentración inicial y se cumplen con los criterios de precisión y exactitud.

En el disolvente de inyección

La estabilidad del compuesto en muestras procesadas debe ser evaluada tomando en cuenta el tiempo que permanecen las muestras en el inyector antes de ser analizadas.

Para evaluar la estabilidad del compuesto y su estándar interno en el disolvente de inyección se determina la concentración y se observa que ésta permanezca constante durante el tiempo establecido.

Estabilidad del estándar interno en solución

Si el método emplea un estándar interno, la estabilidad del estándar interno en solución se debe evaluar al menos durante 6 horas a temperatura ambiente. Si la solución requiere ser almacenada en refrigeración o congelación se debe demostrar su estabilidad por un período largo de tiempo bajo estas condiciones.

Una descripción perfecta de la estabilidad del compuesto es crítica, una mala observación podría comprometer los resultados de un estudio. Tanto la norma mexicana¹ como la guía de la FDA² indican evaluar la estabilidad de la muestra al comparar los resultados de las muestras envejecidas contra unas recién preparadas. La guía FDA² menciona que existen otras aproximaciones estadísticas basadas en intervalos de confianza para evaluar la estabilidad del compuesto.

Límite de de cuantificación

De acuerdo a la definición de la guía europea¹⁶ y de la FDA² para la validación de métodos bioanalíticos, el límite de cuantificación es la concentración más baja del compuesto de interés que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de precisión y exactitud. Es la concentración más pequeña del rango y no se debe confundir con el

límite de la detección Éste puede ser definido como la concentración correspondiente al menos 5 veces la respuesta respecto a un blanco; ó 5, 6 ó 10 desviaciones estándar del promedio de al menos 10 blancos. La norma mexicana¹ no menciona nada acerca de la relación señal-ruido que debe presentar el límite de cuantificación.

Para evaluar el límite de cuantificación se debe analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango, determinando la exactitud y precisión de la concentración cuantificada, la cual debe caer dentro del $\pm 20.0\%$ de la concentración nominal y el coeficiente de variación no debe ser mayor que $\pm 20.0\%$.

Límite de detección

El límite de detección es la concentración a la cual la señal del compuesto de interés en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles del ruido o de una muestra libre del compuesto. El límite de detección (LD) se determina al realizar diluciones con plasma a partir del límite de cuantificación. Se considera como límite de detección a aquella concentración en la que la relación señal-ruido se encuentra en una relación 2:1 a 4:1.

El límite de detección es un parámetro que no se contempla en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA².

Selectividad

La selectividad de un método bioanalítico se refiere a la habilidad de diferenciar y cuantificar exactamente a un compuesto en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Para evaluar la selectividad de un método se deben analizar muestras blancos de la matriz biológica apropiada (plasma, orina, y otras matrices), proveniente de al menos seis voluntarios sanos. Además se debe evaluar el efecto de posibles interferencias como podrían ser metabolitos, productos de degradación o cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante.

Se considera que un método es selectivo si no existen interferencias en la cuantificación del o los metabolitos (Cfr. NOM-177-SSA1-1998, p10¹).

Al respecto la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA² recomienda evaluar muestras blanco respecto al límite de cuantificación del método (Cfr. FDA², p 5). Para métodos cromatográficos, existen diversas técnicas alternativas útiles para demostrar la selectividad, entre ellas se incluyen las siguientes:

- Examinar los cromatogramas provenientes de muestras blanco y verificar que al tiempo de retención de los compuestos no existan respuestas debidas a los componentes endógenos de la matriz biológica¹⁵.
- Comparar la respuesta obtenida de muestras de concentración conocida preparadas en la matriz biológica con la respuesta obtenida en muestras preparadas en soluciones acuosas. Considerando el porcentaje de recuperación absoluta, se espera que la respuesta del compuesto obtenida en la matriz biológica no difiera en más del 15.0 % respecto a la respuesta del compuesto en solución. Si se observa una variación mayor, esta pudiera deberse a un efecto matriz. Para corroborar la presencia de dicho efecto se recomienda preparar curvas de calibración en diferentes fuentes de la matriz biológica, si se observan variaciones en las pendientes de las curvas éstas se deben a un efecto matriz (en el caso de procedimientos basados en espectrofotometría de masas, el efecto matriz es más significativo en comparación a otros detectores).
- Procesar muestras clínicas para detectar la presencia de compuestos relacionados.
- Evaluar el comportamiento cromatográfico, en el sistema propuesto de los metabolitos del compuesto de interés^{17, 26}.

La selectividad del método deberá ser evaluada durante (1) el desarrollo del método, (2) la validación y (3) la aplicación del mismo (Cfr. FDA², p11).

2.5 Monografía de la Amoxicilina

2.4.5 Descripción del fármaco

La Amoxicilina³ es una penicilina de amplio espectro (bacterias gram positivas y negativas), agente beta lactámico que produce daño en la pared celular de las bacterias. De modo breve, los pasos en que actúa el fármaco son: (1) unión a las

proteínas fijadoras de penicilina específicas (PBP) que sirven como receptores del fármaco en las bacterias, (2) inhibición de la síntesis de la pared celular al bloquear la transpeptidación de los peptidoglucanos y (3) activación de las enzimas autolíticas en la pared celular causando la muerte de las bacterias. Las penicilinas pueden ser bactericidas sólo si hay síntesis activa de peptidoglucanos, Las células metabólicamente inactivas no son afectadas⁴.

Entre los microorganismos con actividad beta-lactamasa destacan *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* o pneumococo, meningococos, gonococos, *Haemophilus influenzae*. Por otra parte *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Escherichia coli* han desarrollado resistencia contra la Amoxicilina⁴.

2.4.2 Nomenclatura³

Nombre genérico

Amoxicilina , Amoxicilina trihidrato, Amoxicilina sal de sodio

Nombres químicos

Chemical Abstracts:

4-Tio-1-azabicyclo [3, 2, 0] heptano-2-carboxílico, ácido,

6-[[amino (4-hidroxifenil) acetil] amino]-3,3-dimetil-7-oxo-, [2S-[2a, 5a, 6β(S*)]].

Nombres comerciales

Amoxican, Amoxil, Amoxyphen, Clamoxyl, Imacillin, Larotid, Moxacin, Moxilean, Novamoxin, Penamox, Polymox, Rodamox, Trimox, Utimox, Wymox. Además es ingrediente de Augmetin.

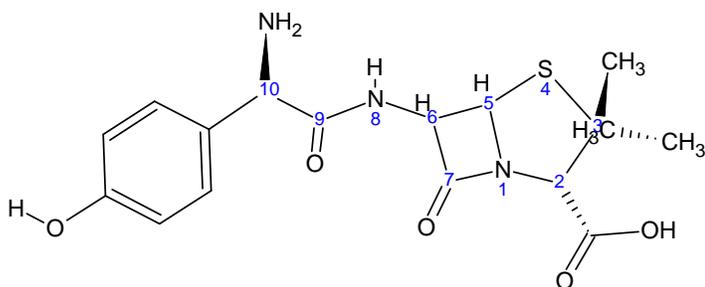
Fue desarrollada por los laboratorios *Beecham Research*³, presenta una mejor absorción en el tracto gastrointestinal que la ampicilina. Para la administración oral se prefiere la Amoxicilina trihidratada y la Amoxicilina sódica para uso parenteral⁵.

2.4.5 Propiedades químicas

Estereoquímica

La Amoxicilina tiene una configuración S, R, R, en C2, C5 y C6 respectivamente. La configuración del C10 es R. Aunque algunos la refieren como D (-)³.

Estructura, fórmula, peso molecular y composición



La estructura ha sido numerada de acuerdo a la nomenclatura de CAS (Chemical Abstracts Service) Convencionalmente las penicilinas se numeran como: 1S, C (CH3) 2, CH (COOH)3 y N 4.

Fórmulas y pesos moleculares (g/mol):

Amoxicilina	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.41
Amoxicilina trihidrato	$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$	419.45
Amoxicilina sal de sodio	$C_{16}H_{19}N_3O_5SNa$	387.39

2.4.5 Propiedades fisicoquímicas

Apariencia

Polvo cristalino blanco

Solubilidad:

Solubilidades a 15-25°C, aproximadas.

	Solubilidad (mg/mL)	
	Trihidrato	Sal de sodio
Agua	1-10	> 1000
Etanol	1-10	10-33
Cloroformo	< 0.1	< 0.1
Dietil éter	< 0.1	< 0.1
Acetona		0.1-1.0

Constantes de disociación¹⁸.

Las macro constantes de disociación de los tres grupos ionizables son:

	Temperatura (°C)	pKa		
		COOH	NH ₂	OH
Agua	22	2.4	7.4	9.6
Ac. KCl, μ 0.5	37	2.67	7.11	9.55
Ac. KCl, μ 0.5	35	2.87	7.28	9.65
Ac. KCl, μ 1.0	23	2.63	7.55	9.64
Ac. KCl, μ 1.0	35	2.61	7.3	9.45

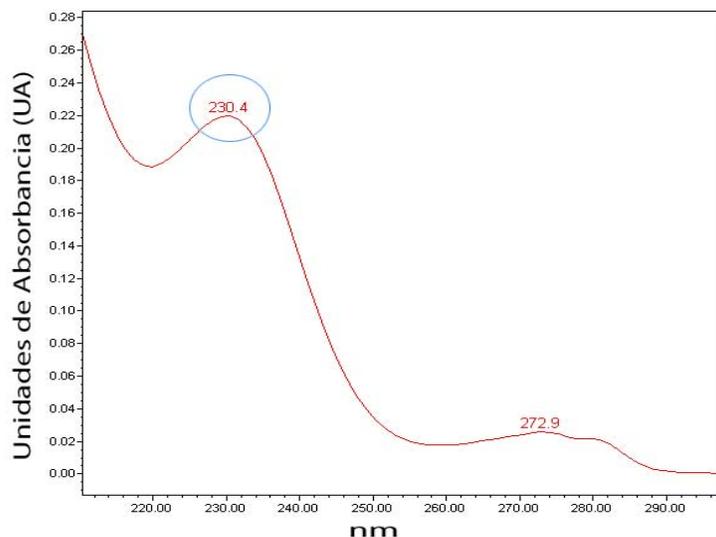
Coeficiente de partición (P)

Coeficientes de partición aparente en iso-butanol (2-metilpropanol) a 37°C son:

Fase acuosa	P
0.1M HCl	0.33
0.2M HCl	0.44
0.3M HCl	0.56
0.5M HCl	0.66
pH 7.4	0.13
pH 1-3	0.79
pH 5-6	0.13
pH 7-9.5	0.25

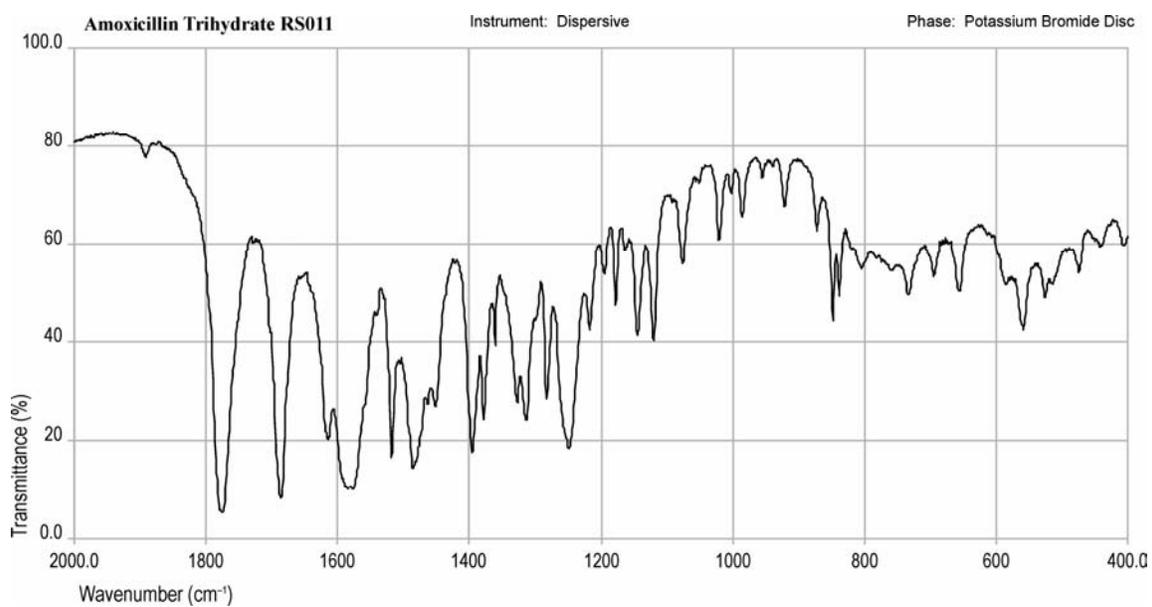
Espectro de ultravioleta:

Amoxicilina trihidrato: ácidos acuosos 230 nm ($A_{11}=225$ a), 272nm ($A_{11}=26$ a); bases acuosas 247nm ($A_{11}= 286b$), 291nm ($A_{11}= 62$ a).



Espectro de infrarrojo:

Los principales picos se presentan a las longitudes de ondas 1775, 1583, 1684, 1248, 1613, 1313 (Amoxicilina trihidrato, en disco de KBr).



2.4.5 Farmacocinética²⁷

Disposición en el cuerpo.

Se absorbe rápidamente después de la administración oral. Cerca del 60-80 % de la dosis es excretada en la orina sin cambios después de 6 horas y el 20% se excreta como metabolito inactivo, ácido penicilínico, en el mismo periodo; su secreción es tubular. Es estable en presencia de jugos gástricos. Al cabo de la administración parenteral, más del 75% de la dosis es excretada sin cambios en la orina después de 6 horas. Atraviesa la placenta en pequeñas cantidades además de aparecer también en la leche.

Dosis(mg) Amoxicilina	Cmax Amoxicilina
125	2.6
250	4.0-5.3
500	5.9-10.8
1000	10.2-19.7

Concentración terapéutica⁵.

La coadministración de Amoxicilina con comida, leche, antiácidos, cimetidina, ranitidina o pirenzepina no causa ningún efecto en la farmacocinética del fármaco en sujetos sanos. Por tanto, podríamos esperar pequeña significancia clínica durante su uso.

Tiempo de vida media de la Amoxicilina:

Es de una hora (61.3 min) aproximadamente, aumenta con el daño renal, y la concentración máxima plasmática muestra una relación directamente proporcional con la dosis administrada.

Volumen de distribución: Es cerca de 0.2 a 0.4 L/Kg.

Depuración: Depuración plasmática, 3 a 5 mL/min/Kg

Unión a proteínas: cerca del 20 %.

Efectos adversos

Reacciones de hipersensibilidad: La Amoxicilina puede ocasionar hipersensibilidad como otras penicilinas, por ello es contraindicada en los pacientes alérgicos.

Efectos gastrointestinales: La administración oral de la Amoxicilina puede causar náuseas, alteraciones epigástricas y diarrea, aunque el reporte de frecuencias de diarreas después del tratamiento con Amoxicilina es de cerca del 2%. En un estudio de 263 niños con otitis media la ampicilina produjo diarrea con más frecuencia que la Amoxicilina.

Problemas relacionados con el uso y abuso de las penicilinas: Las penicilinas son los antibióticos más ampliamente utilizados, lo que ha originado algunas consecuencias drásticas por el abuso de estos.

Una proporción importante (1 al 5%) de la población de muchos países ha resultado hipersensible; en muchos casos, no hay duda de que la sensibilización se presentó cuando se administró penicilina sin una adecuada indicación; sin embargo, la hipersensibilidad puede ser temporal. La saturación de algunos ambientes con penicilina (e.j. los hospitales) ha producido que algunos microorganismos desarrollen resistencia a la misma. En el decenio de 1950, los hospitales fueron un sitio importante para la proliferación y selección de estafilococos productores de beta-lactamasa. Ahora, estos productores de beta-lactamasa prevalecen en todos lados y producen cerca del 80% de las infecciones estafilocócicas adquiridas en la comunidad. Los plásmidos que controlan la producción de beta-lactamasa se están distribuyendo con una frecuencia cada vez mayor entre los diferentes géneros de microorganismos. Aún cuando los neumococos han sido considerados como ejemplo de susceptibilidad total y regular a las penicilinas; esto ya no es del todo cierto. En Nueva Guinea y Sudáfrica se han presentado brotes de neumococos relativamente resistentes a la penicilina, ocasionando neumonías y meningitis. En España y EE.UU., también se ha observado casos esporádicos de resistencia similar.⁵

2.5 Métodos analíticos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en fluidos biológicos

A continuación se presentan diversos métodos reportados²⁸ para la cuantificación de Amoxicilina por cromatografía de líquidos de alta resolución en plasma y suero humano, empleando diferentes técnicas de detección y extracción.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA		
Ref.	Metodología de la Extracción	Sistema cromatográfico
6	0.2 mL de plasma + 1 mL de amortiguador de fosfato pH 6.8 + 0.35 mL de E.I (cefadroxil, 60µg/mL), mezclar y transferir a un Bond-Elut C 18 SPE. Eluir con metanol acuoso al 40% (1mL), evaporar el extracto con N ₂ a 40 °C, reconstituir el residuo con metanol acuoso al 5 % e inyectar.	Guarda columna: 10 x 2 mm D.I. Columna analítica: Hypersil-I C18 (15 cmx 2mm D.I.) Temperatura 40°C. Fase móvil: acetonitrilo al 6% en amortiguador de fosfatos 5 mM: amortiguador de tetrabutilamonio 5mM pH 6.5. Detección por absorción ultravioleta a 210 nm.
Este método tiene la ventaja de concentrar la Amoxicilina. La sensibilidad del método es de 0.125µg/mL. El tratamiento de la muestra es complicado y costoso.		

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma empleando extracción en fase sólida.

INYECCIONES DIRECTAS POSTERIORES A UNA PRECIPITACIÓN		
Ref	Tratamiento de la muestra	Sistema cromatográfico
7	1.5 mL de plasma + 2.5 mL de metanol. Agitar en vortex por 15s Centrifugar a 2500 rpm por 5min. Inyectar 0.2 mL de sobrenadante directamente al sistema.	Columna: Lichrospher RP18 250x4mm. Gradiente entre el disolvente A (fosfato de potasio 0.01M, 0.02 M cloruro de tetrametilamonio, pH 2.5) y un solvente B (acetonitrilo). Flujo de 1 mL/min. Cromatografía de par-iónico. Detección por absorción ultravioleta a 220nm. Tiempo de elución de la amoxicilina 9.5 min.
8	0.3 mL de suero o plasma + 0.050 mL de HClO ₄ al 20 %. Agitar en vortex por 15s. Centrifugar por 2 min a 2000 rpm. Mezclar 0.150 mL de sobrenadante con 0.15 mL de acetato de sodio 1M pH 5. Inyectar el sobrenadante directamente al sistema.	Columna: Nucleosil C 18, 80* 4 mm. Fase móvil: ácido metanosulfónico 0.02M-acetonitrilo (98:2). Flujo de 1.1 mL/min. Para la reacción de post derivatización, se usa una solución amortiguadora 0.2 M (pH 8, KH ₂ PO ₄ y NaOH) y el reactivo derivatizante fluram al 0.01% en acetonitrilo. La detección es fluorométrica a 395 nm para la excitación y 485 nm para la emisión.
9	1 mL de plasma + 3 mL de metanol. Agitar en vortex. Centrifugar a 10000 rpm por 10min. Filtrar el sobrenadante con un 20 microconcentrador. Inyectar el sobrenadante directamente al sistema	Columna analítica: CLC-ODS (15cmx6mm D.I.). Temperatura 35°C. Fase móvil: amortiguador de fosfatos: amortiguador trimetilamina: metanol (194:26:5) pH 4.4. Detección por absorción ultravioleta a 222 nm.
10	0.05 mL de plasma + 0.45 mL de agua + ampicilina (E.I., 10mL, 0.2µg/mL-1) + 5 µL de HClO ₄ 50%, frío. Mezclar y centrifugar a 11600 rpm por 10 min. Transferir 0.45 mL de sobrenadante a un vial con 0.050 mL de NaOH 5M, mezclar por 5 min. Adicionar 0.25 mL de amortiguador de fosfatos conteniendo (bis) cloruro mercúrico (0.1%, w/v) y formaldehído (1.0% v/v). Mezclar e incubar a 50 °C por 40 min.	Guardacolumna ODS 20*2.0 mm D.I. Columna Kromasil ODS 3 mm, 150*3.2 mm D.I. Temp. Columna 40 °C. Fase móvil: metanol:agua (55/45 v/v). Detección fluorométrica con excitación de 365 nm y la emisión 445nm

<p>Extraer con acetato de etilo, centrifugar a 11600 rpm por 5min, evaporar y reconstituir con fase móvil.</p>	
<p>Los artículos anteriores plantean la inyección directa de la muestra al sistema, posterior a una precipitación con el uso de solventes, emplean la fluorescencia, absorción ultravioleta y la fluorometría para la detección. Un punto importante que plantea Wibawa y colaboradores¹⁰, es la inestabilidad de la Amoxicilina en soluciones acuosas a pH menores de 2, considerándose estable en el intervalo de pH de 4 a 7, de ahí la importancia de ajustar el pH de la muestra antes de inyectar.</p>	

Tabla 2. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma por inyecciones directas posteriores a una desproteización.

EXTRACCIÓN EN LÍNEA		
Ref.	Metodología de la Extracción	Sistema cromatográfico
11	<p>0.25 mL plasma + 0.25 mL de estándar interno en solución de amortiguador NaH₂PO₄ (pH 2.5) Transferir a un tubo concentrador (Centricon 10) Centrifugar por 30min a 5000 rpm. Inyectar 0.15 mL de sobrenadante directamente al sistema.</p>	<p>Columna: Spherisorb ODS 250x4.6 y 5µm de tamaño de partícula Guardacolumna: Nucleosil 100 C 18 Fase móvil A (para la elución de la muestra) 75:25 amortiguadora (heptanosulfonato Dihidrogenfosfato de sodio, pH 2.5): metanol. Flujo: 1.5ml/min. Fase móvil B (extracción de la muestra) 92:8 Solución amortiguadora: metanol. Flujo: 1.5ml/min. Cromatografía de par-iónico. Detección por absorción ultravioleta a 230 nm. Tiempo de elución de la amoxicilina 34.8 min.</p>
12	<p>0.5 mL de plasma + 0.25 mL solución precipitante. Agitar 1min y centrifugar a 2400 rpm durante 10 min. 0.45 mL de sobrenadante se transfieren a un vial que contiene 0.5 mL de</p>	<p>Dos columnas analíticas: CP Microspher C18 5 mm (100 x 4.6 mm D.I.), separadas por una válvula "switching". Guarda columna: Spherisorb S5 ODS (20x 4 mm D.I.). Fase de la primera columna: 10-11% de metanol en amortiguador de fosfatos pH 7.4 y de hexanosulfonato de sodio. La segunda columna 30-35% de metanol en amortiguador de fosfatos pH 7.4,</p>

	solución para ajustar pH (pH 5.4), mezclar e inyectar directamente al sistema.	10 y hidrogensulfonato de tetraxetilamonio . Cromatografía de par-iónico
13	La muestra de suero se inyecta directamente al sistema.	Columna analítica Chromspher C 18, 250x4.6 mm D.I. 5 µm tamaño de partícula. Guardacolumna con superficie semi-permeable (10x3mm, 5mm tamaño de partícula). Fase móvil de lavado 98:2 acetonitrilo: 0.1M Na ₂ PO ₄ . Fase de elución: 85.5:14.5 acetonitrilo: 0.1M Na ₂ PO ₄ . Cromatografía en fase reversa. Detección por absorción ultravioleta a 234 nm
<p>En el método desarrollado por Muth Peter y colaboradores¹¹, se reporta un tiempo de retención para la Amoxicilina de aproximadamente 30 min, lo que implica corridas analíticas largas. El empleo de dos columnas analíticas propuesto por Carlqvist Jan y Westerlund Douglas¹², y la posterior derivatización de la Amoxicilina con fluorescamina se traducen en largos tiempos de tratamiento de la muestra. Por último Zijtveld J. Van y colaboradores¹³ emplean suero como matriz biológica de trabajo.</p>		

Tabla 3. Métodos reportados para la cuantificación de Amoxicilina en plasma y extracción en línea.

3. JUSTIFICACIÓN

El propósito de este trabajo es diseñar y validar un método bioanalítico para cuantificar la Amoxicilina en muestras plasmáticas por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), con ventajas sobre los métodos antes reportados^{6-13,28} en cuanto a la sensibilidad, rapidez en la preparación de las muestras, confiabilidad y además involucre el uso de reactivos más accesibles. El método será utilizado durante el estudio de bioequivalencia, para lo cual es necesario tomar en cuenta los criterios de validación de métodos analíticos establecidos en la NOM-177-SSA1-1998¹.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Desarrollar (diseñar) y validar un método analítico para la cuantificación de Amoxicilina en plasma humano, altamente sensible y selectivo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que cumpla con la normatividad nacional vigente.

4.2 Objetivos particulares

- Realizar una revisión bibliográfica enfocada hacia los aspectos de la Amoxicilina que permitan delimitar las características que debe tener el método analítico.
- Obtener condiciones cromatográficas: (1) Selectivas que permitan separar a la Amoxicilina de los compuestos endógenos del plasma, (2) Robustas y (3) Reproducibles.
- Obtener condiciones cromatográficas y del tratamiento de la muestra que nos permita obtener un método lo suficientemente sensible capaz de caracterizar el rango requerido.
- Validar el Método Analítico propuesto según los criterios de la NOM-177-SSA-1998.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Sustancias de referencia, reactivos y equipo

Sustancias de referencias

Nombre: Amoxicilina USP. Lote i

Nombre: Enalaprilat USP, lote H

Reactivos

Agua HPLC

Ácido perclórico RA

Hidróxido de sodio RA

Ácido ortofosfórico RA

Acetonitrilo HPLC

Ácido 1-Octanosulfónico RA

Fosfato monobásico de sodio RA

Equipo

El sistema empleó un Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a detector UV, equipado con controlador capaz de realizar gradiente, válvula de 6 vías para dos cambios, una columna Zorbax SB-C18 de 4.6 mm X 250 mm con tamaño de partícula de 5 µm, columna Xterra RP18 con tamaño de partícula de 5 µm, automuestreador con control de temperatura y horno de control de temperatura en la columna.

5.2 Parte Experimental: Resultados y análisis

5.2.1 Desarrollo (diseño) del método analítico para cuantificar Amoxicilina en plasma

Como se mencionó en la introducción, el diseño o desarrollo del método analítico²⁹ es parte importante de la validación, este se enfoca a diseñar una metodología robusta, capaz de cumplir con los criterios de aceptación

requeridos. La secuencia óptima de los experimentos no se indica en ninguna guía de desarrollo o validación, si no que depende del método en sí mismo. Durante el presente desarrollo se diseñaron los experimentos en forma secuencial, retándose cada una de las características o parámetros a cumplir con los criterios de aceptación requeridos. A continuación se muestra la lista de experimentos evaluados durante el diseño:

1. Selectividad y Recuperación absoluta (optimización de la separación y del procesamiento de la muestra)
2. Precisión
3. Linealidad, límite de cuantificación y rango
4. Exactitud a diferentes concentraciones
5. Tolerancia

5.2.3.2

5.2.3.3 Evaluación de la selectividad y recuperación absoluta del método

Es recomendable evaluar la selectividad junto con la recuperación absoluta. Un método podría ser selectivo, pero con un recobro tal que la sensibilidad sea insuficiente. Aunque la norma NOM-177-SSA-1998 no exige un determinado por ciento de recuperación absoluta es recomendable que este sea muy cercano al 100%. Porcentajes de recobro altos aseguran que la sensibilidad del método sea la adecuada.

5.2.3.4 Diseño del sistema cromatográfico

Considerando las características fisicoquímicas de la molécula y el comportamiento cromatográfico reportado en la revisión bibliográfica³, se diseñó el sistema cromatográfico siguiente (se usó como referencia el método reportado por Muth Peter¹¹).

Variables	Condiciones cromatográficas
Columna Dimensiones (longitud y D.I) Tamaño de partícula Fase estacionaria	250x4.6mm 5µm ZORBAX SB C 18*
Fase Móvil pH Concentración del Par iónico ²⁰ y Proporción de la fase móvil Flujo	pH 2.5* Fosfato de sodio monobásico NaH ₂ PO ₄ Octanosulfonato de sodio 10 mM* 75:25, v/v amortiguador: ACN* 1.5 mL/min*
Volumen de inyección	100 µL
Temperatura de la	45 °C

Tabla 4. Sistema cromatográfico 1. *El Artículo publicado Muth Peter y cols.¹¹ sirvió como referencia para establecer estos parámetros.

Con el sistema cromatográfico 1 (ver la Tabla 4) se determinó la sensibilidad del método y algunos parámetros cromatográficos específicos de la Amoxicilina como son: (1) el tiempo de retención y (2) la simetría de la señal cromatográfica. En la Figura 1 se muestra el cromatograma típico de la Amoxicilina en solución acuosa (20µg/mL), de la figura se observa que el tiempo de retención es de aproximadamente 10 min con una señal cromatográfica bien definida cuando se analizan estándares acuosos y un factor de simetría de 1.2. El sistema cromatográfico diseñado fue capaz de trabajar en el rango de concentraciones propuesto (0.2 a 25 µg/mL), en forma selectiva. Con esto se concluyó el diseño del sistema cromatográfico.

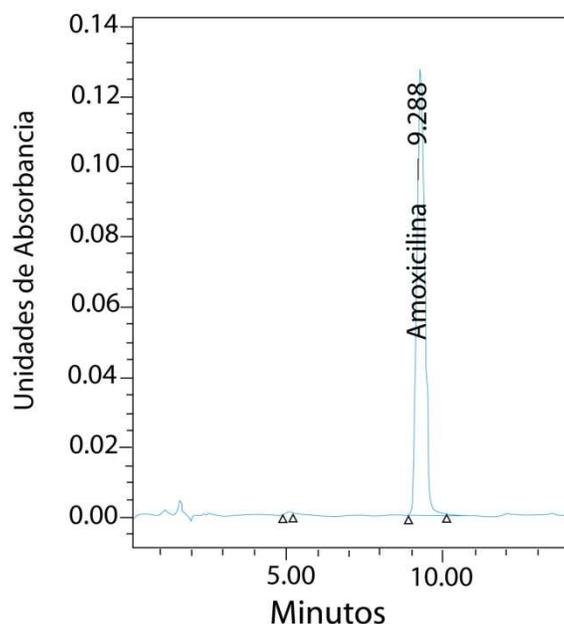


Figura 1. Cromatograma de Amoxicilina en solución acuosa (20 μ g/mL).

5.2.3.5 Diseño del procesamiento de la muestra

Una vez establecido el sistema cromatográfico, el siguiente paso fue diseñar el método de procesamiento de la muestra. Se evaluó el porcentaje de recuperación absoluta para cada uno de los procesamientos propuestos.

La Amoxicilina se comporta como un zwitterion($+ H_3N-RO^-$) en el rango de pH de 3-6, como catión a un pH cercano a 2 y como anión a pH cercano a 7.2; a cualquier valor de pH, la molécula se encuentra ionizada. En los antecedentes (ver la monografía de la Amoxicilina) se presenta que el coeficiente de partición aparente en iso-butanol (2-metilpropanol) es de 0.79 a 37°C a un pH entre 1-3³. En los métodos reportados utilizan ácidos y disolventes orgánicos como agentes precipitantes seguidos de una extracción en fase sólida, ninguno reporta extracción líquido- líquido. Considerando la información anterior se evaluaron los siguientes métodos de procesamiento²⁵: (1) la precipitación de las proteínas y (2) la precipitación de las proteínas seguida de la extracción en fase sólida.

Con respecto al primer método de procesamiento, se probaron dos agentes precipitantes: el metanol y el ácido perclórico al 40 %. Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la Tabla 5. De los resultados se observa que la precipitación selectiva de proteínas con metanol no es eficiente (ver Figura 2) ya que existen señales que interfieren con la señal cromatográfica de la Amoxicilina.

La eficiencia mejora notablemente cuando se emplea ácido perclórico como agente precipitante. Éste permite obtener zonas libres de interferencias al tiempo de retención de la Amoxicilina, así como un recobro aproximado del 60%. El uso del ácido perclórico tiene la desventaja de generar pH menores a 2, afectando la estabilidad de la molécula. Para asegurar la estabilidad de la Amoxicilina en la muestra, se ajusta el pH final de la muestra a 3 con hidróxido de sodio 2 N.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	
EXPERIMENTO 1: METANOL	RESULTADOS
250 µL plasma + 500mL Metanol Agitar en vortex por 3 min Centrifugar a 3500 rpm. por 10 min a 4 °C Separar sobrenadante, evaporar y reconstituir en fase móvil.	El método de extracción no permite obtener zonas libres de interferencias al tiempo de retención de la Amoxicilina, por tanto la recuperación absoluta no fue evaluada.
EXPERIMENTO 2: ÁCIDO PERCLÓRICO	RESULTADOS
800 µL plasma + 60 µL HClO ₄ al 40% Agitar en vortex por 1 minuto Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C Inyectar una alícuota del sobrenadante	-Las muestras blancos empleadas en este experimento no presentan interferencias, al tiempo de retención de la Amoxicilina. -La recuperación absoluta de la Amoxicilina con este método es de

Tabla 5. Evaluación de la selectividad del método con el uso de agentes precipitantes.

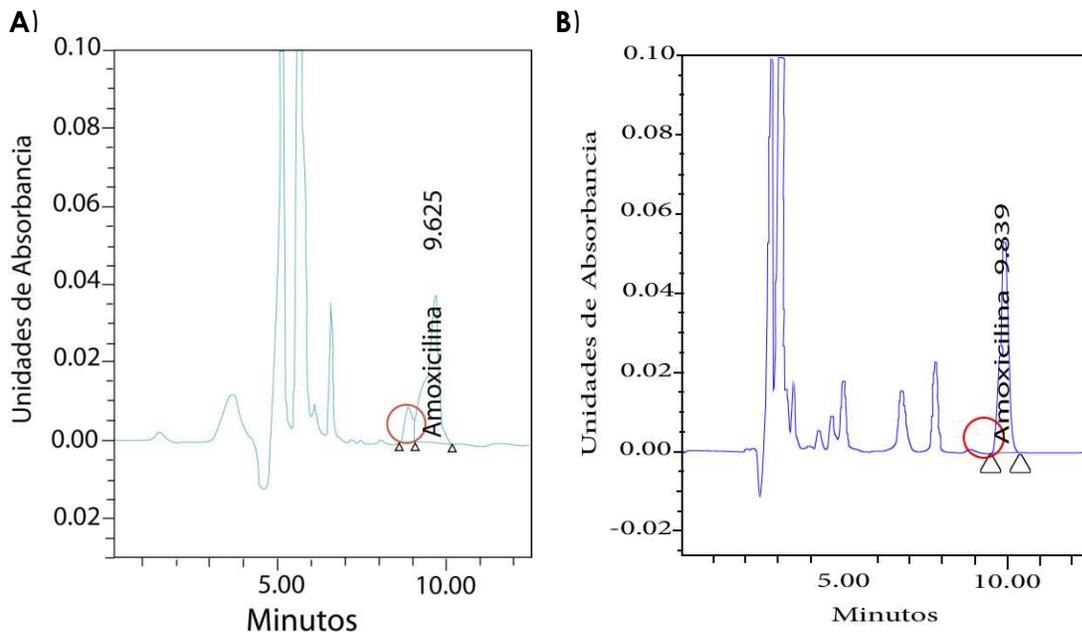


Figura 2. Eficiencia del tratamiento de la muestra por precipitación selectiva en plasma humano adicionado con Amoxicilina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **(A)** Precipitación con metanol. **(B)** Precipitación con HClO_4 al 40 %.

Aunque la eficiencia de la precipitación con ácido perclórico al 40 % es adecuada se observó que al realizar inyecciones sucesivas a la columna ésta pierde eficiencia ocasionando irreproducibilidad en los resultados. Por lo tanto, se planteó incorporar la extracción en fase sólida de las muestras (segundo método propuesto), mediante el uso de la cromatografía bidimensional para evitar la pérdida de eficiencia en la columna. La extracción en fase sólida se realizó en línea, posterior a la precipitación de proteínas con el ácido perclórico al 40%.

5.2.3.6 Estrategia para implementar la extracción en línea en fase sólida (cromatografía bidimensional)

Los procedimientos cromatográficos con columnas acopladas (cromatografía bidimensional^{22, 23,24}) consisten de dos etapas:

- a) Introducción de la muestra al sistema
- b) Transferencia de la muestra en la columna C1 a la C2.

a) Introducción de la muestra al sistema

Durante la introducción de la muestra al sistema, los dos parámetros más importantes que se deben evaluar son: (1) La elección de la primera columna separadora o de extracción (C-1) y (2), y la fuerza eluotrópica de la fase móvil utilizada para la extracción (M-1).

Se seleccionó la columna de extracción y se caracterizó el tiempo de retención de la Amoxicilina, empleando fases móviles con diferente composición.

I. Columnas de extracción "C1" evaluadas:

- a. Oasis HLB 2.1x20 mm, 2.5 µm de tamaño de partícula

El empaque de los cartuchos Oasis HLB es un copolímero macroporoso constituido por una proporción de dos monómeros, divinilbenceno (lipofílico) y N-vinilpirrolidona (hidrofílico). Con el empaque Oasis HLB pueden extraerse compuestos ácidos, básicos y neutros, tanto polares como no polares.

- b. Xterra RP 18 3.9*20 mm y 5 µm de tamaño de partícula.

El empaque de los cartuchos Xterra RP 18 presenta una estructura molecular tal que la concentración de silanol se reduce en la superficie, además de incorporar un grupo polar embebido que mejora la forma del pico y permite una mayor humectación con fases móviles 100% acuosas.

II. Fases móviles de extracción "M1" evaluadas:

La composición de la fase móvil "M1" en todos los casos estuvo constituida por solución amortiguadora de fosfatos-octanosulfonato 10 mM, pH 2.5 y acetonitrilo a diferentes proporciones. Se evaluaron proporciones con una fuerza de elución baja (La proporción del disolvente orgánico no fue mayor al 30 por ciento). La evaluación del tiempo de retención se hizo conectando directamente la columna C-1 al detector, se realizaron inyecciones tanto de soluciones acuosas y plasmáticas. Los resultados observados se muestran en las Tablas 6 y 7.

En la columna Oasis con una fase móvil cuya proporción fue de 90:10 de solución Amortiguadora: acetonitrilo, el tiempo de retención de la Amoxicilina es de aproximadamente 5.8 minutos, la señal cromatográfica no es definida, el ancho de banda de la señal es de aproximadamente 4 minutos.

En la columna XTerra con una fase móvil a una proporción de 95:15 de solución amortiguadora: acetonitrilo, el tiempo de retención de la Amoxicilina fue de aproximadamente 5 minutos con una señal cromatográfica bien definida.

La columna oasis no fue adecuada para la extracción en línea debido a que presenta una dispersión de banda muy grande originada por la baja eficiencia de su fase estacionaria; contra lo que se observa en una columna XTerra. La alta dispersión de la banda podría originar irreproducibilidad en el porcentaje de recuperación. Por lo tanto, se empleo la columna XTerra como la columna de extracción. La columna XTerra permite eliminar las interferencias de la muestra que eluyen a partir del tiempo cero hasta los primeros 4.5 minutos aproximadamente, sin poner en riesgo el porcentaje de recuperación de la Amoxicilina.

Columna Oasis HLB 2.1x20 mm		
Proporción de la fase móvil "M1"	Resultados	Cromatograma
90:10	Dada las características físico-químicas de la Amoxicilina, su comportamiento cromatográfico en este tipo de columna produce una señal coleada (poco simétrica). La Amoxicilina comienza a eluir a partir de los 2 min aproximadamente	

Tabla 6. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en la columna Oasis HLB 2.1x20 mm.

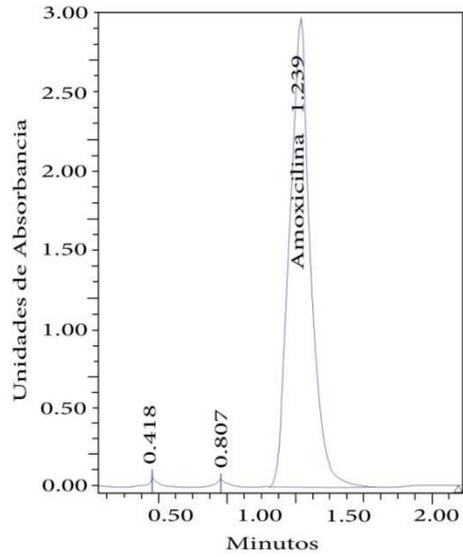
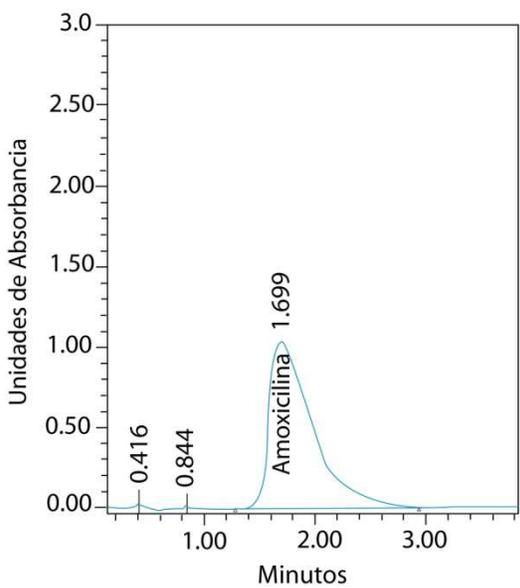
Columna Xterra RP 18 3.9*20 mm		
Proporción de la fase móvil "M1"	Resultados	Cromatograma
75:25	Poca retención	 <p>The chromatogram for the 75:25 mobile phase ratio shows three peaks. The first peak is at 0.418 minutes, the second at 0.807 minutes, and the third, much larger peak is labeled 'Amoxicilina' at 1.239 minutes. The y-axis is 'Unidades de Absorbancia' ranging from 0.00 to 3.00, and the x-axis is 'Minutos' ranging from 0.50 to 2.00.</p>
80:20	Poca retención	 <p>The chromatogram for the 80:20 mobile phase ratio shows three peaks. The first peak is at 0.416 minutes, the second at 0.844 minutes, and the third, larger peak is labeled 'Amoxicilina' at 1.699 minutes. The y-axis is 'Unidades de Absorbancia' ranging from 0.00 to 3.00, and the x-axis is 'Minutos' ranging from 1.00 to 3.00.</p>

Tabla 7. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en la columna Xterra RP 18 3.9*20 mm en diferentes proporciones de la fase móvil.

Columna Xterra RP 18 3.9*20 mm		
85:15	Poca retención	<p>Chromatogram showing Amoxicilina peak at 2.913 minutes. The y-axis is 'Unidades de Absorbancia' (0.00 to 3.0) and the x-axis is 'Minutos' (0.00 to 4.00). Other peaks are labeled at 0.458, 0.614, 1.352, 1.613, and 4.629 minutes.</p>
95:15	Tiempo de retención óptimo.	<p>Chromatogram showing Amoxicilina peak at 5.138 minutes. The y-axis is 'Unidades de Absorbancia' (0.00 to 3.0) and the x-axis is 'Minutos' (0.00 to 6.00). Other peaks are labeled at 0.503, 0.710, 2.200, and 2.745 minutes.</p>

Tabla 7. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en la columna Xterra RP 18 3.9*20 mm en diferentes proporciones de la fase móvil (continuación de la Tabla 7).

En resumen, se definió como columna de extracción (C-1) a la columna XTerra, con una fase móvil de extracción "M1" cuya composición fue del 95:5 de solución amortiguadora: acetonitrilo. La fase móvil asegura un mayor tiempo de extracción sin poner en riesgo el recobro de la Amoxicilina, con un tiempo de extracción propuesto de 4.5 minutos. Este tiempo de extracción propuesto asegura que la Amoxicilina permanece retenida en la columna de extracción sin ser eliminada con las interferencias.

b) Transferencia de la muestra de la columna C1 a la columna C2 mediante la fase móvil de elución "M2"

Después de la elección de la columna de extracción (C-1=XTerra) y de la composición de la fase móvil de extracción así como del tiempo de extracción; se determinó el tiempo de transferencia o de elución de la Amoxicilina de la columna C1 a la columna C2, cuando ambas columnas están conectadas en serie.

En la columna C-2 se lleva a cabo el análisis de la muestra transferida, realizándose una separación y detección convencional de los compuestos de interés, después de haber eliminado la mayor parte de los interferentes. La columna C2 será la misma que la indica en la Tabla 4 (Zorbax SB C18), sólo se evaluarán proporciones diferentes de la fase móvil "M2", con una mayor fuerza de elución que la fase móvil "M1". El tiempo de elución o de transferencia necesariamente debe ser menor que el establecido para la de extracción, ya que la elución ocurre más rápidamente por el cambio de composición de la fase móvil. En nuestro caso se estableció empíricamente de 2 minutos.

La composición de la fase M2 evaluadas y los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 8. Para cada una de las condiciones evaluadas el tiempo de extracción fue de 4.5 minutos y el de elución 2 minutos con un flujo de 1.5 mL por minuto para ambas fases.

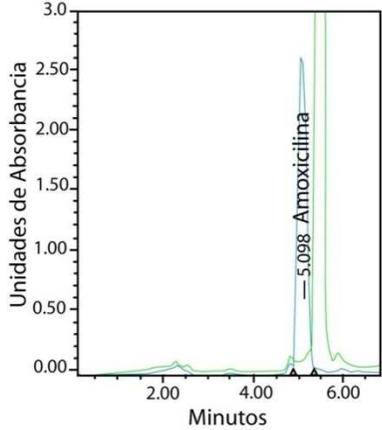
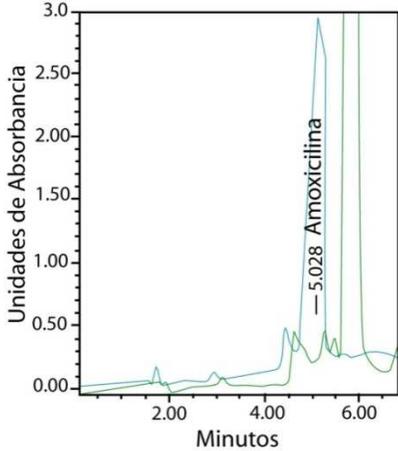
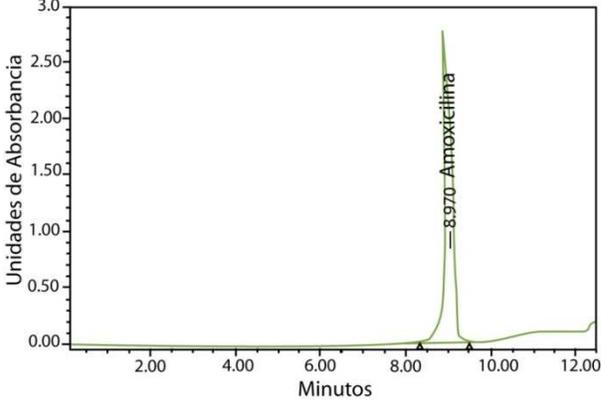
Fase móvil	Observaciones	Cromatograma
75:25 Solución Amortiguadora : Acetonitrilo	La Amoxicilina eluye en el frente de disolvente. La selectividad del sistema no es adecuada.	 <p>The chromatogram shows absorbance units on the y-axis (0.00 to 3.0) and time in minutes on the x-axis (0 to 6.00). A single sharp peak is labeled 'Amoxicilina' at a retention time of 5.098 minutes.</p>
78:22 Solución Amortiguadora : Acetonitrilo	La Amoxicilina eluye en el frente del disolvente, pero se observa que la selectividad mejora al disminuir la fuerza de elución.	 <p>The chromatogram shows absorbance units on the y-axis (0.00 to 3.0) and time in minutes on the x-axis (0 to 6.00). A single sharp peak is labeled 'Amoxicilina' at a retention time of 5.028 minutes.</p>
82:18 Solución Amortiguadora : Acetonitrilo	La selectividad del sistema es adecuada.	 <p>The chromatogram shows absorbance units on the y-axis (0.00 to 3.0) and time in minutes on the x-axis (0 to 12.00). A single sharp peak is labeled 'Amoxicilina' at a retention time of 8.970 minutes.</p>

Tabla 8. Caracterización de los tiempos de retención de la Amoxicilina en un sistema de cromatografía bidimensional.

De los cromatogramas de la Tabla 8 se observa que las 2 primeras de fases de elución (M2) evaluadas no permiten separar las interferencias de la matriz de la señal cromatográfica de la Amoxicilina, es decir, son poco selectivas. La proporción 82:18 de solución amortiguadora: acetonitrilo resultó ser la más adecuada, ya que permite obtener zonas libres de interferencias al tiempo de retención de la Amoxicilina. Una vez definidas las características del sistema cromatográfico, adecuadas para asegurar la selectividad del método se evaluó el porcentaje de recuperación absoluta.

El porcentaje de recuperación absoluta obtenido con el método hasta ahora propuesto fue del 40%. Para optimizar el porcentaje de recuperación absoluta, se modificó el tiempo elución de 2 a 2.5 min y el por ciento de recuperación se incrementó al 50%. Asimismo, se disminuyó el tiempo de extracción de 4.5 a 3 minutos, pero el porcentaje de recuperación no mejoró sustancialmente. Se estableció el tiempo de extracción en 3 minutos para disminuir el tiempo total de la corrida, ya que se demostró que no afectaba el porcentaje de recobro. Los blancos de plasma analizados con el método de procesamiento de las muestras propuesto no muestran interferencias al tiempo de elución de la Amoxicilina.

Para evaluar la selectividad del método para los metabolitos se analizó con el método propuesto dos muestras de plasma provenientes de un sujeto sano al que se le administró una tableta de Amoxicilina de 500mg. Las muestras analizadas correspondieron al tiempo cero y 1 hora después de la ingesta (este tiempo corresponde al $t_{1/2}$ de la Amoxicilina reportado en la bibliografía ³). Se observó que la muestra al tiempo cero no presentó señales al tiempo de retención de la Amoxicilina y la muestra de 1 hora presentó sólo la señal debida a la Amoxicilina.

Para evaluar la selectividad del método a posibles productos de degradación producidos durante el procesamiento o almacenamiento de las muestras, se comparó la respuesta obtenida en soluciones acuosas recién preparadas contra la respuesta obtenida en las muestras plasmáticas después de procesar y durante su almacenamiento en el disolvente de inyección, realizando la corrección

debidas al recobro del método. Se observó que la muestra es estable a las condiciones de procesamiento diseñadas y permanece estable hasta por 48 horas a 4°C.

5.2.2 Evaluación de (1) la linealidad, (2) rango y (3) límite de cuantificación

Una vez evaluada la selectividad y la recuperación absoluta del método, se evaluó la linealidad, la precisión y la exactitud en el rango de concentraciones comprendido entre 0.2µg/mL-20µg/mL de Amoxicilina. En la Figura 3 se muestra un cromatograma representativo del límite de cuantificación (0.2µg/mL). De la evaluación de la linealidad se observó una irreproducibilidad de los resultados, por lo que fue necesario usar un estándar interno para la cuantificación de la Amoxicilina.

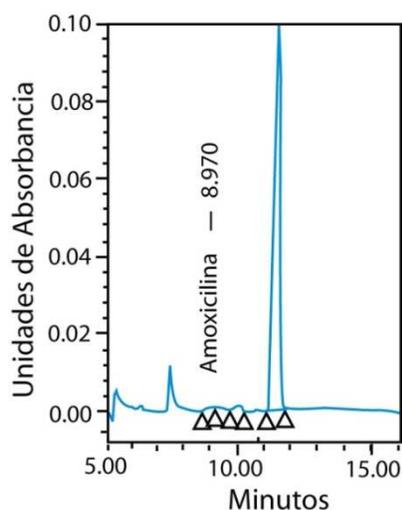


Figura 3. Cromatograma representativo del límite de cuantificación de Amoxicilina en plasma obtenido con el método propuesto (0.2 µg/mL).

Para la selección del estándar interno, se evaluaron diferentes sustancias con una estructura similar a la Amoxicilina, en la Tabla 9 se presentan las estructuras de las sustancias evaluadas así como los resultados obtenidos.

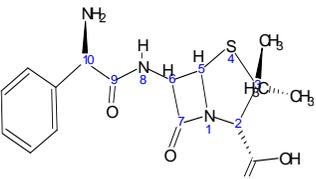
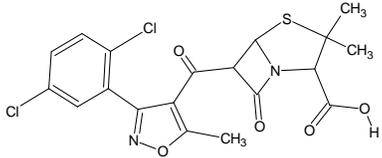
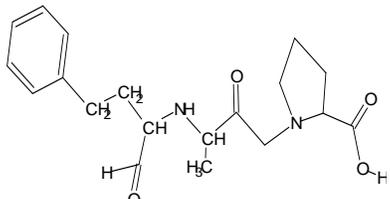
Nombre	Estructura	Observaciones
Ampicilina	 <p>The image shows the chemical structure of Ampicillin, a penicillin derivative. It features a phenylacetamido group attached to the 6-aminopenicillanic acid core. The structure is numbered with atoms 1 through 10, and includes stereochemical indicators for the chiral centers.</p>	<p>El tiempo de retención de la ampicilina fue de aproximadamente 20 minutos. Se observa que la Ampicilina se degrada fácilmente a las condiciones de almacenamiento de las muestras en el inyector.</p>
Dicloxacilina	 <p>The image shows the chemical structure of Dicloxacillin, a penicillinase-resistant penicillin. It has a 2,6-dichlorophenylacetamido group and a methoxy group on the penicillanic acid core.</p>	<p>El tiempo de retención de la dicloxacilina fue mayor a 20 minutos.</p>
Enalaprilat	 <p>The image shows the chemical structure of Enalaprilat, an ACE inhibitor. It consists of a proline ring system linked to a dipeptide chain that includes a phenylalanine derivative.</p>	<p>Su tiempo de retención fue de aproximadamente 12 minutos. Es estable en las condiciones de almacenamiento en el inyector.</p>

Tabla 9. Lista de sustancias evaluadas como estándar interno.

De las sustancias evaluadas el Enalaprilat resultó ser la más adecuada, porque no interfiere con la Amoxicilina, es estable en el disolvente de inyección y puede extraerse con el método propuesto, con un recobro muy similar al de la Amoxicilina (el porcentaje de recuperación absoluta es del 60% aproximadamente).

Se evaluó la linealidad, la precisión y la exactitud empleando como respuesta la relación que existe entre el área de Amoxicilina y el Enalaprilat. Los resultados cumplieron con los criterios de linealidad, precisión y exactitud del método

indicados en la norma (NOM-177-SSA1-1998)¹. Con base en los resultados obtenidos se concluye el proceso de diseño o desarrollo y comienza la validación del método. En la Figura 4 se muestran cromatogramas típicos obtenidos de la evaluación de la Linealidad, precisión y exactitud, antes de iniciar la validación.

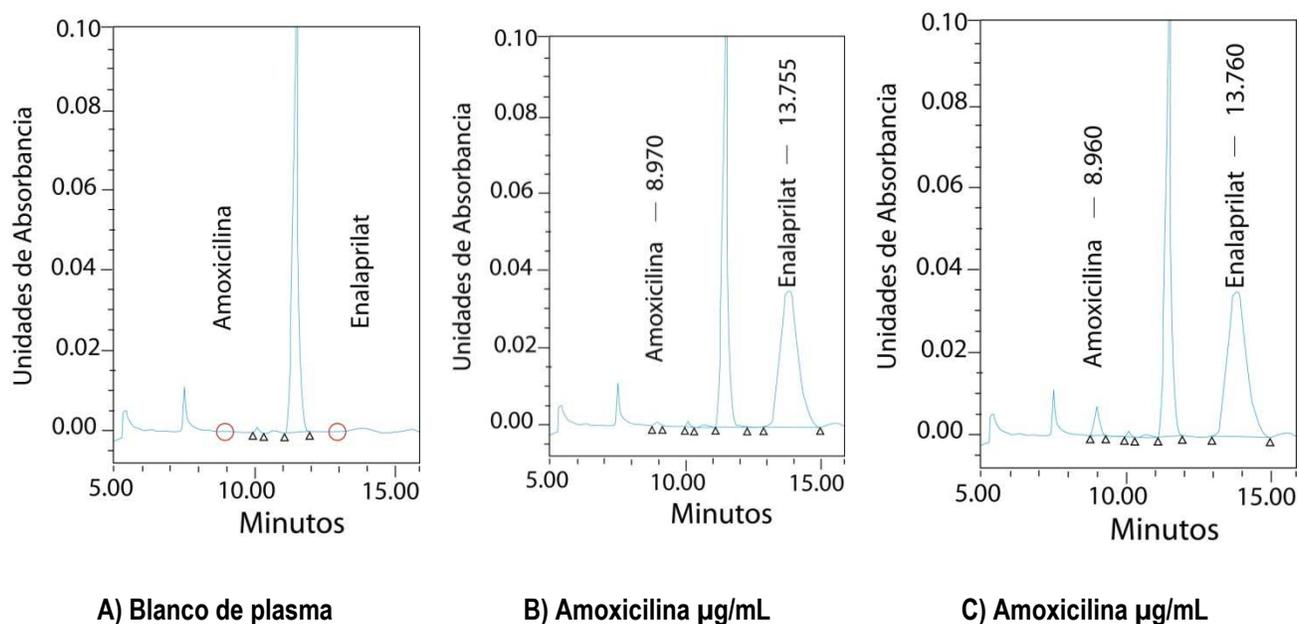


Figura 4. Cromatogramas típicos obtenidos con las condiciones cromatográficas y de extracción de la muestra del método propuesto. **A)** blanco de plasma. **B)** Amoxicilina 0.2 µg/mL. **C)** Amoxicilina 1 µg/mL.

5.2.3 Resumen del método cromatográfico propuesto

5.2.3.7 Sistema cromatográfico

- Para la elución y detección:

La fase móvil de elución es una mezcla de fosfato de sodio monobásico 30 mM- Octanosulfonato de sodio 10 mM, pH 2.5 y acetonitrilo en una proporción 82:18 v/v con un tiempo de elución de 2.5 minutos. La separación se lleva a cabo en una columna ZorbaxSB C18 250x4.6mm y 5 µm de tamaño de partícula a una

temperatura de 45°C y un flujo de 1.5 mL/min. La temperatura del inyector es de 4°C. La detección se realiza a una longitud de onda de (λ) 230 nm.

- *Para la extracción:*

Para la extracción en línea se emplea una columna XTerra RP C18 de 3.9x20mm y 5 μ m de tamaño de partícula. La fase móvil de extracción es una mezcla de fosfato de sodio monobásico 30 mM-Octanosulfonato de sodio 10 mM, pH 2.5 y acetonitrilo en una proporción 95:5 v/v, y el tiempo de extracción es de 3 minutos. Ésta se realiza sin control de temperatura y un flujo de 1.5 mL/min.

5.2.3.2 Procesamiento de la muestra

- Transferir 0.8 mL de la muestra a un tubo eppendorf de 1.5 mL
- Adicionar 30 μ L estándar interno (Enalaprilat a una concentración de 20 μ g/mL)
- Adicionar 40 μ L del ácido perclórico al 40 %
- Homogeneizar con agitador tipo vórtice durante 1 min y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un vial de vidrio que contenga previamente 50 μ L de hidróxido de sodio 2N, homogeneizar con pipeta pasteur y transferir a insertos.
- Inyectar 150 μ L al sistema cromatográfico.

5.2.4 Validación del método analítico

De acuerdo con lo establecido en la NOM-177-SSA1-1998¹, referente a la validación de los métodos analíticos para pruebas de Bioequivalencia, se validaron los siguientes parámetros:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Rango | 6. Estabilidad |
| 2. Recuperación Absoluta | 6.1 Estabilidad de la muestra sometida a varios ciclos de congelación-de |
| 3. Linealidad | 6.2 Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección. |
| 4. Precisión | 6.3 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente. |
| 4.1 Repetibilidad | 6.4 Estabilidad de la muestra a condiciones de almacenamiento a largo |
| 4.2 Reproducibilidad | 7. Límite de Cuantificación |
| 5. Exactitud | 8. Límite de Detección |
| | 9. Selectividad |

Por otra parte, se establecieron los siguientes criterios de aceptación de la corrida analítica:

- Las soluciones: (1) blanco de reactivos (BR) y (2) blanco de plasma (BP) no deben presentar señales que interfieran con las señales cromatográficas de los compuestos de interés (Amoxicilina y Enalaprilat).
- La respuesta de 5 inyecciones sucesivas de la solución de adecuación deben presentar un coeficiente de variación menor o igual al 2.0 %.
- El porcentaje de la diferencia de la concentración cuantificada para cada uno de los puntos de la curva es menor al $\pm 15.0\%$, con respecto a la concentración nominal y menor al $\pm 20.0\%$ para el punto más bajo de la curva (0.2 g/mL).

- El porcentaje de diferencia de la concentración interpolada con respecto a la concentración teórica en los puntos control no es mayor al $\pm 15.0\%$; y no más de dos puntos podrán diferir de este límite, siempre y cuando sean de diferente nivel.

5.2.3.3 Rango

Los puntos máximos y mínimos del rango fueron obtenidos a partir de las propiedades farmacocinéticas -concentración plasmática máxima y tiempo de vida media de la Amoxicilina (ver monografía).

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998¹ el intervalo de concentraciones que define al rango debe por lo menos cubrir el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática, para lo cual la concentración mínima del rango debe ser cercana a la concentración plasmática esperada en la cuarta vida media de la Amoxicilina (ver Tabla 10). Y la concentración máxima del rango debe seleccionarse con base en el $C_{\text{máx}}$ de la Amoxicilina.

En el caso particular de la Amoxicilina, ésta presenta una alta variabilidad de $C_{\text{máx}}$ para una dosis de 500 mg reportada⁵ (5.9 – 10.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), probablemente por una variabilidad interindividual genética. Por consiguiente para nuestro estudio se seleccionó la concentración correspondiente a 2.5 veces la $C_{\text{máx}}$ de la Amoxicilina.

En resumen el intervalo de concentraciones de Amoxicilina que define al rango de trabajo está determinado por la concentración mínima de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una concentración máxima de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Amoxicilina.

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	Concentración de Amoxicilina en plasma ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Absorción teórica	% Eliminación
	$C_{\text{máx}}=5.900$	100%	0%
$1t_{1/2}$	2.9500	50%	50%

2½	1.4750	25%	75%
3½	0.7375	12.5%	87.5%
4½	0.3688	6.25%	93.75%
5½	0.1843	3.125%	96.875%

Tabla 10. Concentraciones máximas plasmáticas de Amoxicilina a diferentes vidas medias⁵.

5.2.3.4 Recuperación absoluta

Para evaluar la recuperación absoluta (recobro absoluto) se prepararon soluciones de Amoxicilina en plasma a las concentraciones, dentro del rango, de 0.5, 6.0 y 20 µg/mL; y soluciones acuosas a las mismas concentraciones. Las soluciones acuosas fueron inyectadas directamente en la columna, sin pasar por la columna de extracción. El porcentaje de recobro se evaluó al comparar el área promedio de los compuestos de interés en plasma con su área correspondiente en agua, expresando esta relación en forma de porcentaje, éste cálculo se realizó tanto para la Amoxicilina como para su estándar interno (Enalaprilat).

Se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

- El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación absoluta y del área de cada uno de los niveles evaluados de Amoxicilina no debe ser mayor al 15.0%.
- El promedio del porcentaje de recuperación absoluta para Amoxicilina no debe variar en ±15.0 % respecto al porcentaje promedio global.
- El coeficiente de variación del área del Enalaprilat no debe ser mayor al 15.0%.

El porcentaje de recuperación absoluta de la Amoxicilina (48.99%) y el Enalaprilat (47.69%) es de aproximadamente 48%. Para la Amoxicilina, no varía en $\pm 15.0\%$ respecto al porcentaje de recuperación global, para cada uno de los niveles evaluados. El coeficiente de variación del área de ambos compuesto es menor al $\pm 15.0\%$. En las Tablas 11 y 12 se muestran las áreas de respuesta de la Amoxicilina en solución: acuosa y plasma, para los diferentes niveles de concentración.

MUESTRAS ACUOSAS DE AMOXICILINA				
Nivel	Réplica	Área		
Alto (20µg/mL)	1	3207210	No. Datos	3
	2	3165592	Promedio	3191494
	3	3201681	D.E.	2.260E+04
			C.V.	0.71
Medio (6.0 µg/mL)	1	947194	No. Datos	3
	2	952693	Promedio	951413
	3	954353	D.E.	3.747E+03
			C.V.	0.39
Bajo (0.5 µg/mL)	1	83185	No. Datos	3
	2	82283	Promedio	82718
	3	82685	D.E.	4.519E+02
			C.V.	0.55

Tabla 11. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas de Amoxicilina.

MUESTRAS PLASMÁTICAS DE AMOXICILINA				
Nivel	Réplica	Área		
Alto (20 µg/mL)	1	1409738		
	2	1550577	No. Datos	5
	3	1563623	Promedio	1529138
	4	1577542	D.E.	6.80E+04
	5	1544209	C.V.	4.44
Medio (6.0 µg/mL)	1	479329		
	2	464620	No. Datos	5
	3	465331	Promedio	472664
	4	475139	D.E.	7.21E+03
	5	478901	C.V.	1.53
Bajo (0.5 µg/mL)	1	40821		
	2	40784	No. Datos	5
	3	41061	Promedio	40854
	4	40693	D.E.	1.40E+02
	5	40913	C.V.	0.34

Tabla 12. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras plasmáticas de Amoxicilina.

En la Tabla 13 se presentan la recuperación absoluta de la Amoxicilina para cada nivel y el promedio de recuperación absoluta.

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN ABSOLUTA DE LA AMOXICILINA		DIFERENCIA DEL % DE RECOBRO RESPECTO AL PROMEDIO GLOBAL
ALTO (20 µg/mL)	47.91	-1.08
MEDIO (6.0µg/mL)	49.68	0.69
BAJO (0.5 µg/mL)	49.39	0.40

Tabla 13. Porcentaje de recuperación absoluta de la Amoxicilina. La recuperación absoluta se evaluó al comparar el área promedio de la Amoxicilina en plasma con su área correspondiente en agua expresando esta relación en forma de porcentaje.

En las Tablas 14 y 15 se presentan las áreas de respuesta del Enalaprilat (EI) en solución: acuosa y plasma, para los diferentes niveles de concentración (bajo, medio y alto); reportando el promedio, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.) de cada nivel.

MUESTRAS ACUOSAS DE ENALAPRILAT		
Nivel (µg/mL)	Réplica	Área
Alto (20 µg/mL)	1	2056217
	2	2021500
	3	2056014
Medio (6.0 µg/mL)	1	2041281
	2	2045516
	3	2051736
Bajo	1	2043327
	2	2009854

	3	2022790
No. Datos		9
Promedio		2038693
D.E.		1.670E+04
C.V.		0.82

Tabla 14. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras acuosas del Enalaprilat.

En la Tabla 15 se presenta el porcentaje de recuperación absoluta del Enalaprilat (47.69 %)

MUESTRAS PLASMÁTICAS DE ENALAPRILAT		
Nivel	Réplica	Área
Alto (20 µg/mL)	1	896506
	2	979144
	3	979421
	4	976481
	5	979059
Medio (6.0 µg/mL)	1	981211
	2	966488
	3	985552
	4	985652
	5	987293
Bajo (0.5 µg/mL)	1	970294
	2	974570
	3	979490
	4	969589
	5	973520
	No. Datos	15
	Promedio	972285
	D.E.	2.182E+04
	C.V.	2.24
% de Recuperación Absoluta del Enalaprilat		47.69

Tabla 15. Recuperación absoluta. Áreas de las muestras plasmáticas del Enalaprilat y el porcentaje de recobro.

5.2.3.5 Linealidad del método

Para caracterizar la función respuesta del método se prepararon tres curvas de calibración de manera independiente (por día) en plasma, cada curva constituida por 11 puntos dentro del rango determinado (0.2-25 µg/mL). Aunque la NOM-177-SSA1-1998 recomienda utilizar de 6-8 puntos dentro del rango, en este método se decidió emplear 11 puntos con la finalidad de caracterizar mejor la relación lineal entre la concentración (x) y la respuesta (y) como lo recomienda la guía europea (EURACHEM, 1998)¹⁶.

Para cada una de las curvas generadas se evaluó su calidad de ajuste a un modelo lineal ($y=mx+b$)*. La FDA² establece, a fin de determinar la linealidad del método, la interpolación de las respuestas (áreas) experimentales (y) en la recta generada y obtener las concentraciones calculadas(x) de Amoxicilina para cada punto correspondiente (y por día); y así determinar la diferencia porcentual entre la concentración calculada y la concentración nominal. Esta diferencia no debe ser mayor al ±15.0%, excepto para el límite de cuantificación el cual puede diferir hasta un ±20.0%.

Adicionalmente, en este estudio, primero se demostró la linealidad de la curva de calibración a través del análisis de las varianzas y mediante una gráfica de residuales para demostrar la homogeneidad de éstas. En segundo lugar se determinó la diferencia porcentual antes mencionada.

JUSTIFICACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE LA VARIANZA

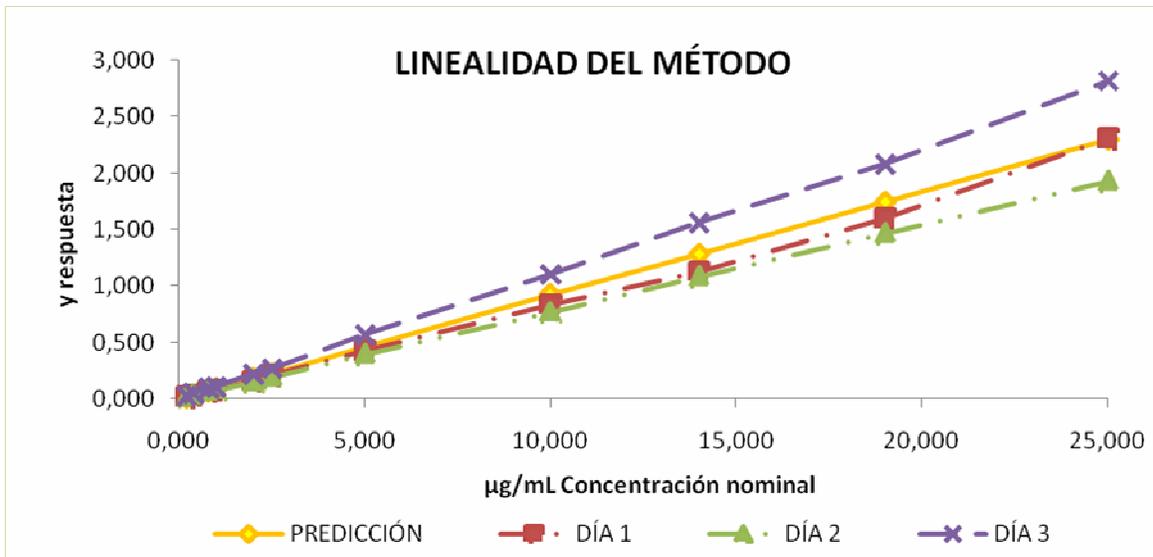
* N. b. La relación matemática lineal representada por la fórmula $y=mx+b$; donde la (1) variable independiente "x" representa a la concentración nominal y la (2) variable dependiente "y" representa a la respuesta, expresada como la relación entre las áreas de la Amoxicilina y del Enalaprilat; (3) "m" representa a la pendiente de la recta y (4) "b" designa a la ordenada al origen.

En la Tabla 16 se muestran los valores de “x”: concentración nominal de Amoxicilina y “y”: *respuesta* (área Amoxicilina/área Enalaprilat) de cada curva de calibración para evaluar la linealidad del método bioanalítico por día.

Concentración Nominal Amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (relación de áreas Amoxicilina/Enalaprilat)		
	Día 1	Día 2	Día 3
0.2	0.0181	0.0181	0.0268
0.4	0.0346	0.0323	0.0494
0.8	0.0684	0.0635	0.0959
1.0	0.0827	0.0807	0.1121
2.0	0.1611	0.1504	0.2224
2.5	0.2077	0.1900	0.2743
5.0	0.4224	0.3906	0.5696
10.0	0.8361	0.7691	1.1050
14.0	1.1291	1.0796	1.5648
19.0	1.5950	1.4632	2.0848
25.0	2.3080	1.9278	2.8232

Tabla 16. Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del método.

Se determinó la ecuación de la recta por el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados con un $\alpha=5\%$. En la Gráfica 1 se muestra la relación lineal entre la concentración (x) y la respuesta (y) para cada curva independiente de cada día.



Gráfica 1. Linealidad del método

En la Tabla 17 se muestran los resultados de la regresión lineal por día.

	Día 1	Día 2	Día 3
n	11	11	11
b	-0.01943	0.00104 ±0.00259	0.00056
m	0.08857	0.07702	0.11167
r	0.9976	1.0000	0.9999
r²	0.9952	1.0000	0.9997

Tabla 17. Resultados del análisis por mínimos cuadrados obtenidos de las curvas de calibración por cada día. (n =número de puntos a concentraciones diferentes de Amoxicilina, b = ordenada al origen, m =pendiente, r =coeficiente de correlación, r^2 =coeficiente de determinación y C.V.= coeficiente de variación).

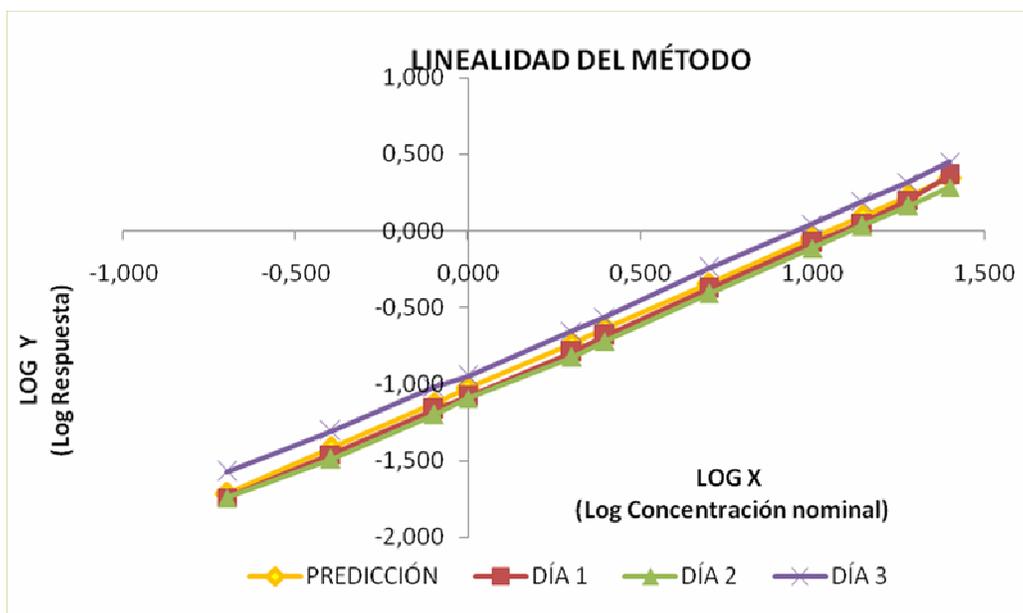
Dado que para cada valor de "x" existe una subpoblación de valores de "y"; y para que los procedimientos de inferencia estadística de estimación y prueba de hipótesis sean válidos estas subpoblaciones deben seguir una distribución normal. Además es importante analizar que todas las varianzas de las subpoblaciones de

Log ₁₀ (Concentración) Log ₁₀ X	Log ₁₀ (Respuesta) Log ₁₀ Y		
	Día 1	Día 2	Día 3
-0.6990	-1.7421	-1.7423	-1.5725
-0.3979	-1.4608	-1.4909	-1.3062
-0.0969	-1.1650	-1.1971	-1.0182
0.0000	-1.0827	-1.0932	-0.9505
0.3010	-0.7930	-0.8228	-0.6529
0.3979	-0.6826	-0.7212	-0.5617
0.6990	-0.3743	-0.4083	-0.2444
1.0000	-0.0777	-0.1140	0.0434
1.1461	0.0527	0.0332	0.1945
1.2788	0.2028	0.1653	0.3191
1.3979	0.3632	0.2851	0.4507

Tabla 18. Curva de calibración para evaluar la linealidad del método bioanalítico, a partir de los valores transformados, aplicando el log₁₀ a cada variable involucrada (independiente y dependiente).

En la Gráfica 3 se muestra la relación lineal entre el log₁₀ de la concentración (x) versus el log₁₀ de la respuesta (y) para cada curva independiente por día.

Se determinó la ecuación de la recta por el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados con un α=5%.



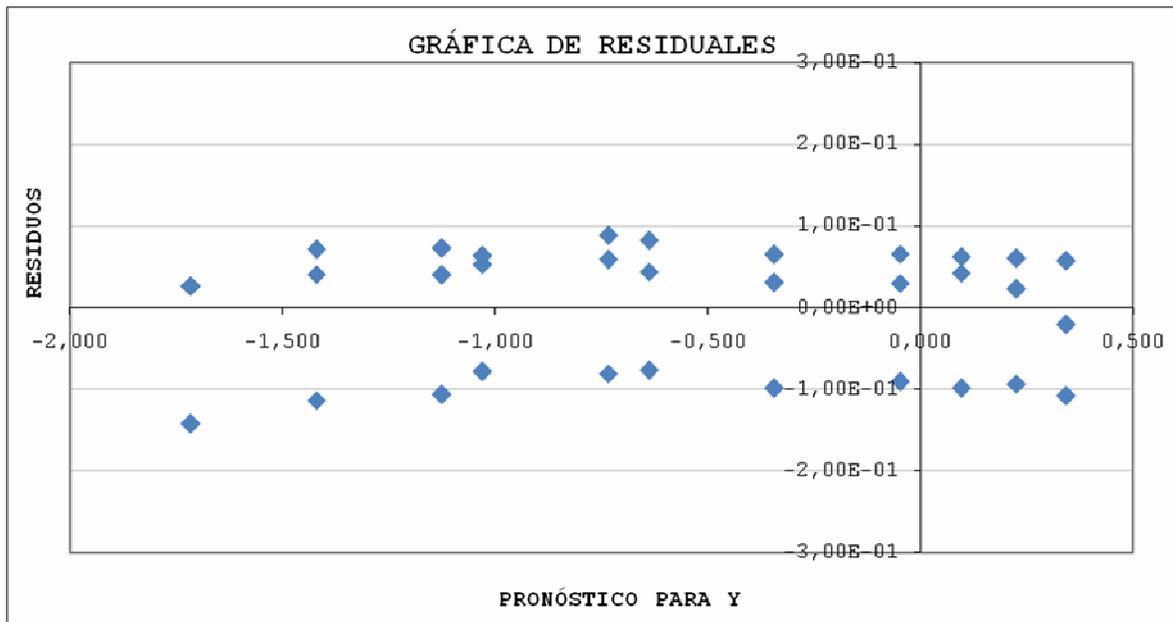
Gráfica3. Curvas de calibración transformadas (\log_{10}) por día.

En la Tabla 19 se presentan los resultados de la regresión lineal por día obtenidos a partir de los valores "x" y "y" transformados en (\log_{10}) .

	Día 1	Día 2	Día 3
n	11	11	11
b	-1.06958	-1.09286	-0.92527
m	0.99582 \pm 0.0197	0.97778 \pm 0.016651	0.97059 \pm 0.01844
r	0.9997	0.9997	0.9997
r²	0.9993	0.9995	0.9994

Tabla 19. Resultados del análisis por mínimos cuadrados obtenidos de las curvas de calibración para cada día, utilizando el factor de ajuste (\log_{10}).

En la Gráfica 4 se presenta el análisis de residuales generado a partir de los datos transformados (\log_{10}), en la cual se muestra una corrección o ponderación del error con respecto a la concentración, esto es un error constante. Por consiguiente justifica un mejor ajuste al modelo lineal.



Gráfica 4. Análisis de residuales.

En la Tabla 20 se muestra el análisis de varianza y el análisis de regresión de la curva global calculada con las tres réplicas de la curva de calibración para evaluar la linealidad del método.

REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS DDE LA CURVA GLOBAL

Pendiente(B) =	0.98139	suma x =	15.08082
Ordenada (A) =	-1.02924	suma Y =	-19.16453
		n =	33
		suma x ² =	21.8907
Coef.Corr. (r) =	0.99390	suma y ² =	25.7534
Coef.Def. (r ²) =	0.98784	suma xy =	5.9617
		promedio x =	0.45699
		promedio y =	-0.5807

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F de tabla	
Regresión	1	1.44459E+01	1.44459E+01	2518.431	4.17	
Error de regresión	31	1.77818E-01	5.73608E-03			
Falta de ajuste	9	7.20296E-03	8.00329E-04	0.103	2.34	
Error puro	22	1.70615E-01	7.75525E-03			

Tabla 20. Análisis de varianza para un $\alpha=5\%$ y análisis de regresión de la curva global.

En resumen el factor de transformación (Log_{10}) ajusta a los datos al modelo lineal, y éstos serán empleados para el cálculo de las concentraciones interpoladas y determinar la diferencia porcentual.

En la Tabla 20 se muestra el Análisis de varianza para un $\alpha= 5\%$, generada a partir de los datos transformados (log_{10})de las tres curvas obtenidas, en la cual se evalúa

si la relación entre las variables es adecuada y se puede utilizar convenientemente con fines de predicción y estimación. Para la regresión se observa que la F calculada es mayor que la F de tablas, por lo tanto se rechaza $H_0: \beta=0$ y se acepta $H_1: \beta \neq 0$, donde β es la pendiente de la recta. Si β es diferente de cero, la relación es lineal. Para la falta de ajuste se observa que la F calculada es menor que la F de tablas, por lo tanto no se rechaza H_0 ; lin: "el modelo lineal es adecuado", los datos se ajustan bien a un modelo lineal. Por consiguiente se justifica un mejor ajuste al modelo lineal y es posible predecir y estimar "Y" con base en los valores dados de "X".

2. DETERMINACIÓN DE LA DIFERENCIA RELATIVA

En la Tabla 21 se presentan las diferencias porcentuales entre la concentración calculada[§] (interpolada) y la concentración nominal correspondiente a cada punto de la curva de calibración de cada día.

Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1		Día 2		Día 3	
	Concentración Calculada	Diferencia Relativa	Concentración Calculada	Diferencia Relativa	Concentración Calculada	Diferencia Relativa
0.20	0.21120	5.60	0.2167	8.34	0.2153	7.67
0.40	0.40467	1.17	0.3917	-2.09	0.4051	1.28
0.80	0.80201	0.25	0.7824	-2.20	0.8022	0.27
1.00	0.97015	-2.99	0.9992	-0.08	0.9418	-5.82
2.00	1.89567	-5.22	1.8887	-5.56	1.9081	-4.60
2.50	2.44699	-2.12	2.3993	-4.03	2.3688	-5.25
5.00	4.99120	-0.18	5.0133	0.27	5.0288	0.58
10.00	9.90867	-0.91	10.0255	0.25	9.9539	-0.46
14.00	13.39690	-4.31	14.1807	1.29	14.2451	1.75
19.00	18.95342	-0.25	19.3535	1.86	19.1444	0.76
25.00	27.46778	9.87	25.6588	2.64	26.1644	4.66

[§] N.b. Las concentraciones calculadas son generadas a partir de la curva de calibración "ponderada" por el factor transformante (\log_{10}). $\text{Log } y = \text{log } x \cdot m + b$.

Tabla 21. Diferencia relativa entre la concentración nominal y la concentración calculada a partir de las curvas generadas durante la evaluación de la linealidad del método ($y=mx+b$).

En resumen, las diferencias porcentuales obtenidas para cada día entre la concentración nominal y la calculada cumplen con el criterio de aceptación** para la linealidad del método analítico, además la linealidad fue probada por el análisis de residuales y de varianza.

5.2.3.6 Exactitud y Precisión

Para determinar la exactitud y la precisión del método bioanalítico se prepararon muestras de Amoxicilina en plasma, a concentraciones de 0.5, 6.0 y 20.0 µg/mL por quintuplicado. Se analizaron las muestras durante 3 días, determinando la concentración calculada interpolando el valor de "y" (respuesta^{††}) en la curva de calibración para cada día.

En las siguientes Tablas:22, 23 y 24 se muestran las concentraciones calculadas para cada respuesta obtenida en cada nivel de concentración empleada y por cada día; asimismo se expresan las diferencias porcentuales obtenidas de los valores de la concentración calculada y la concentración nominal, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Diferencia} = \frac{\text{conc. calculada} - \text{conc. nominal}}{\text{conc. nominal}} 100$$

** **Criterio de aceptación de la linealidad del método.** La norma¹ establece que las concentraciones calculadas no deben diferir en $\pm 15\%$ respecto a la concentración nominal, excepto el límite de cuantificación que puede diferir hasta un $\pm 20\%$ en todos los puntos que conforman la curva de calibración.

^{††} Respuesta=área de la amoxicilina/área de Enalaprilat (estándar interno).

Día 1								
Nivel (µg/mL)	Réplica	Área Amoxicilina	Área Enalaprilat	Respuesta	Concentración calculada ^{‡‡}	% Diferencia		
Alto (20)	1	1409738	896506	1.5725	18.6844	-6.58	n Datos	5
	2	1550577	979144	1.5836	18.8172	-5.91	Promedi	18.8824
	3	1563623	979421	1.5965	18.9708	-5.15	DE	2.067E-
	4	1577542	976481	1.6155	19.1982	-4.01	CV	1.09
	5	1544209	979059	1.5772	18.7412	-6.29	Diferencia respecto promedio	5.59
Medio (6.0)	1	479329	981211	0.4885	5.7761	-3.73	N Datos	5
	2	464620	966488	0.4807	5.6838	-5.27	Promedi	5.6953
	3	465331	985552	0.4722	5.5819	-6.97	DE	7.268E-
	4	475139	985652	0.4821	5.6995	-5.01	CV	1.28
	5	478901	987293	0.4851	5.7352	-4.41	Diferencia respecto promedio	5.08
Bajo (0.5)	1	40821	970294	0.0421	0.4924	-1.53	n Datos	5
	2	40784	974570	0.0418	0.4897	-2.05	Promedi	0.4911
	3	41061	979490	0.0419	0.4906	-1.88	DE	1.026E-
	4	40693	969589	0.0420	0.4912	-1.77	CV	0.21
	5	40913	973520	0.0420	0.4918	-1.64	Diferencia respecto promedio	1.77

Tabla 22. Evaluación de la Precisión y Exactitud Día 1.

^{‡‡} La concentración calculada es determinada de la ecuación lineal ($\log y = \log x m + b$) obtenida de la curva de calibración ponderada para cada día, despejando a la variable independiente x de la ecuación tenemos:

$$x = 10^{\frac{\log y - b}{m}}$$

Día 2								
Nivel (µg/mL)	Réplica	Área Amoxicilina	Área Enalaprilat	Respuesta	Concentración calculada	% Diferencia		
Alto (20)	1	1542591	1017254	1.5164	20.0736	0.37	N. Datos	5
	2	1520062	1009806	1.5053	19.9230	-0.38	Promedi	19.8596
	3	1487561	981104	1.5162	20.0707	0.35	DE	3.869E-01
	4	1517542	1046481	1.4501	19.1766	-4.12	CV	1.95
	5	1560380	1029957	1.5150	20.0542	0.27	Diferencia respecto al promedio	0.70
Medio (6.0)	1	455604	1001870	0.4548	5.8573	-2.38	N. Datos	5
	2	446936	984572	0.4539	5.8465	-2.56	Promedi	5.8377
	3	425967	971913	0.4383	5.6403	-5.99	DE	1.197E-01
	4	433901	937293	0.4629	5.9650	-0.58	CV	2.05
	5	434397	951730	0.4564	5.8793	-2.01	Diferencia respecto al promedio	2.71
Bajo (0.5)	1	40216	1001937	0.0401	0.4892	-2.15	N. Datos	5
	2	40223	1009105	0.0399	0.4858	-2.85	Promedi	0.4878
	3	38926	966120	0.0403	0.4911	-1.77	DE	2.337E-03
	4	1542591	1017254	1.5164	20.0736	0.37	CV	0.48
	5	1520062	1009806	1.5053	19.9230	-0.38	Diferencia respecto al promedio	2.45

Tabla 23. Evaluación de la Precisión y Exactitud del Día 2.

Día 3								
Nivel (µg/mL)	Réplica	Área Amoxicilina	Área Enalaprilat	Respuesta	Concentración calculada	% Diferencia		
Alto (20)	1	1807086	823315	2.1949	20.1867	0.93	N. Datos	5
	2	1783050	819106	2.1768	20.0155	0.08	Promedi	19.7969
	3	1746593	816347	2.1395	19.6622	-1.69	DE	3.008E-01
	4	1716296	811326	2.1154	19.4341	-2.83	CV	1.52
	5	1721900	803868	2.1420	19.6859	-1.57	Diferencia respecto al promedio	1.02
Medio (6.0)	1	513083	829893	0.6183	5.4720	-8.80	N. Datos	5
	2	503384	804495	0.6257	5.5400	-7.67	Promedi	5.4599
	3	496335	798929	0.6213	5.4993	-8.34	DE	6.704E-02
	4	469043	772709	0.6070	5.3695	-10.51	CV	1.23
	5	472921	772205	0.6124	5.4189	-9.69	Diferencia respecto al promedio	9.00
Bajo (0.5)	1	46660	806784	0.0578	0.4764	-4.72	N. Datos	5
	2	44015	774108	0.0569	0.4681	-6.37	Promedi	0.4668
	3	46682	812320	0.0575	0.4733	-5.34	DE	1.054E-02
	4	45659	805052	0.0567	0.4669	-6.62	CV	2.26
	5	43467	795624	0.0546	0.4493	-10.15	Diferencia respecto al promedio	6.64

Tabla 24. Evaluación de la Precisión y Exactitud día 3.

En la Tabla 25 se muestran los promedios globales de las concentraciones calculadas de la Amoxicilina para cada nivel de concentración (alto, medio y bajo); además de la diferencia porcentual global y el %C.V. para cada nivel.

n=15	Alto (20.0 µg/mL)	Medio (6.0 µg/mL)	Bajo (0.5 µg/mL)
Promedio global	19.5130	5.6643	0.4819
D.E.	5.427E-01	1.813E-01	1.255E-02
%C.V.	2.78	3.20	2.60
%Diferencia respecto al promedio global	2.44	5.59	3.62

Tabla 25. Evaluación de la precisión y exactitud.

Para la exactitud el criterio de aceptación empleado es determinar que ninguno de los porcentos de diferencias (%DIF) del valor de la concentración calculado con respecto al valor real o nominal de la concentración difiera más del 15.0%, tanto individual (de cada réplica en cada nivel de concentración), por nivel de concentración y global. Observando que nuestro método cumple con este criterio.

Por otra parte, para la precisión de nuestro método, el criterio de aceptación que establece la NOM-177-SSA1-1998¹, es determinar que los coeficientes de variación (C.V.) de las réplicas deben ser menores al 15.0%, tanto por día, por nivel de concentración y global. En conclusión nuestro método cumple con los criterios para la precisión debido a que ningún %C.V. rebasa el 15.0%.

5.2.3.7 Estabilidad

La evaluación de las condiciones de estabilidad de la Amoxicilina sirvieron para determinar la temperatura y el tiempo en la que la Amoxicilina permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento; se evaluó la respuesta de la concentración de la Amoxicilina en la matriz biológica, en muestras preparadas por triplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango.

La Amoxicilina se consideró estable a las diferentes condiciones evaluadas, ya que los resultados obtenidos cumplen con los criterios de exactitud y repetibilidad^{§§}. Se consideraron las siguientes condiciones:

Estabilidad a ciclos de congelación – descongelación

La evaluación de la estabilidad de la Amoxicilina a ciclos de congelación-descongelación, sirvió para determinar el número de ciclos que pueden sufrir las muestras sin poner en riesgo su determinación.

Para su evaluación, se prepararon muestras adicionadas a tres niveles de concentración (0.5, 6.0 y 20.0 µg/mL); estas muestras se sometieron a 3 ciclos de 12 horas de congelación a -70°C seguidos de 3 ciclos de descongelación a temperatura ambiente de 12 horas. Al finalizar los ciclos, cada nivel de concentración se procesó por triplicado y las respuestas obtenidas se interpolaron en una curva recién preparada.

En la Tabla 26 se muestran los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras a ciclos de congelación-descongelación. Las muestras después de

^{§§} *N.b.* El porcentaje de la diferencia de la concentración cuantificada en las muestras después de haberse sometido al ciclo determinado al compararse con la concentración cuantificada en muestras que no fueron sometidas a los ciclos estudiados no debe ser mayor al $\pm 15\%$.

haberse sometido a tres ciclos de congelación-descongelación de 8 horas, continúan cumpliendo con los criterios establecidos para la precisión y exactitud. El por ciento de diferencia de la concentración cuantificada de las muestras después de los tres ciclos de congelación-descongelación es menor al $\pm 15.0\%$ de la concentración cuantificada respecto a las muestras que no se sometieron a dicho tratamiento (precisión y exactitud del día 1). Las muestras de Amoxicilina en plasma son estables a las condiciones antes mencionadas.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
<i>(Linealidad, precisión y exactitud del día 1)</i>			
Alto (20)	Medio (6.0)	Bajo (0.5)	
18.8824	5.6953	0.4911	
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) DESPUÉS DE LOS TRES CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN			
	17.6168	6.8630	0.4478
	17.0119	6.3299	0.4681
	17.5900	5.1777	0.4707
n	3	3	3
PROMEDIO	17.4062	6.1235	0.4622
D.E.	0.3418	0.8614	0.0125
C.V.	1.96	14.07	2.71
% DIFERENCIA RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN INICIAL	7.82	-7.52	5.89

Tabla 26. Estabilidad a ciclos de congelación – descongelación.

Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente

La evaluación de la estabilidad de la Amoxicilina a temperatura ambiente sirvió para determinar el intervalo de tiempo que pueden permanecer, a temperatura ambiente, sin poner en riesgo su determinación. Se colocaron a temperatura ambiente, sobre la mesa de trabajo, durante aproximadamente 19 horas muestras adicionadas a tres niveles de concentración (0.5, 6.0 y 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al

término del período de tiempo se analizaron por triplicado. La cuantificación de las muestras se realizó contra una curva de calibración recién preparada.

En la Tabla 27 se muestran los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente. Las muestras se consideraron estables a temperatura ambiente, porque el porcentaje de diferencia entre la concentración cuantificada inicialmente y la concentración cuantificada en muestras que permanecieron aproximadamente 19 horas a temperatura ambiente es menor al $\pm 15.0\%$ y el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas es menor al $\pm 15.0\%$, para cada concentración evaluada.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
<i>(Linealidad, precisión y exactitud del día 1)</i>			
	Alto (20)	Medio (6.0)	Bajo (0.5)
	18.8824	5.6953	0.4911
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 19 HORAS			
	18.5129	5.3924	0.4685
	18.0522	5.3790	0.4646
	18.2340	5.3734	0.4631
n	3	3	3
PROMEDIO	18.2664	5.3816	0.4654
D.E.	0.2321	0.0097	0.0028
C.V.	1.27	0.18	0.60
% DIFERENCIA RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN	3.26	5.51	5.24

Tabla 27. Estabilidad en la mesa de trabajo.

Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección

Para evaluar la estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección, se prepararon muestras de Amoxicilina adicionadas en plasma a tres niveles de concentración (0.5, 6.0 y 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se procesaron por triplicado y se

almacenaron en el inyector a 4°C. Se cuantificaron las muestras a las 0, 24 y 48 horas, contra una curva de calibración recién preparada. Las muestras se consideraron estables durante el intervalo de tiempo evaluado en horas si: (1) el promedio de las concentraciones cuantificadas no difería del $\pm 15.0\%$ del promedio de las concentraciones cuantificadas al tiempo cero; y (2) cumple con los criterios de precisión y exactitud para cada una de las determinaciones.

Nuestros resultados muestran que las muestras una vez procesadas son estables al menos durante 48 horas a -4°C, porque el promedio de la concentración cuantificada a las 48 horas para cada uno de los niveles no difiere del $\pm 15\%$ del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero; y cumple con los criterios establecidos para la precisión y exactitud. En la Tabla 28 se presentan los resultados de la estabilidad en el disolvente de inyección.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
<i>(Linealidad, precisión y exactitud del día 3, tiempo cero)</i>			
Alto (20)	Medio (6.0)	Bajo (0.5)	
19.7969	5.4599	0.4668	
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL DISOLVENTE DE INYECCIÓN (48 HORAS)			
	19.1724	5.1343	0.5082
	18.6915	5.3376	0.4957
	18.6547	5.3666	0.4943
n	3	3	3
PROMEDIO	18.8396	5.2795	0.4994
D.E.	0.2889	0.1266	0.0077
C.V.	1.53	2.40	1.54
% DIFERENCIA RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN	4.84	3.30	-6.98

Tabla 28. Estabilidad en el disolvente de inyección.

Estabilidad de las muestras a condiciones de almacenamiento a largo plazo

Se evaluó la estabilidad de la Amoxicilina en plasma, a una temperatura de almacenamiento de menos 70°C durante un período de 66 días. Este periodo de tiempo se estableció con el cálculo de los días requeridos para el análisis de muestras de un estudio de bioequivalencia, considerando desde el primer día de colección hasta el último día de análisis de las muestras. Los resultados de la estabilidad a largo plazo durante 66 días a -70°C se muestran en la Tabla 29.

De los resultados se observa que el porcentaje de la diferencia relativa entre la concentración cuantificada a los 66 días respecto a la concentración cuantificada inicialmente (tiempo cero) no es mayor al $\pm 15.0\%$ para cada nivel de concentración evaluado; y el coeficiente de variación de las concentraciones cuantificadas por concentración no es mayor al $\pm 15.0\%$ para cada nivel.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
<i>(Linealidad, precisión y exactitud del día 1, tiempo cero)</i>			
	Alto (20)	Medio (6.0)	Bajo (0.5)
	18.8824	5.6953	0.4911
CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE AMOXICILINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ESTABILIDAD A LARGO PLAZO (66 HORAS)			
	19.0045	6.0588	0.5106
	19.1054	6.0472	0.5169
	18.7324	5.9931	0.5042
n	3	3	3
PROMEDIO	19.0045	6.0588	0.5106
D.E.	0.1929	0.0351	0.0064
C.V.	1.02	0.58	1.25
% DIFERENCIA RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN	-0.65	-6.38	-3.97

Tabla 29. Condiciones de almacenamiento durante 66 días a -70°C

5.2.3.8 Límite de cuantificación

Para evaluar el Límite de cuantificación (LC), se procesaron muestras adicionadas a la concentración más baja del rango por sextuplicado y se calculó la concentración de Amoxicilina de las réplicas analizadas por el método propuesto.

Se estableció como el límite de cuantificación a la concentración más baja del rango de trabajo, es decir 0.2 µg/mL de Amoxicilina, y se determinó la relación señal: ruido respecto a un blanco de plasma.

En la Tabla 30 se presentan las concentraciones cuantificadas en las 6 réplicas analizadas. Éstas cumplen con los criterios de precisión y exactitud, el porcentaje de diferencia relativa entre la concentración cuantificada de las 6 réplicas cuantificadas con respecto a la concentración nominal adicionada es menor al $\pm 20.0\%$ y el coeficiente de variación es menor al $\pm 20.0\%$. Por otro lado, en la Figura 5 se muestra un cromatograma representativo del límite de cuantificación de la Amoxicilina en plasma, se observa que la relación señal: ruido es de al menos 5: 1. Por tanto se estableció que la concentración como límite de cuantificación es de 20 µg/mL para este método.

LD D	Concentración nominal (µg/ mL)	Área Amoxicilina	Área Enalaprilat	Respuesta	Conc. cuantificada	% Diferencia
1	0.2	15725	811005	0.0194	0.2325	16.23
2	0.2	16216	958571	0.0169	0.2022	1.09
3	0.2	16397	956719	0.0171	0.2049	2.45
4	0.2	16300	946569	0.0172	0.2059	2.95
5	0.2	15851	935450	0.0169	0.2025	1.26
6	0.2	17696	977097	0.0181	0.2168	8.40
					Promedio	0.2108
					D.E.	1.189E-02
					%C.V.	5.64

%Diferencia respecto al	11.52
-------------------------	-------

Tabla 30. Límite de cuantificación

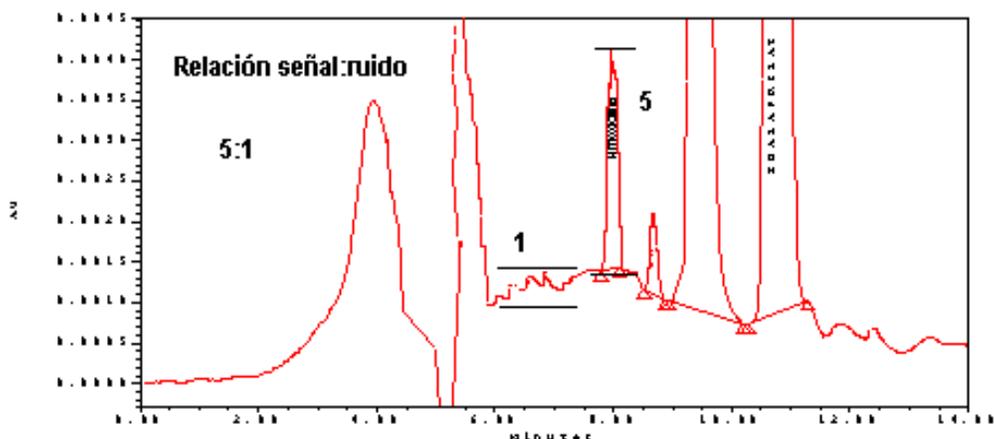


Figura 5. Cromatograma del Límite de cuantificación de la Amoxicilina 20 µg/mL.

5.2.3.9 Límite de detección

En la Figura 6 se muestra un cromatograma representativo del límite de detección de la Amoxicilina en plasma. Se establece la concentración de 0.05 µg/mL como límite de detección del método, ya que a esta concentración se observa una respuesta que es 2 veces el ruido cromatográfico.

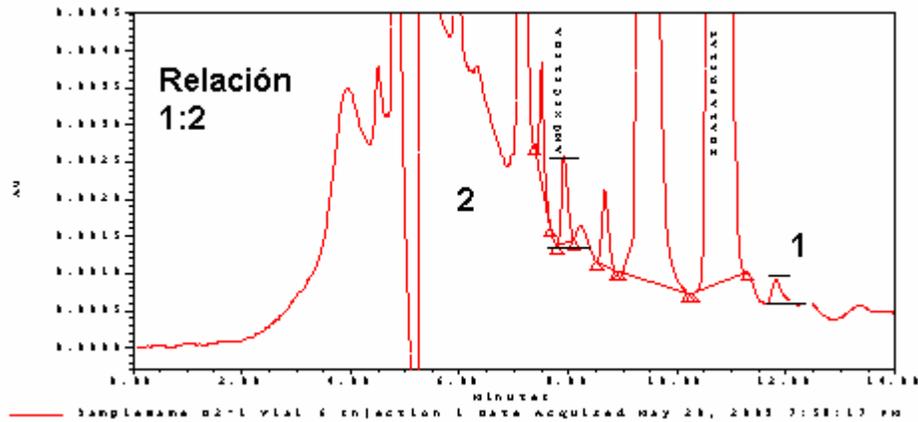


Figura 6. Cromatograma de la concentración mínima detectable de Amoxicilina, 0.05 µg/mL.

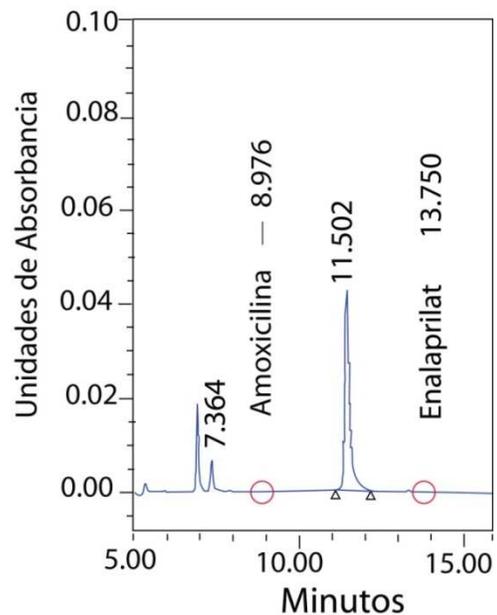
5.2.3.10 Selectividad

En nuestro caso, el criterio de aceptación para esta prueba fue demostrar que ninguno de los blancos presente señal a los tiempos de retención de la Amoxicilina y del Enalaprilat (estándar interno), para lo cual se analizaron muestras de plasma provenientes de 6 sujetos sanos.

Los distintos lotes de plasma empleados no mostraron interferencias a estos tiempos de retención. Además, se analizaron fármacos de uso común, como son la cafeína y el anticoagulante con el que se colectará la muestra: la heparina los cuales pudieran presentar señales a los tiempos de retención de los compuestos de interés.

En la figura 7 se muestran los cromatogramas (A-F) correspondientes a los blancos de plasma provenientes de seis diferentes fuentes. Además, se muestran los cromatogramas (G y H) obtenidos de las inyecciones de heparina y cafeína. Finalmente se presenta un cromatograma típico (I) de la presencia de la Amoxicilina (1 µg/mL) y el Enalaprilat en plasma.

A) PRIMER SUJETO



B) SEGUNDO SUJETO

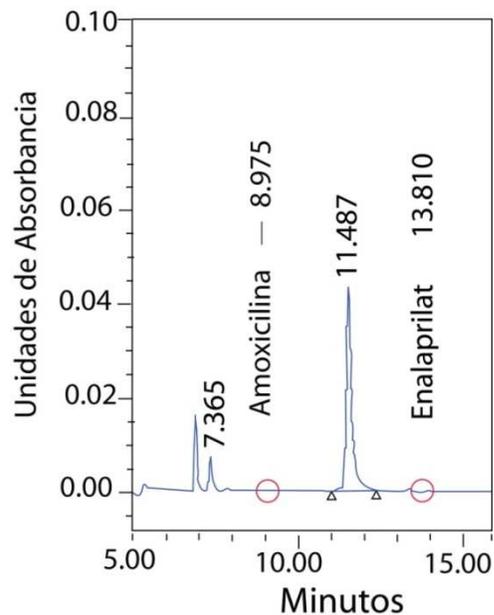
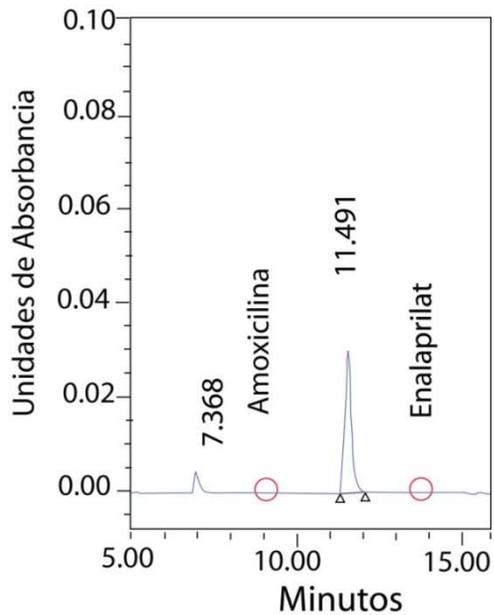
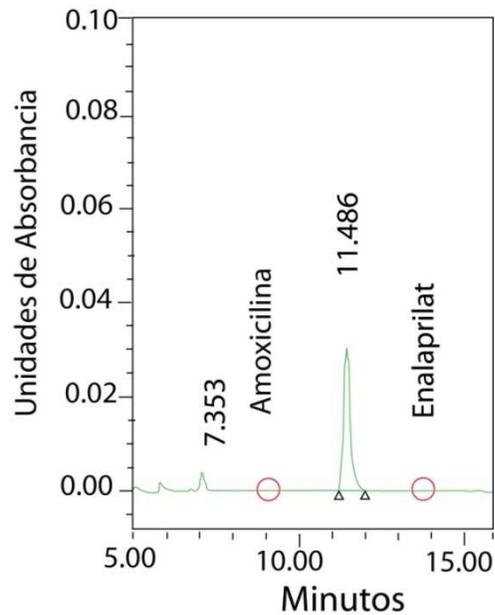


Figura 7. A-F) Cromatogramas representativos de Blancos de Plasma provenientes de diferentes sujetos, G) Heparina y H) Cafeína; I) Plasma adicionado con Amoxicilina y Enalaprilat.

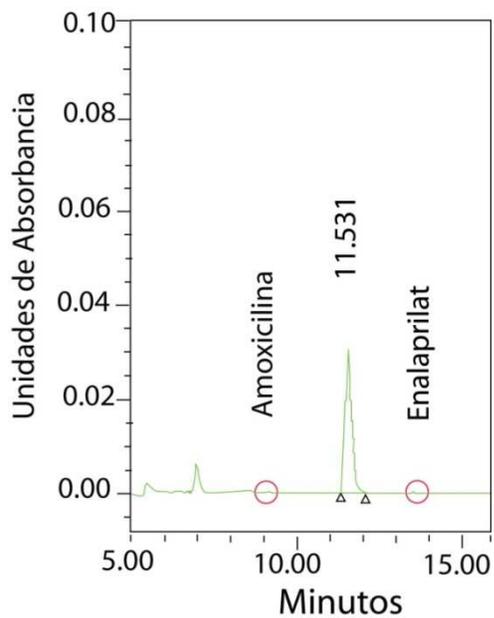
C) TERCER SUJETO



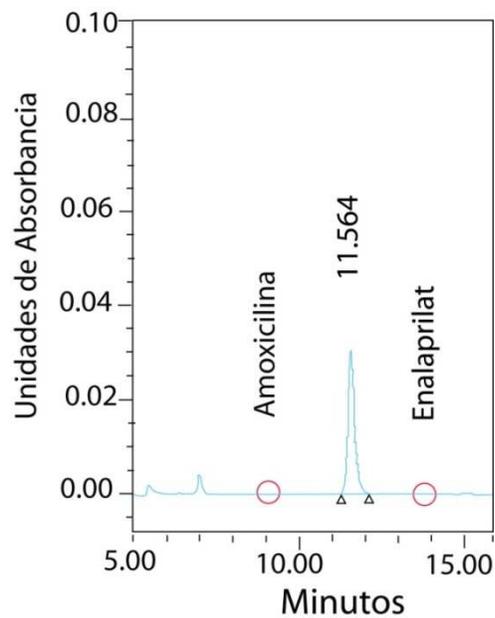
D) CUARTO SUJETO



E) QUINTO SUJETO



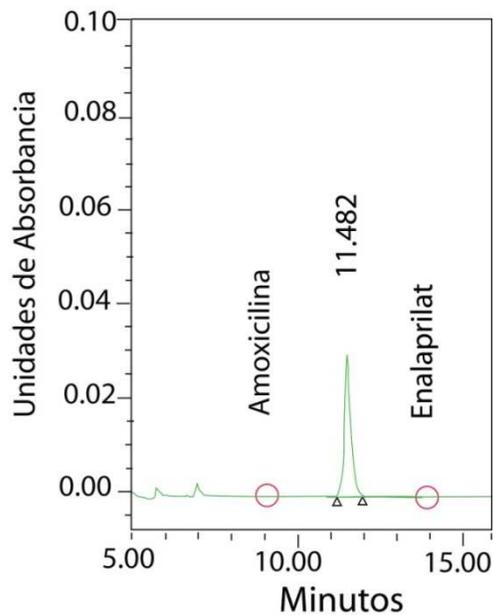
F) SEXTO SUJETO



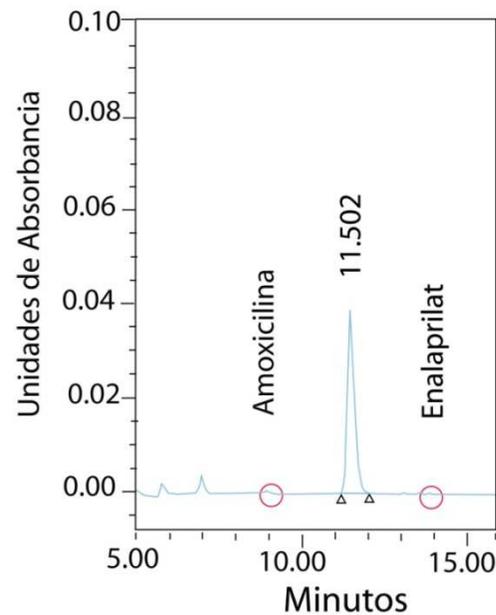
Continuación de la Figura 7. A-F) Cromatogramas representativos de Blancos de Plasma provenientes de diferentes sujetos

Con respecto a los cromatogramas (Fig. 7, A-F) de los blancos de plasma de las 6 diferentes fuentes se observa que no presentan interferencias a los tiempos de retención de la Amoxicilina y del Enalaprilat. Con respecto a la presencia de los anticoagulantes y fármacos de uso común: Heparina y Cafeína (Fig. 7, G y H), se observa que no presentan interferencia alguna a los tiempos de retención de los compuestos de interés. Y en el cromatograma (Fig. 7, I) se observan sólo las señales de las sustancias estudiadas (Amoxicilina y Enalaprilat) adicionadas al plasma proveniente de sujetos sanos, no se observa interferencia del plasma adicionado.

G) HEPARINA

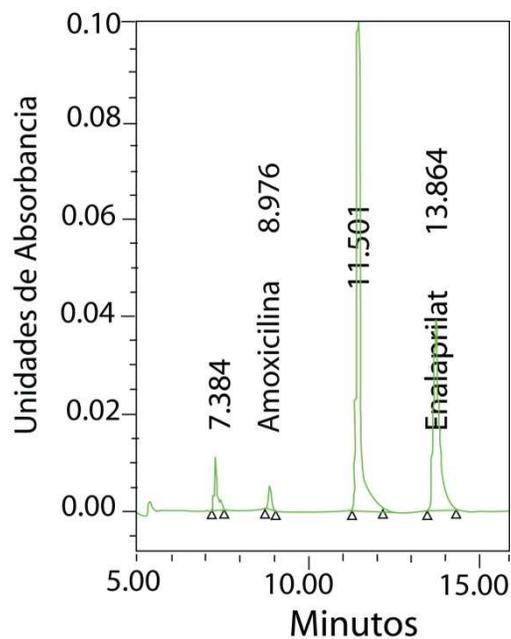


H) CAFEINA



Continuación de la Figura 7. G) Plasma adicionado con Heparina y H) Plasma adicionado con Cafeína

I) CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE AMOXICILINA-ENALAPRILAT



Continuación de la Figura 7. I) Plasma adicionado con Amoxicilina y Enalaprilat.

Con respecto a los metabolitos y compuestos relacionados, se conoce que el ácido penicilínico³ es el principal metabolito de la Amoxicilina. Para evaluar la selectividad del método a metabolitos y compuestos relacionados, se analizaron con el método propuesto, las siguientes muestras de plasma: (1) plasma adicionado con ácido penicilínico y (2) plasma proveniente de muestras clínicas.

Con respecto a la adición del ácido penicilínico se observa en la figura 8 que la adición de este metabolito al plasma no presenta señales al tiempo de retención de la Amoxicilina. Por otra parte, al estudiar la presencia de las muestras clínicas, se observó que éstas presentaron una señal cromatográfica bien definida debida a la Amoxicilina, sin la presencia de señales que interfieran con su tiempo de

retención (Amoxicilina). Además, las muestras clínicas (antes de la administración) no presentan señales que interfieran con el tiempo de retención de la Amoxicilina.

En conclusión, podemos observar que el método es selectivo para la cuantificación de la Amoxicilina.

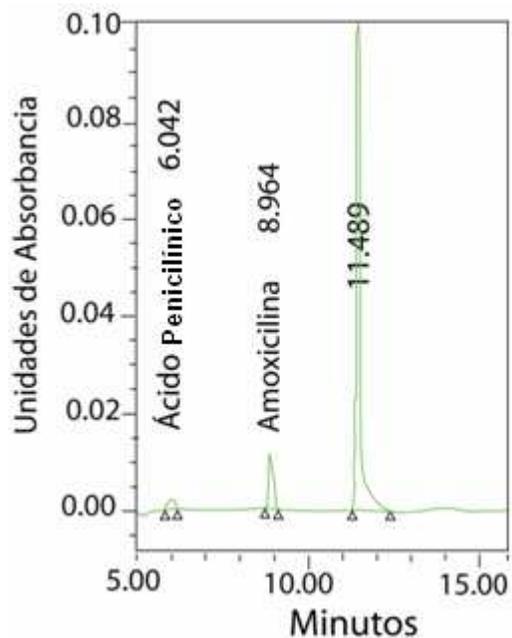


Figura 8. Cromatograma representativo del tiempo de retención del principal metabolito (ácido penicilínico) de la Amoxicilina en plasma. Se observa que la señal del ácido penicilínico no interfiere con la señal del tiempo de retención de la Amoxicilina.

6 CONCLUSIONES

El método desarrollado y validado para la cuantificación de la Amoxicilina en plasma es selectivo porque es capaz de diferenciar y cuantificar al compuesto de interés en presencia de diferentes componentes presentes en distintos lotes de plasma, de otras sustancias como fármacos de uso común y de los metabolitos presentes en las muestras clínicas. Además es también selectivo para el Enalaprilat, sustancia utilizada como estándar interno.

El rango de trabajo establecido, entre 0.2 a 25 $\mu\text{g/mL}$ de Amoxicilina, ha demostrado que, para dichas concentraciones de Amoxicilina contenida en plasma, cumple con los criterios de aceptación definidos para la validación del método; y cuya relación concentración- respuesta se encuentra bien definida como una función lineal del tipo $\log y = m \log x + b$. Además el porcentaje de recuperación de la Amoxicilina y el Enalaprilat es reproducible a lo largo de este intervalo para las condiciones del procesamiento planteadas para el método.

El método permite cuantificar de manera precisa y exacta muestras de concentración conocida dentro del rango de trabajo establecido y cumple los criterios de aceptación establecidos para la validación del método. Permite cuantificar al menos el 80% del área bajo la curva de un perfil farmacocinético.

Por otra parte, las muestras son estables a las condiciones del procesamiento en el disolvente de inyección por lo menos durante 48 horas, cuando se almacenan a 4°C en el inyector. Las muestras de Amoxicilina en plasma son estables a tres ciclos de congelación – descongelación de 12 horas, lo que asegura la confiabilidad de los resultados en caso de descongelar las muestras en más de una ocasión.

Las muestras de Amoxicilina en plasma después de descongelar son estables por lo menos 19 horas a temperatura ambiente y las condiciones ambientales normales de laboratorio de trabajo; así mismo son estables por lo menos durante 66 días almacenadas a -70°C.

Los criterios de validación del método se establecieron con base en los criterios requeridos por la NOM-177-SSA1-1998¹. 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.

7.1 ANEXO 1

7.1.1 Cromatografía Bidimensional (Column Switching)

La preparación de muestras biológicas para ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución, típicamente se lleva a cabo mediante extracción en fase sólida o extracción líquido-líquido. Frecuentemente estas técnicas son laboriosas y susceptibles a muchos errores experimentales.

Ante esta situación, actualmente una herramienta de mucha utilidad es el empleo de la cromatografía bidimensional. En esta técnica, prácticamente, la muestra puede ser inyectada directamente o con un mínimo de tratamiento previo.

La cromatografía bidimensional hace uso de dos o más columnas acopladas para conseguir separaciones no alcanzables con un único sistema. Se define esta técnica como un proceso de separación en el que una muestra es sometida a una secuencia de separaciones, cada una de las cuales actúa sobre todos o parte de los componentes separados en una etapa previa cromatográfica, que difieren en su selectividad relativa y/o capacidad. En las técnicas cromatográficas acopladas se efectúa una pre separación de la muestra en una primera columna cromatográfica; posteriormente, una parte muy pequeña de la muestra conteniendo los analitos se transfiere "on-line" por medio de una interfase hacia la segunda columna cromatográfica en la que tiene lugar la separación de los mismos.

Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las técnicas más sensibles y selectivas disponibles. Las más utilizadas en la actualidad son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL) también denominada CL con "column switching".

Los procedimientos cromatográficos con columnas acopladas consisten generalmente en cuatro etapas:

- Introducción de un volumen de muestra relativamente grande en la primera columna del sistema, mejorando, de este modo, la sensibilidad global del procedimiento analítico. En combinación con una apropiada compresión de pico durante la etapa de transferencia (tercera etapa) los volúmenes de inyección pueden aumentarse desde microlitros hasta mililitros, pudiendo mejorar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud.
- Pre separación de una gran parte de los interferentes de la muestra de los analitos de interés en la primera columna, mejorando la selectividad del procedimiento al descartar la mayor parte de los interferentes. Para mejorar la selectividad es importante que el mecanismo de separación de ambas columnas difiera considerablemente. Esto se puede conseguir fácilmente acoplando CL con CG, pero es menos obvio en acoplamiento CL-CL.
- Transferencia de la fracción de interés a la segunda parte del sistema de separación por medio de una técnica de compresión de pico, de modo que aumente tanto la selectividad, minimizando el volumen de transferencia, como la sensibilidad, mejorando la forma del pico cromatográfico.
- Análisis de la muestra transferida a la segunda columna realizándose una separación y detección convencional de los analitos de interés, después de haber eliminado la mayor parte de los interferentes.

Además de la mejora en selectividad y sensibilidad, las técnicas cromatográficas acopladas permiten integrar la preparación de muestra, la separación y la detección en un sistema cromatográfico único, ofreciendo un alto grado de automatización para el procedimiento analítico global.

Como se ha comentado anteriormente, una de las características importantes de la CL es la capacidad de aplicar la técnicas de columnas acopladas ("column-switching"), que ofrece la posibilidad de integrar la preparación de la muestra y la purificación de la misma en el procedimiento cromatográfico. Cualquier procedimiento de acoplamiento CL-CL se encuentra diferenciado en cuatro etapas:

1) Inyección. Durante esta etapa se toma la muestra y se carga en el "loop" del inyector, mientras la fase móvil M-1 circula por la columna C-1, y la fase móvil M-2 por C-2. Se activa la válvula del inyector y comienza el análisis, pasando a la etapa de purificación.

2) Purificación. Durante esta etapa se realiza una purificación de la muestra o extracto con un cierto volumen de fase móvil M-1; los interferentes menos retenidos (I1) se eliminan a los desechos. Cuando el primer analito comienza a eluir de la columna C-1, se activa la válvula que actúa como interfase entre los dos sistemas CL, finalizando la etapa de purificación y comenzando la transferencia.

3) Transferencia. La primera columna se coloca en línea con la segunda, y se utiliza un cierto volumen de fase móvil M-2 para eluir de la columna C-1 hacia la C-2 la fracción que contiene los compuestos de interés (A). Cuando el último analito ya ha sido transferido desde C-1 a C-2, se activa nuevamente la válvula, finalizando la transferencia.

4) Análisis y lavado. Durante esta etapa la fracción transferida desde C-1 a C-2 se separa mediante la fase móvil M-2, siguiendo una CL convencional. Simultáneamente, la primera columna (C-1) vuelve a ser eluida por la fase móvil M-1 que eliminará las interferencias que muestren mayor retención (de cola). Si la fase móvil no es capaz de eluirlos completamente mientras tiene lugar la separación en C-2, se puede lavar la primera columna con un eluyente más fuerte, como metanol, acetonitrilo, etc., reacondicionándola posteriormente con la fase M-1, antes de la próxima inyección.

7.1.2 Estrategia para implementar el acoplamiento CL-CL.

1. Selección de la configuración del switching.

Los dos parámetros más importantes que se han de optimizar en un procedimiento de acoplamiento CL-CL son:

- a) La selección de la primera columna separadora (C-1).
- b) La fuerza eluotrópica de la fase móvil utilizada en la purificación (M-1).

Como ya se ha indicado, la elección de la fase móvil 1 (M-1) es crucial. Se debe llegar a una situación de compromiso, ya que por un lado, una fase móvil M-1 con una fuerza eluotrópica baja permitiría la inyección de volúmenes mayores de muestras acuosas sin un apreciable ensanchamiento de bandas, aunque restringiría la eliminación eficaz de las interferencias poco retenidas (I1). Mientras que, por otro lado, una fase móvil M-1 con una elevada fuerza eluotrópica mejoraría la resolución entre I1 y la fracción de analitos (A), pero disminuiría el tiempo de purificación. La mejora en la selectividad al emplear una fase móvil M-1, con una correcta fuerza eluotrópica para mejorar la etapa de purificación se ha demostrado en varias aplicaciones.

Después de la elección de la columna C-1 y de la composición de la fase móvil M-1, las condiciones finales del acoplamiento CL-CL se pueden determinar fácilmente mediante dos experiencias:

- a) Determinación del volumen de purificación. Este valor se puede determinar conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el compuesto de interés que presente una menor retención con la fase móvil M-1 (A0). El volumen de ruptura que presente este analito en estas condiciones determinará el volumen máximo de purificación a aplicar en el método. Este volumen de purificación debe verificarse rutinariamente para

asegurarse de que se realiza la purificación de modo correcto, sin pérdidas del analito A0.

b) Determinación del volumen de transferencia. Este valor se determina conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el analito que presente una mayor retención (A_n), pero siendo eluido con la fase móvil M-2 que es la que realiza la transferencia. El volumen de ruptura que posea este analito en estas condiciones fijará el volumen máximo de transferencia a utilizar. Este volumen de transferencia, también debe verificarse rutinariamente para que la transferencia se realice de modo correcto, sin pérdidas del analito. Además, como ya se ha comentado anteriormente, interesa que esta fracción transferida desde C-1 hacia C-2 tenga el menor volumen posible, para minimizar el ensanchamiento de bandas y aumentar la sensibilidad.

2. *Elección del medio de Separación.*

De acuerdo con las características de la separación se deben elegir la guardacolumna y columna adecuados.

3. *Preparación de la muestra.*

El fluido biológico en el caso más simple sólo es centrifugado o diluido previo a la inyección.

7.1.3 Ventajas y limitaciones del acoplamiento CL-CL.

Las ventajas más importantes del acoplamiento CL-CL ya se han comentado en puntos anteriores, y se pueden resumir como mejora de selectividad, aumento de sensibilidad y posibilidad de automatización, lo que hace que esta técnica tenga un gran futuro. Su mayor campo de aplicación se encuentra en el análisis de compuestos "difíciles" como son compuestos polares en muestras acuosas en las que resulta difícil o tedioso su aislamiento (preconcentración). Además, mediante la adecuada optimización de las condiciones se pueden llegar a inyectar grandes volúmenes de muestra si el analito presenta una buena retención sobre

C-1 y eluye sin ensanchamiento de bandas. Por consiguiente, otra ventaja adicional que presenta la CL de columnas acopladas es su gran capacidad de análisis, pudiéndose analizar un elevado número de muestras por día (*sample throughput*), ya que en la mayoría de los casos el pretratamiento es mínimo y el análisis por CL muy rápido.

Por otro lado, una importante función adicional que realiza el acoplamiento CL-CL es la protección de la columna separadora principal en aquellos casos donde se tienen matrices complejas. Para el análisis de muestras o extractos más limpios, con los que no se esperan problemas de obturación o de selectividad, se podría pensar en eliminar el acoplamiento CL-CL, sin embargo, en muchos casos el uso del mismo es beneficioso al reducir el tiempo total de análisis, ya que ningún pico interferente que eluya muy tarde (12) se transfiere a la segunda columna separadora.

En cuanto a las limitaciones, cabe citar que, en comparación con los procedimientos "off-line", se debe realizar una inversión en equipamiento y se requiere destreza y práctica habitual en procedimientos de CL para diseñar y aplicar el acoplamiento CL-CL. Probablemente es ésta la razón por la que todavía no se utiliza ampliamente esta técnica.

En segundo lugar, la primera columna debe ser muy estable, ya que la inyección de extractos de muestra sin purificar combinados con continuas aplicaciones de disolventes de baja y elevada fuerza eluotrópica afecta su vida media. Para la mayoría de las aplicaciones, es posible utilizar durante una semana continuamente la misma columna sin apreciar una disminución de la selectividad, antes de someterla a una limpieza rutinaria.

Otro aspecto a tener en cuenta es la necesidad de realizar una comprobación, más o menos diaria, de los volúmenes de purificación y transferencia antes de procesar una nueva serie de muestras ya que, aunque los rellenos se fabriquen con la más alta tecnología, siempre existe una pequeña variación en la retención, observable a lo largo de un cierto período de utilización.

7.1.4 Conclusiones

- Esta técnica se puede aplicar a una gran variedad de moléculas de gran utilidad, sobre todo por el alto grado de automatización del tratamiento de la muestra y porque el tiempo de análisis disminuye considerablemente.
- Existen menores posibilidades de pérdida de la muestra o de eventual riesgo ante la manipulación de la muestra, pues fundamentalmente se lleva a cabo en un sistema cerrado.
- Implica una limpieza en línea que esencialmente es una extracción en fase sólida integrada al sistema CLAR.
- Se aplica cuando el analito se encuentra en una muestra químicamente compleja o en una matriz biológica.
- Permite enviar el analito de interés a la columna analítica libre de solutos que interfieran con el análisis o afecten la integridad de la columna y el detector.
- Permite el análisis automatizado rápido, robusto, sensible, selectivo, exacto y preciso de muestras complejas.

7.1 ANEXO 2

7.1.5 Fórmulas empleadas en los cálculos

RECUPERACIÓN ABSOLUTA			
Análisis	Réplicas	Cálculos	Observaciones
Muestras acuosas Tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (3 niveles)	3 réplicas por nivel	<p>Calcular el promedio de la respuesta (\bar{x})</p> $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ <p>Calcular la desviación estándar</p> $DE = \sqrt{\frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ <p>Coefficiente de Variación</p> $CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$	Para determinar la recuperación neta del compuesto, las muestras adicionadas (en matriz biológica) se deben comparar con la misma muestra sin adicionar (en solución).

Muestras adicionadas en matriz biológica Tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (3 niveles)	5 réplicas por nivel	Calcular el promedio de la respuesta Calcular la desviación estándar Coeficiente de Variación	El recobro también se puede calcular al comparar las muestras adicionadas (en matriz biológica) con blancos de matriz adicionados.
		$\% \text{ Recobro} = \frac{\bar{x} \text{ adicionada(matriz)}}{\bar{x} \text{ sin adicionar(solución)}} * 100$	Los cálculos se realizan para cada una de las concentraciones
		Calcular el promedio del % de recobro: Promedio global= $\frac{C1+ C2+...+Cn}{n}$ Donde C1.Cn: Es el % de recobro para cada concentración evaluada.	
		Calcular el porcentaje de diferencia respecto al promedio: $\%DR = \frac{\% \text{ Recobro}_i - \text{promedio global}}{\text{promedio global}} * 100$	

LINEALIDAD DEL MÉTODO			
Análisis	Réplicas	Cálculos	Observaciones
<p>La curva de calibración se constituye de una muestra blanco (matriz biológica procesada sin la adición de estándar interno), una muestra cero (matriz biológica procesada con la adición de estándar interno) y de 6 a 8 diferentes concentraciones (niveles) que cubran el rango.</p>	<p>1 réplica por 3 días</p>	<p>- Generar la curva de calibración graficando la respuesta (eje de y) contra la concentración nominal (eje de x)</p> <p>-Evaluar visualmente la gráfica de regresión para identificar el mejor modelo matemático de ajuste.</p> <p>-Calcular la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación (r²)</p> <p>Pendiente:</p> $B = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$ <p>Ordenada al origen:</p> $A = \frac{\sum y - B(\sum x)}{nt}$ <p>Coeficiente de determinación:</p> $r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$ <p>-Estimar la calidad de ajuste, por la interpolación de la concentración de cada uno de los puntos de la curva en la ecuación de la recta generada, determinando el porcentaje de diferencia relativa (%DR) de la concentración cuantificada respecto a la concentración nominal.</p> <p>Ej. Si la ecuación es $\log y = \log x m + b$, calcular la concentración en las muestras con la sig. ec:</p> $x = 10^{\frac{\log y - \log b}{m}}$ <p>Donde: "Y" es la respuesta y "X" la concentración calculada</p>	<p>La curva de calibración se debe preparar de soluciones independientes, y no de alícuotas de la misma solución.</p> <p>Si en un intervalo dado las varianzas no son constantes, entonces se debe de realizar una transformación o ponderación de los datos.</p>

		$\%DR = \frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración nominal}} \times 100$ <p>- Calcular los residuales (la diferencia entre el valor real de "Y" el valor de "Y" predicho por la ecuación, para cada valor de x).</p>	
--	--	--	--

EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO			
Análisis	Réplicas	Cálculos	Observaciones
<p>Muestras adicionadas en matriz biológica</p> <p>Tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (Tres niveles)</p>	<p>5 réplicas, por nivel</p> <p>por 3 días</p>	<p>-Calcular la concentración de las muestras interpolando la respuesta en la ecuación de la recta generada:</p> <p>Ej. Si la ecuación es $\log y = \log x m + b$, calcular la concentración en las muestras con la sig. ec:</p> $x = 10^{\frac{\log y - b}{m}}$ <p>Donde: "Y" es la respuesta y "X" la concentración calculada.</p> <p>-Calcular el promedio, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.), de la concentración calculada por nivel y global.</p> <p>-Calcular porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración nominal por nivel y global.</p> $\%DR = \frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración nominal}} \times 100$ <p>-Calcular el porcentaje de diferencia relativa respecto al promedio</p> $\%DR = \frac{\% \text{ Error}_1 \cdot \text{promedio global}}{\text{promedio global}} \times 100$	<p>Las muestras adicionadas se deben preparar de soluciones independientes, y no de alícuotas de la misma solución.</p>

ESTABILIDAD			
Análisis	Réplicas	Cálculos	Observaciones
<p>Muestras adicionadas en matriz biológica</p> <p>Tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (Tres niveles)</p>	<p>5 réplicas, por nivel</p> <p>por 3 días</p>	<p>-Calcular la concentración de las muestras interpolando la respuesta en la ecuación de la recta generada:</p> <p>Ej. Si la ecuación es $\log y = \log x m + b$, calcular la concentración en las muestras con la sig. ec:</p> $x = 10^{\frac{\log y - \log b}{m}}$ <p>Donde: "Y" es la respuesta y "X" la concentración calculada.</p> <p>-Calcular el promedio, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.), de la concentración calculada por nivel y global.</p> <p>-Calcular porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración inicial.</p> $\%DR = \frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración inicial}}{\text{concentración inicial}} \times 100$	<p>La cuantificación de las muestras adicionadas se debe realizar con una curva de calibración recién preparada</p> <p>Comparar la concentración cuantificada de las muestras después del tratamiento respecto a las muestras que no se sometieron a dicho tratamiento</p>

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN			
Análisis	Réplicas	Cálculos	Observaciones
<p>Muestras adicionadas en matriz biológica nivel más bajo del rango</p>	<p>6</p>	<p>-Calcular la concentración de las muestras interpolando la respuesta en la ecuación de la recta generada:</p> <p>Ej. Si la ecuación es $\log y = \log x m + b$, calcular la concentración en las muestras con la sig. ec:</p> $x = 10^{\frac{\log y - \log b}{m}}$ <p>Donde: "Y" es la respuesta y "X" la concentración calculada.</p> <p>-Calcular el promedio, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de</p>	<p>LDC expresa la concentración más baja del analito que se puede determinar con un nivel aceptable de la incertidumbre</p>

		variación (C.V.), de la concentración calculada. -Calcular porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración nominal. $\%DR = \frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración nominal}} \times 100$	
--	--	--	--

7.1.6 Ejemplo de los cálculos

Linealidad del método-Curva de calibración (Día 1)

a) Datos

primarios:

Nivel	Concentración Teórica	Área Amoxicilina (X)	Área Enalaprilat (Y)
1	0.20	17696	977097
2	0.40	35485	1025363
3	0.80	70344	1028555
4	1.00	84267	1019402
5	2.00	154931	961871
6	2.50	207254	997872
7	5.00	423404	1002418
8	10.00	794546	950270
9	14.00	1164712	1031585
10	19.00	1605824	1006772
11	25.00	2077875	900306

b) Cálculo de la respuesta

$$\text{Respuesta} = \frac{\text{área de Amoxicilina}}{\text{área de Enalaprilat}}$$

	Respuesta
17696/977097 =	0.0181
35485 / 1025363 =	0.0346
70344 / 1028555 =	0.0684
84267 / 1019402 =	0.0827
154931 / 961871 =	0.1611
207254 / 997872 =	0.2077
4234404/ 10022418 =	0.4224
794546/ 950270 =	0.8361
1164712 / 1031585 =	1.1291

1605824/ 1006772 =	1.5950
2077875/ 900306 =	2.3080

c) Cálculo del logaritmo de la respuesta

log
Concentración=log(concentración)
log Respuesta=log(respuesta)

x log Concentración	y log Respuesta
-0.6990	-1.7421
-0.3979	-1.4608
-0.0969	-1.1650
0.0000	-1.0827
0.3010	-0.7930
0.3979	-0.6826
0.6990	-0.3743
1.0000	-0.0777
1.1461	0.0527
1.2788	0.2028
1.3979	0.3632

d) Regresión lineal por el método de mínimos cuadrados

Con los datos primarios calcular lo siguiente:

$$\Sigma X = -0.6990 + -0.3979 + 0.0969 + 0.000 + 0.301 + 0.3979 + 0.699 + 1 + 1.1461 + 1.2788 + 1.3979$$

$$= \mathbf{5.02694}$$

$$\Sigma Y = -1.7421 -1.4608 -1.1650 -1.0827 -0.7930 -0.6826 -0.3743 -0.0777 + 0.0527 + 0.2028 + 0.3632 =$$

$$\mathbf{-6.75945}$$

$$\Sigma X^2 = -0.6990^2 + -0.3979^2 + 0.0969^2 + 0.000^2 + 0.3010^2 + 0.3979^2 + 0.6990^2 + 1.0000^2 + 1.1461^2 + 1.2788^2 + 1.3979^2 = \mathbf{7.29690}$$

$$\Sigma Y^2 = -1.7421^2 -1.4608^2 -1.1650^2 -1.0827^2 -0.7930^2 -0.6826^2 -0.3743^2 -0.0777^2 + 0.0527^2 + 0.2028^2 + 0.3632^2 = \mathbf{9.11494}$$

$$\Sigma XY = (-0.6990 * -1.7421) + (-0.3979 * -1.4608) + (-0.0969 * -1.1650) + (0.000 * -1.0827) + (0.301 * -0.7930) + (0.3979 * -0.6826) + (0.6990 * -0.3743) + (1.000 * -0.0777) + (1.1461 * 0.0527) + (1.2788 * 0.2028) + (1.3979 * 0.3632) = \mathbf{1.88967}$$

$$n = 11$$

Para calcular la pendiente de la recta se sustituyen los términos en la siguiente ecuación:

$$B = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Cálculo de la pendiente (B)

$$B = (11 * (1.88967) - (5.02694) * (-6.75945)) / (11 * (7.2969) - (5.02694^2)) \quad 0.99582$$

Para calcular la ordenada al origen de la recta se sustituyen los términos en la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\sum y - B(\sum X)}{nt}$$

Cálculo de la Ordenada (A)

$$A = (-6.7594 - (0.9958 * 5.0269)) / 11 = -1.06958$$

Para calcular el coeficiente de determinación de la recta se sustituyen los términos en la siguiente ecuación:

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Cálculo del Coeficiente de determinación (r²)

$$r^2 = \frac{((11 * 1.8897) - (5.0269 * -6.7594))^2}{((11 * 7.2969 - (5.0269^2)) * ((11 * 9.1149 - (6.7594^2))))} = 0.999312$$

e) Cálculo de la concentración cuantificada y el porciento de diferencia

Con la ecuación de la recta generada a partir de la curva de calibración. Interpolan la respuesta de las muestras y calcular la concentración cuantificada como se indica a continuación:

El cálculo de la concentración cuantificada (Interpolación de la respuesta en la curva de calibración) se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$x = 10^{\frac{\log y - b}{m}}$$

El cálculo del porcentaje de diferencia de la concentración calculada respecto a la concentración nominal se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Diferencia} = \frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración nominal}}{\text{concentración nominal}} \times 100$$

Cálculo de la concentración calculada y el porcentaje de diferencia para los datos de la Exactitud (Día 1)

Día 1								
Nivel (µg/mL)	Área Amoxicilina	Área Enalaprilat	Respuesta	log y	log y -b	log y - b/m	Concentración. Calculada(µg/mL)v 10^(log y -b/m)	% Diferencia
Alto 20	1409738	896506	1.5725	0.1966	1.2662	1.2715	18.6845	6.58
	1550577	979144	1.5836	0.1996	1.2692	1.2746	18.8172	5.91
	1563623	979421	1.5965	0.2032	1.2727	1.2781	18.9708	5.15
	1577542	976481	1.6155	0.2083	1.2779	1.2833	19.1983	4.01
	1544209	979059	1.5772	0.1979	1.2675	1.2728	18.7413	6.29
Medio 6	479329	981211	0.4885	-0.3111	0.7584	0.7616	5.7761	3.73
	464620	966488	0.4807	-0.3181	0.7515	0.7546	5.6838	5.27
	465331	985552	0.4722	-0.3259	0.7437	0.7468	5.5819	6.97
	475139	985652	0.4821	-0.3169	0.7527	0.7558	5.6995	5.01
	478901	987293	0.4851	-0.3142	0.7554	0.7586	5.7352	4.41
Bajo 0.5	40821	970294	0.0421	-1.3760	-0.3064	-0.3077	0.4923	1.53
	40784	974570	0.0418	-1.3783	-0.3087	-0.3100	0.4897	2.05
	41061	979490	0.0419	-1.3776	-0.3080	-0.3093	0.4906	1.88
	40693	969589	0.0420	-1.3771	-0.3075	-0.3088	0.4912	1.77
	40913	973520	0.0420	-1.3765	-0.3069	-0.3082	0.4918	1.64

f) Demostración de la linealidad de la curva de calibración mediante el análisis de varianza.

El análisis de varianza de la curva de calibración se realiza como se indica en la siguiente tabla:

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

VARIACIÓN FUENTE DE	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	SUMA DE CUADRADOS (SC)	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F CALCULADA
REGRESIÓN (R)	1	$b * \sum xy + a * \sum y - (\sum y)^2/n$	SC_R / GL_R	MC_R / MC_{ER}
ERROR DE REGRESIÓN (ER)	n-2	$\sum y^2 - b * \sum xy - a * \sum y$	SC_{ER} / GL_{ER}	
FALTA DE AJUSTE (FA)	$(n-2) - \sum (r_i-1)$	$SC_{ER} - SC_{EP}$	SC_{FA} / GL_{FA}	MC_{FA} / MC_{EP}
ERROR PURO (ER)	$\sum (r_i-1)$	$\sum y^2 - (\sum y_i)^2/r_i$	SC_{EP} / GL_{EP}	

Cálculo del análisis de varianza para la curva global obtenida a partir de los datos de linealidad del método.

Datos primarios de la linealidad del método			
	IDENTIFICACIÓN	X log Conc	Ylog Resp
D Í A 1	C1	-0.6990	-1.7421
	C2	-0.3979	-1.4608
	C3	-0.0969	-1.1650
	C4	0.0000	-1.0827
	C5	0.3010	-0.7930
	C6	0.3979	-0.6826
	C7	0.6990	-0.3743
	C8	1.0000	-0.0777
	C9	1.1461	0.0527
	C10	1.2788	0.2028
	C11	1.3979	0.3632
D Í A 2	C1	-0.6990	-1.7423
	C2	-0.3979	-1.4909
	C3	-0.0969	-1.1971
	C4	0.0000	-1.0932
	C5	0.3010	-0.8228
	C6	0.3979	-0.7212
	C7	0.6990	-0.4083
	C8	1.0000	-0.1140

	C9	1.1461	0.0332
	C10	1.2788	0.1653
	C11	1.3979	0.2851
D Í A 3	C1	-0.6990	-1.5725
	C2	-0.3979	-1.3062
	C3	-0.0969	-1.0182
	C4	0.0000	-0.9505
	C5	0.3010	-0.6529
	C6	0.3979	-0.5617
	C7	0.6990	-0.2444
	C8	1.0000	0.0434
	C9	1.1461	0.1945
	C10	1.2788	0.3191
	C11	1.3979	0.4507

REGRESIÓN LINEAL POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS

Pendiente(B) =	0.98139	suma x =	15.08082
Ordenada (A) =	-1.02924	suma Y =	-19.16453
		n =	33
		suma x ² =	21.8907
		suma y ² =	25.7534
Coef.Det. (r ²) =	0.98784	suma xy =	5.9617
		promedio x	0.45699
		=	
		promedio y	-0.5807
		=	

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS (SC)	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F CALCULADA	F DE TABLAS
REGRESIÓN	1	1.44459E+01	1.44459E+01	2518.431	4.17
ERROR DE REGRESIÓN	31	1.77818E-01	5.73608E-03		

FALTA DE AJUSTE	9	7.20296E-03	8.00329E-04	0.103	2.34
ERROR PURO	22	1.70615E-01	7.75525E-03		

INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA

PRUEBA DE HIPÓTESIS

Para la regresión:

Hipótesis nula $H_0 = \beta = \beta_0$

Hipótesis alternativa $H_a = \beta \neq \beta_0$

Como F Calculada es mayor que la F de tablas se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa. Por tanto la pendiente es diferente de cero y la respuesta varía con la concentración.

Para la falta de ajuste:

Hipótesis nula $H_0 = Y = \alpha + \beta X$

Hipótesis alternativa $H_a = Y \neq \alpha + \beta X$

Como la F calculada es menor a la F de tablas se acepta la hipótesis nula. Por tanto el modelo es lineal ya que representa de manera correcta la relación entre la concentración y la respuesta obtenida

8 Bibliografía

1. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a los que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 7 de mayo de 1999.
2. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* (Center for Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001).
3. Bird AE, Brittain HG, ed. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. vol. Vol 23. 1994:4-52.
4. KATZUNG, Bertram G. *Farmacología básica y clínica*, 6ª ed. México, Manual Moderno, 1996. p. 829-832.
5. Kucer MA & Bennett Mck N. *The use of antibiotics*. Oxford, 1997, Heinemann. p. 134-144.
6. Russlie, Y. Z. (1995). Sensitive assay for measuring amoxicillin in human plasma and middle ear fluid using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* , 674 (1), 93-99.
7. Guillaume, H. D. (2002). Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30, 661-666.
8. Mascher, H. J., & Kikuta, C. (1998). Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatisation. *Journal of Chromatography A*. 812, 221-226.
9. Luan, L., Shao, L., & Shi, L. (1999). Determination of clavulanate potassium and amoxicillin in human plasma by reversed-phase HPLC. *Journal Chinese* , 19 (5), 321-325.
10. Wibawa, F. D., & Barrett, S. D. (2002). Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*. 774, 141-148.

11. Muth, P., Metz, R., Hannelore, B., Wolfgang, B. W., & Hartmut, V. (1996). Improved high-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in human plasma by means of column switching. *Journal of Chromatography A*. 729, 259-266.
12. Carlqvist, J., Westerlund, D. (1985). Automated Determination of Amoxicillin in Biological Fluids by Column Switching in Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatographic Systems with Post-column Derivatization. *Journal of Chromatography, Biomedical applications* , 344, 285-296.
13. Zijtveld, J V., & Hoogdaem, EV. (1999). Application of a semipermeable surface column for the determination of amoxicillin in human blood serum. *Journal of Chromatography B*. 726, 169-174.
14. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L. and McDowall R. D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 17(2), 193-218.
15. Karnes, T. H., Shiu, G., and Shah, V. P. (1991). Validation of Bioanalytical Methods. *Pharm. Res.* 8(4), 421-426.
16. EURACHEM. *Quality The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. LGC (Teddington) Ltd, 1998.
17. Shah V. P., Midha K. K. , Dighe Shrikant, McGilveray I. J. , Skelly J. P. , Yacobi A, Layloff T., Viswanathan C. T., Cook E. C., McDowall R. D., Pittman K. A. and Spector S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies. *Pharm. Res.* 9(4), 588-592.
18. Britain, T. p. (1986). *Clarke's isolation and identifications of drugs*. The pharmaceutical Press England.
19. CFR, 2. (2002). USA.
20. Dekker, M. y. (1985). *Ion Pair Chromatography*. USA: INC.
21. Gao, J. (2003). Bioanalytical method validation for studies on pharmacokinetics, bioavailability and bioequivalence: Highlights or the FDA's Guidance. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* , 1 (4), 5-13.
22. Harvey M. C. y Stearns D. (1983). HPLC Column Selection Using Valves. *Liquid Chromatography* , 3 (1).

23. Harvey M. C. y Stearns D. May. (1982). HPLC Injection and column switching. *Am. Lab.*
24. Majors; R. E. Boos y K. S. Grimm,. (1996). Practical Guidelines for HPLC Integrated Sample Preparation Using Column Switching. *LC-GC* (7), 555-560.
25. J, C. (1987). Why analyze drugs in biological fluids y Special problems with biological fluids en *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. USA: CRC Press.
26. Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., & Hill, H. M. (2000). Bioanalytical method validation- a revisit with a decade or progress. *Pharmaceutical Research* , 12 (17), 1551.
- 27.P., T. A. (1990). Amoxicillin/Clavulanic acid. *Drugs* , 39 (2), 264-307.
28. Lee, T., & Brooks, M. (1984). High-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in human plasma using a bonded-phase extraction. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* (306), 429-435.
29. Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2003). Validation of Bioanalytical Methods- Highlights of FDA's Guidance. *LCGC* , 21 (2). Snyder, L. R. (1997). *Practical HPLC method development*. USA: John Wiley And Sons. Inc.