



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**Optimización y validación de un método analítico por
CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)
para cuantificar Ácido Clavulánico en plasma aplicado a
un estudio de Bioequivalencia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GRISELDA RODRÍGUEZ 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.

Agradezco especialmente al
Lic. Fernando Ramos,
Lic. José Miguel Ramos,
Q.F.B. Bethel González,
M. en I. Juan Carlos Vilchís
por las facilidades prestadas
Para la realización de ésta tesis

Infinitas Gracias

A mis padres
Por la paciencia y el amor de siempre,
por ser lo que son y enseñarme a disfrutar de lo que tengo y soy,

A mis hermanos
Por más paciencia y apoyo incondicional.

A mis sobrinas (os)
Por enseñarme cada día del amor y respeto a lo que nos rodea.

A Héctor
Por los momentos vívidos
y enseñarme a ser lo mejor de mí
aún en los momentos más difíciles.

A mi hijo Ricardo
por ser el mayor regalo del amor,
por ser mi alegría, la luz que me impulsa a ser
y enseñarme que en la inocencia, hay una gran sabiduría.

A mis amigas por estar siempre conmigo, aunque no estén.

Especialmente gracias a Dios,
por permitirme vivir y dejarme ser lo que hoy soy.

Es mucho mejor llegar a ser, que haber nacido siendo
Anónimo

INDICE	HOJA
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	2
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. GENERALIDADES	7
2.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO	7
2.2. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO	8
2.3. CROMATOGRAFÍA DE LIQUÍDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	11
2.3.1. Instrumental	11
2.3.1.1. Bombas	12
2.3.1.2. Inyectores	12
2.3.1.3. Detectores	12
2.3.1.4. Fase móvil	13
2.3.1.5. Columnas y fases estacionarias	14
2.4. DIFERENCIAS ENTRE CROMATOGRAFÍA FASE REVERSA Y CROMATOGRAFÍA FASE NORMAL	15
2.5. MÉTODOS A OPTIMIZAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO EN PLASMA	15
2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	15
2.6.1. Selectividad	16
2.6.2. Rango	16
2.6.3. Linealidad	16
2.6.4. Exactitud del método	16
2.6.5. Precisión	16
2.6.6. Recuperación absoluta	16
2.6.7. Estabilidad de la muestra analítica	17
2.6.8. Límite de cuantificación	17
2.6.9. Límite de detección	17
3. BIOEQUIVALENCIA	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18

5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivoso particulares	18
6. HIPÓTESIS	18
7. MATERIAL Y MÉTODOS	18
7.1. Material, equipo e instrumentos	18
7.1.1. Material	18
7.1.2. Equipo	19
7.1.3. Reactivos y sustancias de referencia	19
7.2. Optimización del método para la cuantificación de ácido Clavulánico en plasma.	20
7.2.1. Preparación de las soluciones	20
7.2.1.1. Solución de fosfatos pH 6	20
7.2.1.2. Solución de fosfatos 0.01 M a pH 5.4	20
7.2.1.3. Ácido Fosfórico al 10 %	20
7.2.1.4. Solución de ácido clorhidrico 5 M	20
7.2.1.5. Solución metanol :agua (80:20)	21
7.2.1.6. Solución agua:acetonitrilo (95:5)	21
7.2.1.7. Ácido Clavulánico.	21
7.2.1.8. Fase móvil	21
7.2.1.9. Solución de imidazol	22
7.2.2. Tratamiento de las muestras en plasma	22
7.3. Validación del método analítico	23
7.3.1. Condiciones cromatográficas	24
7.3.2. Sistema	24
7.3.2.1. Adecuabilidad del sistema	24
7.3.3. Método	24
7.3.3.1. Linealidad	24
7.3.3.2. Repetibilidad del método	24
7.3.3.3. Reproducibilidad del método	24
7.3.3.4. Recuperación absoluta	25
7.3.3.5. Estabilidad	25
7.3.3.6. Límite de detección y cuantificación	25
7.3.3.7. Selectividad	25
7.3.3.8. Tolerancia	25

7.4.	Criterios de aceptación de los parámetros de validación	26
7.5.	Estudio de Bioequivalencia	26
8.	RESULTADOS	27
8.1.	Optimización del método	27
8.1.1.	Cromatogramas de la optimización del método	28
8.2.	Validación	31
8.2.1.	Linealidad del método	31
8.2.2.	Repetibilidad	32
8.2.3.	Reproducibilidad	32
8.2.4.	Límite de cuantificación	34
8.2.5.	Límite de detección	34
8.2.6.	Selectividad	34
8.2.7.	Recuperación absoluta	36
8.2.8.	Estabilidad	37
8.2.8.1.	Estabilidad a temperatura ambiente	37
8.2.8.2.	Estabilidad en automuestreador	37
8.2.8.3.	Estabilidad en refrigeración	37
8.2.8.4.	Estabilidad en congelación	38
8.2.8.5.	Ciclos de congelación descongelación	38
8.2.9.	Tolerancia a la temperatura de la columna	38
8.3.	Estudio de Bioequivalencia	39
9.	DISCUSIÓN	41
10.	CONCLUSIONES	41
11.	BIBLIOGRAFÍA	42
12.	ANEXOS	44
	Anexo 1 Condiciones para la optimización del método analítico	44
	Anexo 2 Diseño clínico para el estudio de Bioequivalencia	46

1. INTRODUCCION

El ácido clavulánico es un inhibidor de la enzima β -lactamasa, combinado con la amoxicilina es frecuentemente empleado como una formulación antibacterial para el tratamiento de la infección causada por la enzima β -lactamasa producida por una bacteria resistente a la amoxicilina sola ⁽¹⁾.

En presencia del ácido Clavulánico las penicilinas β -lactamasas lábiles son protegidas de la degradación debido a que el ácido Clavulánico se anticipa al mecanismo de defensa bacteriano con un bloqueo irreversible de la enzima β -lactamasa ⁽²⁾.

Se han reportado diferentes métodos para el análisis de éstos dos componentes, tales como análisis microbiológicos, ensayos enzimáticos, espectrofotometría por UV o espectrometría de masas ⁽²⁾. Estos métodos son, generalmente conocidos ^(3,4), pero no resuelven el problema de la estabilidad que el ácido clavulánico presenta en la muestra biológica procesada lo que representa un grave problema al analizar muestras de un gran número de voluntarios en un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia.

Debido a que el ácido Clavulánico se descompone con la luz, se debe trabajar en un ambiente con luz roja y dada la inestabilidad que presenta en la muestra procesada fue necesario evaluar diferentes métodos para optimizar el más adecuado y que permita analizar al menos un voluntario en sus dos periodos en la misma corrida.

El presente trabajo ofrece una nueva alternativa de un método que permite el manejo de la muestra biológica (plasma) sin una rápida degradación usando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV para la medición de ácido clavulánico derivatizado con imidazol, el cual es detectado a 311 nm, usando 300 μ L de plasma, en un rango de concentración de 0.3 a 10 μ g/mL, lo cual fue empleado en el análisis de muestras de voluntarias sanas en un estudio de bioequivalencia.

2. GENERALIDADES

2.1 CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO

El ácido clavulánico es un compuesto β -lactámico el cual es separado de un fluido de cultivo del *Sptreptomyces clavuligerus*. Es un potente inhibidor de un amplio número de las enzimas beta lactamasas ⁽⁵⁾.

El ácido Clavulánico, es una molécula que se enlaza a las beta lactamasas y que al unirse formando enlaces covalentes con aminoácidos residuales en el sitio activo de las betalactamasas llevan a una inactivación irreversible de la actividad enzimática de las betalactamasas, logrando un aumento en la actividad de los antibióticos betalactámicos sensibles a betalactamasas. ⁽⁵⁾

Tiene una estructura β -lactamica similar a la del núcleo de la penicilina, excepto que el anillo de tiazolidina de las penicilinas se encuentra sustituido por un anillo oxazolidinico. En general, el ácido Clavulánico tiene una actividad antibacteriana débil ⁽⁶⁾.

Es un potente inhibidor progresivo de las β -lactamasas mediadas por plásmidos y algunas mediadas por cromosomas producidos por bacterias gramnegativas entre ellas *Haemophilus ducrei*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides fragilis* y alguna *enterobacteriaceae*. También es un inhibidor de las β -lactamasas producidas por *Staphilococcus aureus*. El ácido Clavulánico puede penetrar a través de las paredes celulares bacterianas y por tanto, inactivar tanto las enzimas extracelulares como las que están ligadas a la

1. INTRODUCCION

El ácido clavulánico es un inhibidor de la enzima β -lactamasa, combinado con la amoxicilina es frecuentemente empleado como una formulación antibacterial para el tratamiento de la infección causada por la enzima β -lactamasa producida por una bacteria resistente a la amoxicilina sola ⁽¹⁾.

En presencia del ácido Clavulánico las penicilinas β -lactamasas lábiles son protegidas de la degradación debido a que el ácido Clavulánico se anticipa al mecanismo de defensa bacteriano con un bloqueo irreversible de la enzima β -lactamasa ⁽²⁾.

Se han reportado diferentes métodos para el análisis de éstos dos componentes, tales como análisis microbiológicos, ensayos enzimáticos, espectrofotometría por UV o espectrometría de masas ⁽²⁾. Estos métodos son, generalmente conocidos ^(3,4), pero no resuelven el problema de la estabilidad que el ácido clavulánico presenta en la muestra biológica procesada lo que representa un grave problema al analizar muestras de un gran número de voluntarios en un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia.

Debido a que el ácido Clavulánico se descompone con la luz, se debe trabajar en un ambiente con luz roja y dada la inestabilidad que presenta en la muestra procesada fue necesario evaluar diferentes métodos para optimizar el más adecuado y que permita analizar al menos un voluntario en sus dos periodos en la misma corrida.

El presente trabajo ofrece una nueva alternativa de un método que permite el manejo de la muestra biológica (plasma) sin una rápida degradación usando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV para la medición de ácido clavulánico derivatizado con imidazol, el cual es detectado a 311 nm, usando 300 μ L de plasma, en un rango de concentración de 0.3 a 10 μ g/mL, lo cual fue empleado en el análisis de muestras de voluntarias sanas en un estudio de bioequivalencia.

2. GENERALIDADES

2.1 CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO

El ácido clavulánico es un compuesto β -lactámico el cual es separado de un fluido de cultivo del *Sptreptomyces clavuligerus*. Es un potente inhibidor de un amplio número de las enzimas beta lactamasas ⁽⁵⁾.

El ácido Clavulánico, es una molécula que se enlaza a las beta lactamasas y que al unirse formando enlaces covalentes con aminoácidos residuales en el sitio activo de las betalactamasas llevan a una inactivación irreversible de la actividad enzimática de las betalactamasas, logrando un aumento en la actividad de los antibióticos betalactámicos sensibles a betalactamasas. ⁽⁵⁾

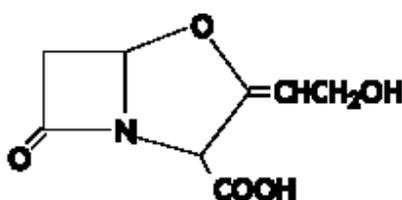
Tiene una estructura β -lactamica similar a la del núcleo de la penicilina, excepto que el anillo de tiazolidina de las penicilinas se encuentra sustituido por un anillo oxazolidinico. En general, el ácido Clavulánico tiene una actividad antibacteriana débil ⁽⁶⁾.

Es un potente inhibidor progresivo de las β -lactamasas mediadas por plásmidos y algunas mediadas por cromosomas producidos por bacterias gramnegativas entre ellas *Haemophilus ducrei*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides fragilis* y alguna *enterobacteriaceae*. También es un inhibidor de las β -lactamasas producidas por *Staphilococcus aureus*. El ácido Clavulánico puede penetrar a través de las paredes

celulares bacterianas y por tanto, inactivar tanto las enzimas extracelulares como las que están ligadas a la

célula. Su mecanismo de acción depende de la enzima inhibida, pero generalmente actúa como un inhibidor competitivo y a menudo irreversible. El ácido Clavulánico aumenta, por tanto la actividad de los antibacterianos penicilínicos y cefalosporínicos frente a muchas cepas bacterianas resistentes. Sin embargo, en general es menos eficaz frente a β -lactamasas tipo 1 mediadas cromosómicamente; por tanto, numerosos *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella* y *Serratia spp*, así como *Pseudomonas aeruginosa* son resistentes⁽⁶⁾.

Estructura química del Ácido Clavulánico



Nombre químico: [2R-(2 α ,3Z,5 α)]-3-(2-Hidroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo-[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid^(7,8,9).

Nombre comercial de la sal de potasio en combinación con Amoxicilina trihidratada: Augmentin, Clavulin^(7,8).

Formula condensada: C₈H₉NO₅

Peso molecular: 199.16 g/ mol⁽⁷⁾

pKa: 2.7⁽¹⁰⁾

Apariencia Física del clavulanato de potasio: Polvo blanco o casi blanco, sensible a la humedad⁽⁹⁾.

Solubilidad: Fácilmente soluble en agua, no es estable en soluciones acuosas, estabilidad óptima a pH 6.0 a 6.3, soluble en metanol con descomposición⁽⁹⁾.

2.2 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO

El ácido Clavulánico administrado como clavulanato de potasio es producido por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*⁽⁴⁾. Por si solo tiene una baja actividad antimicrobiana⁽¹¹⁾.

Los inhibidores de betalactamasas se unen a algunas proteínas que ligan penicilinas ejerciendo así una doble actividad antibacteriana⁽²⁾. La actividad principal incluye la inhibición irreversible (suicida) de betalactamasas⁽¹¹⁾

Los inhibidores de betalactamasas son antibióticos con algo de actividad antibacteriana propia, pero que al unirse formando enlaces covalentes con aminoácidos residuales en el sitio activo de las betalactamasas llevan a una inactivación irreversible de la actividad enzimática de las

betalactamasas, logrando un aumento en la actividad de los antibióticos betalactámicos sensibles a betalactamasas. Los inhibidores de betalactamasas incluyen al ácido clavulánico, introducido para su uso clínico en 1981, sulbactam y tazobactam. Actualmente las asociaciones de estos

inhibidores son ácido clavulánico con amoxicilina, sulbactam con ampicilina, ácido clavulánico con ticarcilina y piperacilina con tazobactam; estas combinaciones aumentan la actividad antibacteriana de los betalactámicos 4 a 32 veces más⁽¹¹⁾.

El ácido Clavulánico es un inhibidor potente de las enzimas beta lactamasas bacterianas. Aumenta el espectro de actividad de la amoxicilina, que pasa a ser eficaz contra productores de beta lactamasa^(11,12).

Se considera una alternativa posible para el tratamiento de infecciones complicadas del aparato urinario, otitis media, sinusitis e infecciones del aparato respiratorio provocadas por cepas productoras de beta lactamasa⁽¹³⁾.

FARMACOCINETICA Y FARMACODINAMIA

La resistencia a muchos antibióticos está causada por enzimas bacterianas las cuales destruyen al antibiótico antes de que este pueda actuar sobre el patógeno⁽¹⁴⁾.

En la mezcla compuesta de amoxicilina trihidratada y la sal potásica del ácido clavulánico, el clavulanato se anticipa al mecanismo de defensa bacteriano con un bloqueo irreversible de la enzima betalactamasa, lo cual convierte a los microorganismos en sensibles al rápido efecto de la amoxicilina⁽¹¹⁾.

El clavulanato por sí solo tiene muy poca actividad antibacteriana, sin embargo, en asociación con amoxicilina, se convierte en un antibiótico de amplio espectro con una amplia variedad de aplicaciones en la práctica clínica general y hospitalaria⁽¹³⁾.

Aproximadamente el 25% de ácido clavulánico circulante están ligados a proteínas plasmáticas⁽¹⁴⁾.

Altas concentraciones son encontradas en bilis y en orina. No llega a cerebro ni a líquido cefalorraquídeo a menos que se encuentren inflamadas las meninges. Por estudios en animales no existe evidencia que sugiera que alguno de los componentes se acumula en el organismo⁽¹⁴⁾.

Entre el 60- 70% de amoxicilina y el 40-65% de ácido clavulánico son excretados sin cambios durante las primeras 6 horas después de administrar una sola tableta de 500/125 mg; aproximadamente 10-25% de la dosis inicial es metabolizada^(14, 15).

La fase beta de la vida media de eliminación, en pacientes con función renal normal es de aproximadamente una hora. La vida media es prolongada en pacientes con daño renal (v.gr. 8 a 16 horas en pacientes anúricos) y es necesario un ajuste en la dosis o en el intervalo de administración^(14, 15, 16).

La combinación amoxicilina-clavulanato de potasio administrada por vía oral, se absorbe bien por el tubo digestivo, presentando ambas gran estabilidad en presencia de jugos gástricos, por lo que pueden ser administradas independientemente de las comidas, aunque los efectos secundarios disminuyen si se administran durante las comidas⁽¹⁶⁾.

Después de una dosis oral alcanzan una concentración plasmática máxima en una hora. La biodisponibilidad de la amoxicilina es 96% y del ácido clavulánico es 60%.

La absorción oral de ácido clavulánico es del 89 al 97%. El ácido clavulánico se une en 20% a las proteínas y tiene una buena penetración al hígado, riñones, líquido peritoneal, bilis, hueso, líquido sinovial y ganglios linfáticos.

El ácido clavulánico es parcialmente metabolizado en el hígado; los metabolitos y el resto del compuesto son eliminados por vía renal ^(11, 12, 14, 17, 18).

El ácido clavulánico se absorbe rápidamente por vía oral y es estable en presencia del ácido gástrico. Su biodisponibilidad es del 75%. Su distribución es amplia; pasa a la leche materna y atraviesa la barrera placentaria. Se liga a las proteínas en 22% al 30%, se metaboliza por vía hepática en un 50%. Su vida media en pacientes normales es de 1,3 horas y en pacientes con falla renal aumenta hasta 3 horas. Se elimina por vía renal en 6 horas completamente y sin mayores cambios ⁽¹⁹⁾.

PRESENTACIONES

Con la finalidad de fundamentar la bioequivalencia se presentan las diferentes formas farmacéuticas de la combinación amoxicilina con ácido Clavulánico siendo la suspensión pediátrica la que se empleará en el estudio de bioequivalencia:

	TABLETAS	SUSPENSIÓN	
		JUNIOR	PEDIATRICA
Amoxicilina trihidratada equivalente a de amoxicilina	500 mg	250 mg/5 ml	125 mg/5 ml
Clavulanato de potasio equivalente a de ácido clavulánico	125 mg	62.5 mg/5 ml	31.25mg/5 ml
Presentación	Caja con frasco con 6, 10 y 14 tabletas	Caja con frasco con polvo para reconstituir a 50 mL.	Caja con frasco con polvo para reconstituir a 40 mL.

Fuente PLM⁽¹⁵⁾

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

No se han descrito interacciones medicamentosas con los inhibidores de las betalactamasas ^(15, 17).

Se puede incrementar el tiempo de protrombina en combinación con anticoagulantes ^(13,19).

TOXICIDAD

Además de la toxicidad de los betalactámicos asociados con los inhibidores de betalactamasas, estos últimos antibióticos pueden provocar por si solos reacciones de hipersensibilidad, náusea y diarrea ⁽¹⁴⁾.

Como todas las penicilinas, son escasos los efectos secundarios de los inhibidores de betalactamasas. Se han descrito en un porcentaje menor al 5 % la presencia de náuseas, vómitos, diarrea, exantema morbiliforme, urticaria, alteración de las pruebas hepáticas. Cabe mencionar que con la combinación de Clavulánico puede aparecer hepatitis colestásica reversible ⁽¹⁵⁾.

Entre los efectos hepáticos se han comunicado aumentos moderados y asintomáticos de Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanino aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina. También se ha comunicado hepatitis e ictericia colestásica ⁽²⁰⁾.

2.3 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria.

La cromatografía líquida "clásica" se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.

De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, en sus siglas en inglés HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas ^(21,22).

2.3.1. Instrumental

El sistema cromatográfico consta de una bomba, un inyector, un detector y un integrador o software donde se ven los cromatogramas.

El instrumento debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo y realizar el máximo de operaciones, tales como, programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc.

Para tener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.

La reproducibilidad y estabilidad son características esenciales si se quiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo. Debe proporcionar un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil, etc, y para ello debe contar con control de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil (gradiente), detector, etc.

Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables, La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza. ⁽²¹⁾

2.3.1.1. Bombas

Las columnas utilizadas en cromatografía líquida están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Los aspectos más importantes en el sistema de bombeo son:

- Químicamente inerte
- Presión máxima de operación. (5,000 psi)
- Intervalos de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 mL/min.)
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1 %)
- Características del flujo (gradiente, cambio rápido de disolvente).

También es importante que tengan resistencia a líquidos corrosivos, así como la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema^(21,23)

Existen diferentes tipos de bombas:

- Pistón recíprocante (las más comunes).
- Pistón recíprocante de doble cabeza
- Bombas de jeringa (más empleadas en SFC y micro HPLC).⁽²³⁾

2.3.1.2. Inyectores

Las muestras deben ser introducidas en la entrada de la columna con un mínimo de turbulencia. Para lo cual hay dos modos de trabajo:

- a. Flujo detenido.
- b. Flujo de solvente

Hay tres tipos básicos de inyectores

- Flujo detenido. Se hace una inyección a presión atmosférica, el sistema es cerrado y el flujo es reiniciado (generalmente el sistema mantiene la presión en operación). Esta técnica es empleada porque la difusión en líquidos es pequeña y la resolución generalmente no es afectada.
- Septa. Son inyectores semejantes a los empleados en cromatografía de gases. Estos inyectores son usados a presiones de 60-70 atmósferas. Desafortunadamente, la septa no es compatible con todos los solventes empleados en cromatografía de líquidos. Además las pequeñas partículas de gotas en la septa pueden provocar problemas para entrar.
- Válvulas loop. Este tipo de inyector es el empleado más comúnmente para volúmenes más grandes de 10 μL y frecuentemente son usados en sistemas automatizados. En la posición de llenado, la muestra en el loop es llenada a presión atmosférica, cuando la válvula es abierta, la muestra en el loop se pasa a la columna⁽²²⁾.

Las válvulas inyectoras se fabrican solo de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable, y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas⁽²¹⁾.

2.3.1.3. Detectores

El detector es un aparato que proporciona una señal de salida en respuesta a la presencia de la muestra. Está conectado a la salida de la columna al monitor en tiempo real. El detector puede ser el más sofisticado y uno de los más caros componentes del sistema cromatográfico⁽²²⁾.

Existen diferentes tipos de detectores y se emplean de acuerdo a las características de los compuestos que se requieren cuantificar.

- Detección ultravioleta (UV)
- Longitud de onda fija
- Longitud de onda variable
- Arreglo de diodos
 - Índice de Refracción
 - Fluorescencia
 - Electroquímica
 - Masas/FTIR/Conductividad/Masas

El detector debe tener ciertas propiedades generales como:

- Respuesta. Debe proporcionar una respuesta con la cual se identifique el compuesto a cuantificar.
- Sensibilidad La cual es variable y depende de la muestra. Esta limitada por el nivel del ruido del instrumento.
- Ruido. Es la variación de la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.
- Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.
- Estabilidad. Debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez que ser compatible con programaciones de la fase móvil ⁽²¹⁾.

Para el presente estudio se empleó el detector de luz ultravioleta (UV) con arreglo de diodos. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La respuesta de éste detector es selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban la luz de la longitud de onda a la que opera el detector ⁽²¹⁾.

2.3.1.4. Fase móvil

Aún cuando la fase móvil no es parte del instrumental, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes ⁽²¹⁾.

La composición del solvente o fase móvil es una de las variables que influyen en la separación ⁽²²⁾, por ello es importante conocer las características:

- a. Ser pura, que no presente contaminantes
- b. No reactiva con el empaque de la columna.
- c. Ser compatible con el detector
- d. Disuelva la muestra
- e. Que tenga baja viscosidad
- f. Que tenga una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna ^(21,22).

Es indispensable que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede presentarse precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación por lo que se deben seleccionar con cuidado.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado lo que es particularmente importante en el caso de programaciones de la fase móvil, puesto que el cambio de composición de ésta puede afectar el funcionamiento del detector; debe ser de alta pureza, usualmente de grado espectroscópico o bien grado cromatográfico.⁽²¹⁾

Los disolventes más comúnmente empleados son:

- Hexano,
- Acetonitrilo,
- Metanol,
- Tetrahidrofurano
- Isopropanol
- Agua.

RECIPIENTES DE ALMACENAMIENTO DE LA FASE MOVIL

Los recipientes más empleados son de vidrio o plásticos inertes.

La toma del disolvente generalmente se hace a través de un filtro de por lo menos 2 µm de porosidad, para remover pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna.

Es importante también considerar la desgasificación de la fase móvil, pues muchas veces, especialmente con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se desgasifican dentro del instrumento y forman burbujas, pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Para realizar la desgasificación se pueden emplear diferentes instrumentos, la aplicación de vacío al recipiente que contiene la fase móvil mientras se agita con un agitador magnético, empleando un sonicador o bien empleando el módulo de desgasificación con que cuentan diferentes equipos^(21, 22).

2.3.1.5. Columnas y fases estacionarias

En todo sistema cromatográfico, la columna es el "corazón del sistema puesto que en ella se lleva a efecto la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. El acero inoxidable es el más usado. La longitud de la columna, por lo general, entre 10 y 50 cm., puede ser más larga ocasionalmente o incluso más corta con la llegada de la cromatografía rápida. El diámetro en la mayoría es de alrededor de 3 a 4 mm.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.⁽²¹⁾

La eficiencia está en función de los parámetros de la columna, tal como velocidad de flujo, tamaño de partícula del empaque de la columna, el método de empaque de la columna y la viscosidad del solvente⁽²²⁾.

Actualmente existe una gran variedad de columnas de fase reversa, las cuales han sido tratadas químicamente para elevar su eficiencia y son también más específicas para diferentes compuestos, la más común es la C18 (empaque con soporte de sílica unida covalentemente a una cadena de 18 carbonos) la cual es estable⁽¹⁴⁾, además se manejan diferentes tamaños de partícula que van de las 10 µm hasta las 3 µm, o menos, de igual manera el tamaño de la columna ha ido disminuyendo (de 30 cm hasta 3 cm o menos), para mejorar los tiempos de análisis y emplear menor cantidad de solventes⁽²¹⁾.

La selección de la columna debe realizarse de acuerdo a la complejidad del analito y la matriz empleada, pues esta una parte muy susceptible de saturarse por impurezas de la matriz o concentración empleada del analito.

2.4 DIFERENCIAS ENTRE CROMATOGRAFÍA FASE REVERSA Y CROMATOGRAFÍA FASE NORMAL

Fase reversa:

Emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar.

En la cromatografía de fase reversa se combinan una fase móvil polar, normalmente una mezcla de agua o solución tampón con eluyentes polares como el metanol, el acetonitrilo o el tetrahidrofurano y una fase estacionaria no polar como hidrocarburos de cadena larga unidos a un soporte de sílice o híbrido ^(12, 13).

Fase normal:

Emplea una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar ^(21, 22).

2.5 MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO EN PLASMA.

Existen diferentes métodos para cuantificar Ácido Clavulánico en plasma. A continuación se mencionan algunos de los métodos.

AUTOR	COLUMNA	VEL. FLUJO	FASE MOVIL	LONG. ONDA	EXTRACCIÓN	DETECTOR
Hoizey G., Lamiabile D., et al. 2002 ⁽²⁾	C8 250X4 mm	1.0 mL/min.	A (Dihidrogeno fosfato de potasio 0.01 M con 0.02 M de cloruro de tetrametilamonio a pH 2.5). B (acetonitrilo) Gradiente	220 nm	Precipitación con metanol	UV-VIS
Foulstone M. 1982 ⁽³⁾	C18 250X4.6 mm	2.5 mL/min.	Fosfato de potasio 0.1 M (pH 3.2)	227 nm	Ultrafiltración/derivatización con imidazol.	UV-VIS
Yoon K-H, et al. 2004 ⁽⁴⁾	C8	0.4 mL/min.	Mezcla de 2 mL de ácido fórmico, 1000 mL de agua HPLC y 100 mL de acetonitrilo	SIM ION 364.1 amoxicilina 136.1 ac. Clavulánico	Precipitación con terbutalina en acetonitrilo	HPLC-ESI (espectrometría de masas)

El principal problema durante la cuantificación del ácido Clavulánico en la empresa, es la rápida degradación de la muestra biológica ya procesada y la necesidad de procesar las muestras e inyectarlas al cromatógrafo de líquidos de manera inmediata, lo que hace difícil el análisis cuando se trata de un gran número de muestras tal es el caso de un estudio de bioequivalencia.

2.6. VALIDACION DE METODOS BIOANALITICOS

La validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado ⁽²⁴⁾, en este caso para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica ^(24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

Los parámetros de validación establecidos por el organismo regulatorio que nos rige son:

Linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, recobro absoluto, estabilidad de la muestra a diferentes condiciones de almacenamiento ⁽²⁴⁾.

2.6.1 SELECTIVIDAD

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra ⁽²⁴⁾.

Determina si el método es capaz de discernir al compuesto que es de interés analizar de otras sustancias, ya sea exógenas o endógenas que puedan interferir con la cuantificación del mismo ⁽²⁵⁾.

2.6.2 RANGO

Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso exacto y lineal ⁽²⁴⁾.

Es el intervalo de concentraciones que se emplean para calibrar el método analítico. Este intervalo se determina de acuerdo a las concentraciones esperadas en el estudio farmacocinético, en función de la dosis del fármaco que se administre ⁽²⁵⁾.

2.6.3 LINEALIDAD

Es la capacidad de un método analítico en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra ⁽²⁴⁾. Es decir, se define como la relación matemática existente entre la concentración a evaluar con respecto a la respuesta observada ⁽²⁵⁾.

2.6.4 EXACTITUD DEL MÉTODO

Se define como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia ⁽²⁴⁾.

Se evalúa mediante la adición de concentraciones conocidas del fármaco a analizar y se determina el valor que se obtiene con el método analítico ⁽²⁵⁾.

2.6.5 PRECISIÓN

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad ⁽²⁴⁾.

Indica que tan variable es el método tanto en un mismo día de análisis como en distintos días ⁽²⁵⁾.

2.6.6 RECUPERACIÓN ABSOLUTA

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica ⁽²⁴⁾.

Es importante que se evalúe la recuperación del compuesto a analizar. Se recomienda que el

porcentaje de recuperación sea reproducible en todas las concentraciones que corresponden al rango de calibración ⁽²⁵⁾.

2.6.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Es la propiedad del compuesto por analizar, es decir, de la muestra como tal, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis ⁽²⁴⁾.

Es importante conocer la estabilidad del compuesto para que en función de ello se puedan establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras y de trabajo de las mismas ⁽²⁵⁾.

En ella se incluyen la estabilidad en congelación, y ciclos de congelación-descongelación.

2.6.8 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método ⁽²⁴⁾.

Corresponde al estándar de calibración más pequeño que puede ser medido de una manera confiable y que cumple con los criterios antes descritos ⁽²⁵⁾.

2.6.9 LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas ⁽²⁴⁾.

Es la concentración mínima cuya señal puede distinguirse de la basal. Es un parámetro informativo acerca de que tan sensible es el método y en un momento dado, hasta qué concentraciones es factible establecer la calibración del método ⁽²⁵⁾.

3. BIOEQUIVALENCIA

Los métodos de bioequivalencia se llevan a cabo cuando los perfiles de disolución no son suficientes para demostrar equivalencia entre medicamentos.

El método general para realizar un estudio de bioequivalencia está prácticamente armonizado en el mundo. En México se realiza según un diseño abierto, aleatorizado y doble cruzado en no menos de 24 voluntarios sanos, de 18 a 50 años de un solo sexo o de ambos ⁽²⁴⁾. El número total de individuos elegidos deberá asistir a la unidad clínica en dos oportunidades (períodos), en los que la mitad recibirá los dos tratamientos, medicamento prueba y medicamento referencia en un orden o secuencia (PR) y la otra mitad en el orden o secuencia inversa (RP), con un tiempo de lavado adecuado (no menos de 5 a 7 vidas medias) entre periodos. Luego de una primera muestra de sangre a tiempo 0 horas, se administra una dosis única de cada formulación bajo estudio en un volumen de 250 mL de agua luego de un ayuno nocturno de unas 10 o 12 horas y a partir de ese momento se controla la ingesta estandarizada de líquidos y sólidos. Las muestras sanguíneas deben tomarse a idénticos tiempos para ambas formulaciones y debe tenerse un perfil plasmático del fármaco para cada individuo, abarcando hasta 4 a 5 vidas medias de la misma (excepto para el caso de fármacos con vida media larga, donde se acepta 72 horas como la última toma de extracción). A continuación, de los resultados de concentraciones plasmáticas vs. tiempo, se obtienen los Parámetros de Biodisponibilidad: C_{max} (concentración plasmática máxima), T_{max} (tiempo al máximo) y ABC (área bajo la curva) que es calculada al último tiempo de toma de muestra ABC_{0-t} y la ABC_{0-inf}, que es calculada por extrapolación teórica hasta tiempo infinito para cada individuo y por formulación. En la etapa estadística final, se comparan los Parámetros de Biodisponibilidad (básicamente C_{max} y ABC) producidos por ambas

formulaciones, a fin de evaluar si sus diferencias (ya que nunca los productos serán idénticos) podrían tener una importancia clínica. En otras palabras para responder si ambas formulaciones pueden considerarse bioequivalentes, o sea si se puede inferir de estos estudios que van a comportarse como equivalentes Terapéuticos. En suma se espera que su seguridad y eficacia sean comparables ^(24, 25,31,32).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ácido Clavulánico es un beta lactamico el cual al analizarse como materia prima o como producto terminado debe protegerse de la luz; no obstante esta indicación referida por algunos autores ^(7,15) en ningún momento indica la protección o resguardo de la luz cuando se procesan muestras biológicas para cuantificar el activo contenido en ellas ^(2,3,4). Se sabe que el ácido Clavulánico permanece estable en plasma humano a -70° C protegido de la luz ⁽³³⁾. Sin embargo, en la práctica dentro del laboratorio al realizar la cuantificación en muestras biológicas, la estabilidad de la muestra se torna crítica al evidenciarse la degradación de la misma durante su proceso de análisis. Esto representa un grave problema en la empresa al analizar grandes cantidades de muestras particularmente de estudios de bioequivalencia. Por ello se hace necesario optimizar el método analítico y validarlo de manera que nos permita procesar todas las muestras de plasma incluyendo las de un mismo voluntario en los dos periodos de un estudio de bioequivalencia, para eliminar errores de análisis y disminuir los tiempos de entrega de resultados que son indispensables en los centros dedicados a éste tipo de estudios.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Optimizar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar Ácido Clavulánico en plasma aplicado en estudios de bioequivalencia.

5.2. Objetivos particulares

- Optimizar un método para cuantificar ácido Clavulánico por CLAR que permita incrementar la estabilidad de las muestras procesadas.
- Validar el método seleccionado para cuantificar el Ácido Clavulánico en plasma.
- Aplicar el método desarrollado y validado en estudio de Bioequivalencia de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998

6. HIPÓTESIS

Si se logra optimizar y validar un método analítico que permita cuantificar muestras plasmáticas con ácido Clavulánico, sin que se degraden una vez procesadas, entonces esto permitirá emplearlo en estudios de bioequivalencia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material, equipo e instrumentos.

7.1.1. Material

- Tubos viales eppendorf de 1.5 y 2.0 mL

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ácido Clavulánico es un beta lactámico el cual al analizarse como materia prima o como producto terminado debe protegerse de la luz; no obstante esta indicación referida por algunos autores ^(7,15) en ningún momento indica la protección o resguardo de la luz cuando se procesan muestras biológicas para cuantificar el activo contenido en ellas ^(2,3,4). Se sabe que el ácido Clavulánico permanece estable en plasma humano a -70° C protegido de la luz ⁽³³⁾. Sin embargo, en la práctica dentro del laboratorio al realizar la cuantificación en muestras biológicas, la estabilidad de la muestra se torna crítica al evidenciarse la degradación de la misma durante su proceso de análisis. Esto representa un grave problema en la empresa al analizar grandes cantidades de muestras particularmente de estudios de bioequivalencia. Por ello se hace necesario optimizar el método analítico y validarlo de manera que nos permita procesar todas las muestras de plasma incluyendo las de un mismo voluntario en los dos periodos de un estudio de bioequivalencia, para eliminar errores de análisis y disminuir los tiempos de entrega de resultados que son indispensables en los centros dedicados a éste tipo de estudios.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Optimizar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar Ácido Clavulánico en plasma aplicado en estudios de bioequivalencia.

5.2. Objetivos particulares

- Optimizar un método para cuantificar ácido Clavulánico por CLAR que permita incrementar la estabilidad de las muestras procesadas.
- Validar el método seleccionado para cuantificar el Ácido Clavulánico en plasma.
- Aplicar el método desarrollado y validado en estudio de Bioequivalencia de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998

6. HIPÓTESIS

Si se logra optimizar y validar un método analítico que permita cuantificar muestras plasmáticas con ácido Clavulánico, sin que se degraden una vez procesadas, entonces esto permitirá emplearlo en estudios de bioequivalencia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material, equipo e instrumentos.

7.1.1. Material

- Tubos viales eppendorf de 1.5 y 2.0 mL

formulaciones, a fin de evaluar si sus diferencias (ya que nunca los productos serán idénticos) podrían tener una importancia clínica. En otras palabras para responder si ambas formulaciones pueden considerarse bioequivalentes, o sea si se puede inferir de estos estudios que van a comportarse como equivalentes Terapéuticos. En suma se espera que su seguridad y eficacia sean comparables ^(24, 25,31,32).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ácido Clavulánico es un beta lactámico el cual al analizarse como materia prima o como producto terminado debe protegerse de la luz; no obstante esta indicación referida por algunos autores ^(7,15) en ningún momento indica la protección o resguardo de la luz cuando se procesan muestras biológicas para cuantificar el activo contenido en ellas ^(2,3,4). Se sabe que el ácido Clavulánico permanece estable en plasma humano a -70° C protegido de la luz ⁽³³⁾. Sin embargo, en la práctica dentro del laboratorio al realizar la cuantificación en muestras biológicas, la estabilidad de la muestra se torna crítica al evidenciarse la degradación de la misma durante su proceso de análisis. Esto representa un grave problema en la empresa al analizar grandes cantidades de muestras particularmente de estudios de bioequivalencia. Por ello se hace necesario optimizar el método analítico y validarlo de manera que nos permita procesar todas las muestras de plasma incluyendo las de un mismo voluntario en los dos periodos de un estudio de bioequivalencia, para eliminar errores de análisis y disminuir los tiempos de entrega de resultados que son indispensables en los centros dedicados a éste tipo de estudios.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Optimizar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar Ácido Clavulánico en plasma aplicado en estudios de bioequivalencia.

5.2. Objetivos particulares

- Optimizar un método para cuantificar ácido Clavulánico por CLAR que permita incrementar la estabilidad de las muestras procesadas.
- Validar el método seleccionado para cuantificar el Ácido Clavulánico en plasma.
- Aplicar el método desarrollado y validado en estudio de Bioequivalencia de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998

6. HIPÓTESIS

Si se logra optimizar y validar un método analítico que permita cuantificar muestras plasmáticas con ácido Clavulánico, sin que se degraden una vez procesadas, entonces esto permitirá emplearlo en estudios de bioequivalencia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material, equipo e instrumentos.

7.1.1. Material

- Tubos viales eppendorf de 1.5 y 2.0 ml

- Matraces volumétricos de vidrio de 25 mL
- Matraces volumétricos de vidrio de 10 mL
- Pipetas volumétricas de 2.5 mL
- Pipetas volumétricas de 3.0 mL
- Puntas para pipeta repetitiva de 5 mL
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Vasos de precipitado de 10 mL
- Probetas de vidrio de 25 mL
- Viales ámbar de 2 mL Agilent
- Insertos Agilent
- Membranas de filtración 45µm Millipore
- Columna Cromatográfica Symetry Shield RP-18 de 150 X 4.6 mm, 5 µm marca Waters

7.1.2. Equipo

- Agitador vórtex, marca Barnstead.
- Micropipetas eppendorf de 2 – 20 µL,
- Micropipetas eppendorf de 100 – 1000 µL.
- Micropipetas Brand de 10 – 100 µL
- Pipeta repetitiva digital, marca Eppendorf.
- Balanza analítica, marca Kern.
- Ultra congelador, marca REVCO,
- Centrífuga refrigerada rotina 35 R, 500 a 15,000 rpm marca Hettich
- Refrigerador, marca Nieto.
- Campana de extracción, marca ESCO
- Bomba de vacío Felisa, marca SIEMMENS
- Potenciómetro, marca Corning 443i
- Sistema Cromatográfico HP 1100 marca Agilent.

Bomba	Bomba cuaternaria con controlador de gradiente.
Automuestreador	Inyector automático con termostato.
Compartimiento de columna	Compartimiento de columna con termostato.
Desgasificador	Desgasificador automatizado
Detector	Detector de arreglo de diodos

7.1.3. Reactivos y sustancias de referencia.

- Agua grado cromatográfico (EMD)
- Metanol grado cromatográfico (Tecnolab)
- Acetonitrilo grado cromatográfico (Tecnolab)
- Diclorometano grado reactivo (Mallinckrodt)
- Fosfato monobásico de potasio grado reactivo (Mallinckrodt)
- Fosfato dibásico de sodio heptahidratado grado reactivo (JT Baker)
- Ácido fosfórico grado reactivo (J. T. Baker)
- Imidazol grado reactivo (SIGMA-ALDRICH)
- Ácido clorhídrico grado reactivo (J. T. Baker)
- Clavulanato de litio Estándar Primario USP
Ácido Clavulanico
Lote: 11C270
Pureza: 95.2 %
- Amoxicilina Trihidratada Estándar Primario USP
Lote: J0C043
Pureza: 86.2 %

7.2. Optimización del método para la cuantificación de ácido Clavulánico en plasma.

Con base a lo reportado por Khalil Alkhamis (2000) ⁽³³⁾ y Yoon K y Cols. (2004) ⁽⁴⁾, se planteó el tratamiento de las muestras de plasma derivatizando el ácido clavulánico con imidazol, con posterior precipitación con acetonitrilo y una extracción con diclorometano para, finalmente reconstituir con fase móvil (ver diagrama de método de extracción).

Considerando que el ácido Clavulánico en plasma es labil a la luz ⁽¹⁵⁾, se estableció trabajar en un ambiente con luz roja.

7.2.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

NOTA: La preparación de las muestras debe realizarse con luz roja para evitar la degradación del ácido Clavulánico.

7.2.1.1. Solución de fosfatos pH 6.

- a. Solución de fosfato monobásico de potasio 0.06 M.
Pesar 0.9 g de fosfato monobásico de potasio, transferir a matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 60 mL de agua grado cromatográfico y agitar hasta disolver completamente los cristales, llevar al aforo con el mismo disolvente.
- b. Solución de fosfato dibásico de sodio heptahidratado 0.06 M.
Pesar 0.88 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 30 mL de agua grado cromatográfico, agitar para solubilizar y llevar al aforo con el mismo disolvente.
- c. De la solución de fosfato dibásico de sodio tomar una alícuota de 40.8 mL, transferir a un vaso de precipitados de 200 mL adicionar 100 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.06 M (a), mezclar, medir y ajustar el pH a 6 con ácido fosfórico al 10 %.

7.2.1.2 Solución de fosfatos 0.01 M a pH 5.4

Pesar 0.71 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 30 mL de agua grado Cromatográfico, ajustar el pH a 5.4 con ácido fosfórico al 10 % y llevar al aforo con el mismo disolvente. Transferir a un frasco schott e identificar.

7.2.1.3 Ácido fosfórico al 10 %

Tomar una alícuota de 11.7 mL de ácido fosforico concentrado, llevar un matraz volumétrico de 100 mL conteniendo 50 mL de agua grado Cromatográfico, mezclar y llevar al aforo. Transferir a un frasco schott e identificar.

7.2.1.4 Solución de ácido clorhídrico 5 M

Adicionar 4 mL de agua grado Cromatográfico a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar 4.2 mL de ácido clorhídrico, mezclar y llevar al aforo con agua grado

Cromatográfico. Transferir a un frasco schott e identificar.

7.2.1.5 Solución metanol:agua (80:20)

Medir 80 mL de Metanol grado Cromatográfico, llevar a un frasco de 100 mL, adicionar 20 mL de agua grado cromatográfico, mezclar e identificar.

7.2.1.6 Solución agua:acetonitrilo (95:5)

Medir 95 mL de agua grado Cromatográfico, llevar a un frasco de 100 mL, adicionar 5 mL de acetonitrilo grado Cromatográfico, mezclar e identificar.

7.2.1.7 Ácido clavulánico

- **Solución A** de Ácido Clavulánico a concentración de 400 µg/mL.

Pesar con exactitud 10.5 mg de Clavulanato de litio, pasarlos a un matraz volumétrico de 25 mL disolver y aforar con la solución a pH 6. Esta solución contiene 400 µg/mL de ácido clavulánico.

- **Solución B** de Ácido Clavulánico a concentración de 100 µg/mL.

Medir con una pipeta volumétrica 2.5 mL de la solución A de Ácido Clavulánico, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con la solución de fosfatos a pH 6. Esta solución contiene 100 µg/mL de Ácido Clavulánico.

- **Solución C** de Ácido Clavulánico a concentración de 30 µg/mL.

Medir con pipeta volumétrica 3 mL de la solución B de Ácido Clavulánico, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con la solución de fosfatos a pH 6. Esta solución contiene 30 µg/mL de Ácido Clavulánico.

- **Solución D** de Ácido Clavulánico a concentración de 7.5 µg/mL.

Medir con pipeta volumétrica 2.5 mL de la solución C de Ácido Clavulánico, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con la solución de fosfatos a pH 6. Esta solución contiene 7.5 µg/mL de Ácido Clavulánico.

7.2.1.8 Fase móvil

- **Solución de fosfato monobásico de potasio 0.1 M a pH 2.2**

Pesar 6.8 g de fosfato monobásico de potasio, transferir a un matraz volumétrico de 500 mL, adicionar 400 mL de agua grado Cromatográfico, agitar con ayuda de una parrilla de agitación magnética, medir y ajustar el pH a 2.2 con la solución de ácido fosfórico al 10 %, llevar al aforo con agua.

- **Fase móvil**

Transferir 500 mL de solución de fosfato monobásico de potasio 0.1 M a pH 2.2 a un frasco de 1 litro y adicionar 10.2 mL de acetonitrilo, mezclar. Filtrar a través de una membrana de filtración de 0.45 µ y desgasificar durante 10 minutos.

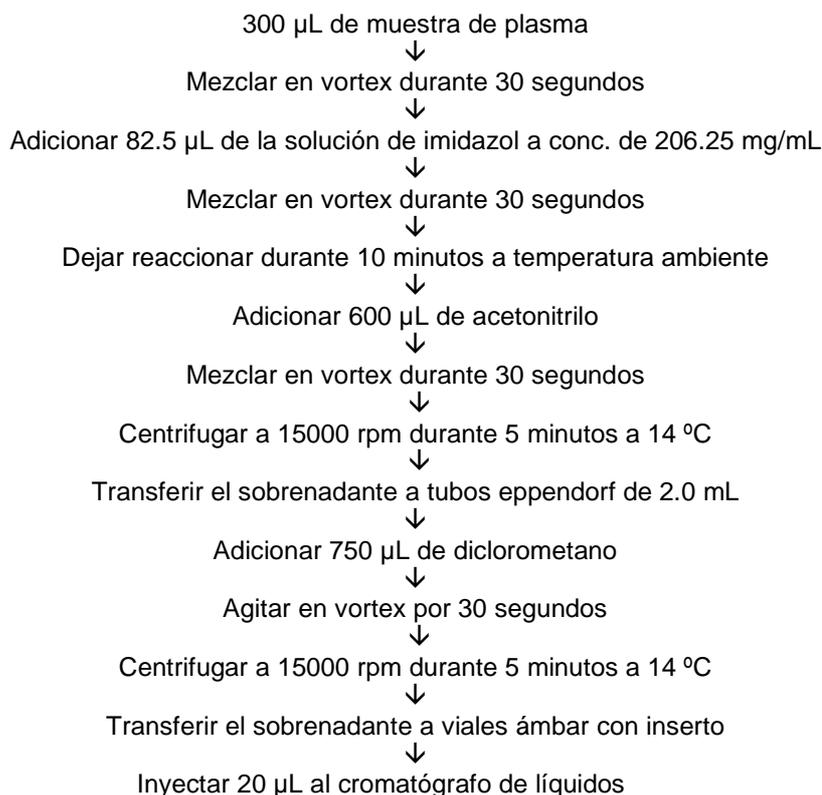
7.2.1.9 Solución de Imidazol

Pesar 8.25 g imidazol, transferirlo a un vaso de precipitados de 100 mL, adicionar 25 mL de agua grado cromatográfico, mezclar para disolver, adicionar 2 mL de ácido clorhídrico 5 M, mezclar. Medir y ajustar el pH a 6.8 con la solución de ácido clorhídrico 5 M. Adicionar el volumen necesario de agua grado Cromatográfico para obtener 40 mL para obtener una concentración de 206.25 mg/mL. Transferir a un frasco schott, sonicar durante 10 min. Almacenar a temperatura ambiente.

7.2.2. Tratamiento de las muestras en plasma

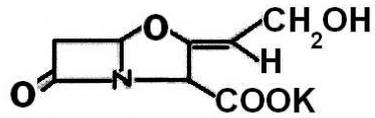
Para las muestras preparadas en Plasma el proceso de extracción será de acuerdo al siguiente diagrama:

DIAGRAMA

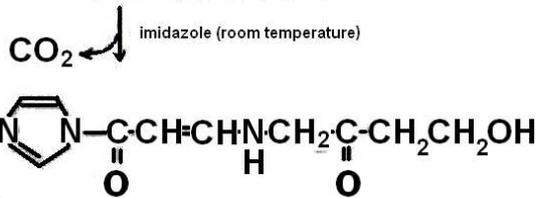


Los detalles de la preparación del sistema cromatográfico, soluciones y muestras para demostrar la eficiencia de éste procedimiento sobre la estabilidad de las muestras procesadas, se encuentra en el anexo 1.

La reacción de derivatización se presenta a continuación ⁽³⁾.



potassium clavulanate

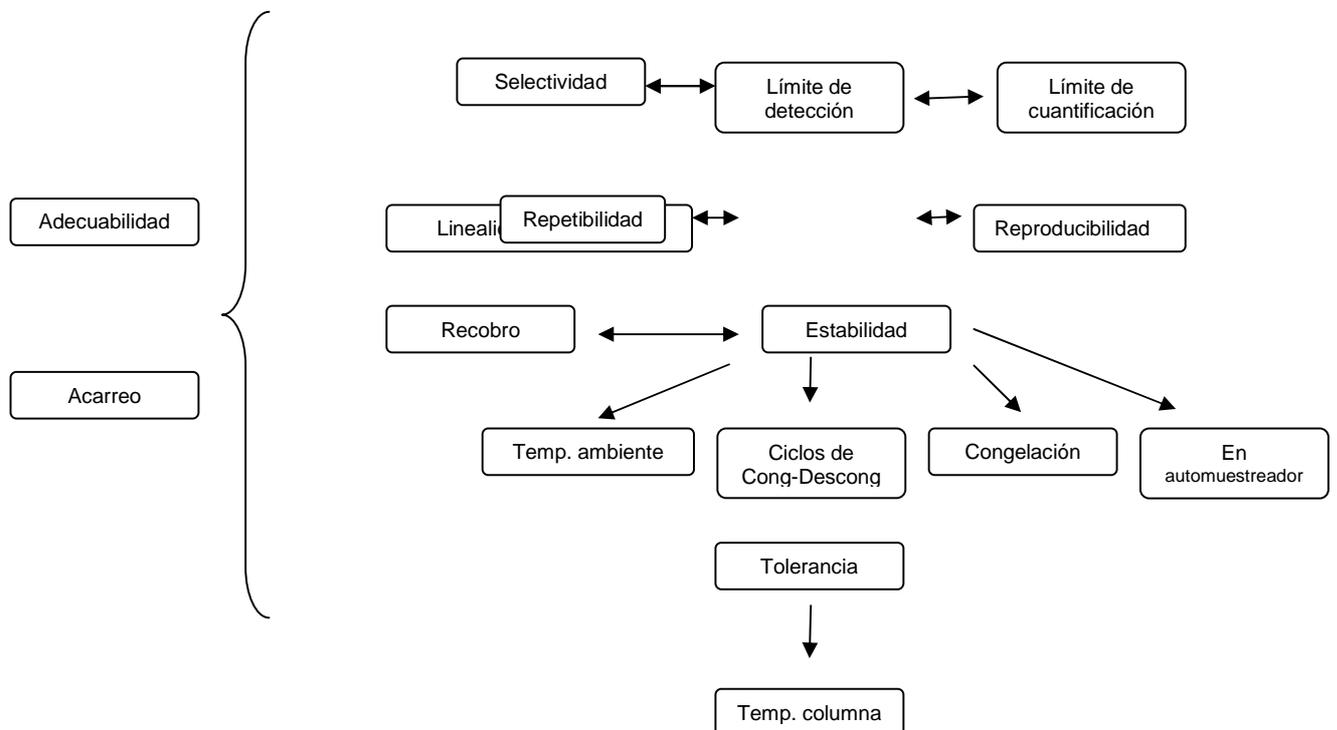


1-(8-hidroxy-6-oxo-4-azaoc-2-enyl)-imidazole

7.3. Validación del método analítico

Por cada día de validación se realizó la prueba de adecuabilidad y acarreo para verificar el buen desempeño del equipo.

A continuación se presenta el diagrama del proceso para la validación del método analítico para cuantificar ácido Clavulánico en plasma



7.3.1. Condiciones Cromatográficas

Columna Cromatográfica	Symmetry Shield RP 18 de 150 X 4.6 mm, 5 μ de tamaño de partícula
Fase móvil:	Solución de fosfatos pH 2.2 : Acetonitrilo (98:2)
Temperatura	25 °C
Velocidad de flujo	0.9 mL/min.
Volumen de inyección	20 μ L
Temperatura del automuestreador	10 °C
Detector	UV/VIS con arreglo de diodos
Longitud de onda	311 nm

Tiempo de retención aprox:

Ácido clavulánico 3.9 min.

7.3.2. Sistema

7.3.2.1. Adecuabilidad del sistema

Con el propósito de demostrar la funcionalidad del sistema empleado para la validación del método analítico, se prepararon muestras de Ácido Clavulánico en solución a una concentración de 3 μ g/mL y se inyectaron series de seis.

La prueba se consideró adecuada ya que cumple con los siguientes criterios de aceptación ⁽³⁴⁾.

- Factor de coeio: ≤ 2
- Número de platos teóricos: ≥ 2000
- Tiempo de retención CV $\leq 2\%$
- Respuesta cromatografica CV $\leq 2\%$

7.3.3. Método

7.3.3.1 Linealidad

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de pesadas independientes considerando las concentraciones de 0.3, 0.75, 1.5, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 μ g/mL de Ácido Clavulánico, se procesaron e inyectaron como se indica en el anexo 1, punto 5 tabla 4). Se graficó el área del pico contra la concentración y para cada curva se determinó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de Determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

7.3.3.2 Repetibilidad del método

El mismo día de trabajo, se evaluó la Repetibilidad Preparando una curva de calibración del método y muestras a concentraciones baja, media y alta cada una por quintuplicado, y se procesaron e inyectaron. Se determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y la exactitud (desviación absoluta) de la concentración recuperada para las cinco determinaciones.

7.3.3.3 Reproducibilidad del método

Se evaluó la reproducibilidad intralaboratorio (un mismo analista en diferentes días). Se preparó durante tres días una curva de calibración y por triplicado durante los tres días las muestras a concentraciones baja, media y alta y se realizó el tratamiento de extracción.

Se calculó por día y al término de los tres días el promedio, la desviación estándar, el porcentaje del coeficiente de variación y la exactitud (desviación absoluta) de la concentración recuperada para las concentraciones baja, media y alta.

7.3.3.4 Recuperación absoluta

Se evaluó, partiendo de una pesada, preparando por quintuplicado las concentraciones baja, media y alta en solución y en plasma.

Se comparó la respuesta cromatográfica (área del pico) obtenida de las muestras procesadas contra la respuesta de las muestras en solución.

Se determinó la relación de el área de Ácido Clavulánico en plasma entre el área de Ácido Clavulánico en solución por 100, para obtener el por ciento recuperado para cada nivel de concentración.

7.3.3.5 Estabilidad

Se evaluaron las muestras a diferentes condiciones de temperatura y tiempo en las cuales el ácido Clavulánico permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la concentración del compuesto en la matriz biológica.

Se realizó la prueba considerando tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) en las siguientes condiciones:

- a. Temperatura ambiente
- b. Automuestreador
- c. Refrigeración (2°C)
- d. Congelación (-70° C)
- e. Ciclos de congelación descongelación (-70° C)

La estabilidad se realizó en las muestras de plasma con el ácido Clavulánico sin procesar.

7.3.3.6 Límite de detección y de cuantificación.

Se evaluaron preparando muestras por quintuplicado a concentración de 0.1 y 0.2 µg/mL, para el límite de detección y de 0.3 µg/mL para el límite de cuantificación, para el primero se determinó la relación de alturas así como la señal del ruido mientras que para el segundo se determinó la concentración recuperada, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

7.3.3.7 Selectividad

Se determinó analizando muestras de fármacos de uso común a concentraciones terapéuticas reportadas (ácido acetil salicílico, paracetamol, cafeína heparina, EDTA y amoxicilina).

7.3.3.8 Tolerancia

Se evaluó la temperatura del termostato de la columna, analizando muestras a concentración baja, media y alta cada una por triplicado. Se inyectaron a condiciones normales del método y posteriormente se modificó la temperatura de la columna un grado hacia arriba y uno hacia abajo.

7.4. Criterios de aceptación de los parámetros de validación ⁽²⁴⁾:

Linealidad	$r^2 \geq 0.98$
Repetibilidad	Exactitud (Desv. Absoluta) $\leq 15\%$ Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 15\%$
Reproducibilidad	Exactitud (Desv. Absoluta) $\leq 15\%$ Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 15\%$
Límite de cuantificación	Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 20\%$
Selectividad	No debe haber interferencias con el pico de interés.
Recuperación absoluta	Exactitud (Desv. Absoluta) $\leq 15\%$ Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 15\%$
Estabilidad	Exactitud (Desv. Absoluta) $\leq 15\%$ Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 15\%$
Tolerancia	Exactitud (Desv. Absoluta) $\leq 15\%$ Porcentaje Coeficiente de variación (% C. V.) $\leq 15\%$

7.5. Estudio de bioequivalencia

Se realizó un estudio prospectivo longitudinal, dosis única, dos tratamientos, dos periodos, cruzado, balanceado, aleatorio y con un periodo de lavado de 72 horas (los detalles del protocolo clínico se presentan en el anexo número 2).

Se determinó el contenido químico de las muestras de 26 voluntarias sanas, en total 832 muestra. Se empleó el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) previamente validado. Se analizaron las muestras de dos voluntarios por día incluyendo ambos periodos. Cada corrida inició con la evaluación de la adecuabilidad del sistema, blanco de sistema, blanco de plasma, la curva de calibración, las muestras control las cuales fueron intercaladas entre las muestras de las voluntarias de manera homogénea.

Los parámetros farmacocinéticos: Concentración máxima (C_{max}), tiempo en el cual se alcanzó esta concentración (T_{max}), y las áreas bajo la curva de 0 a 8 horas (ABC₀₋₈), así como las de 0 a infinito (ABC_{0-∞}) fueron obtenidos de las concentraciones plasmáticas del fármaco contra el tiempo, empleando un modelo no compartimental. Este análisis y las pruebas para la evaluación de la bioequivalencia fueron realizados con el software Winnonlin versión 5.1.

8. RESULTADOS

8.1 Optimización del método analítico

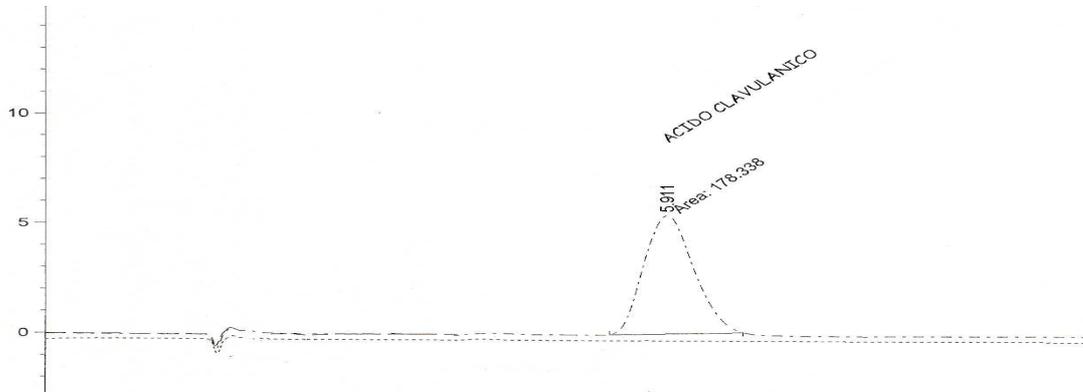
Se realizaron diferentes pruebas para determinar las mejores condiciones para cuantificar el ácido Clavulánico en solución y plasma sin que presentara interferencias el pico del compuesto con el del blanco de plasma y que tuviera un tiempo de retención menor a 5 minutos. Un resumen de lo realizado se presenta en la siguiente tabla.

Número de Prueba	Tratamiento De muestras con Ac. Clavulánico	Columna	Fase móvil	Vol. Inyección μL	Vel. Flujo mL/min.	Longitud de onda nm	Resultados
1	Solución de 10 $\mu\text{g/mL}$ (ACN:Agua (5:95))	X Terra C ₁₈ Temp. 25°C	Fosfato monobásico de sodio monohidratado 0.05 M pH 4 (100 %)	20	0.9	230	No se observan interferencias del blanco con el ácido Clavulánico, pero no se define bien el pico T. ret. 5.9 min.
2	Sol 1 $\mu\text{g/mL}$, 500 μL de sol. De fosfato pH 3.2 ^(*) mezclar 30 seg. Add. 125 μL de imidazol 0.2 $\mu\text{g/mL}$, mezclar 30 seg. Reposar 10 min. Transferir a vial ámbar e Inyectar	X Terra C ₁₈ Temp. 25°C	Fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 3.2 : MeOH (94:6)	20	1.5	311	Presenta interferencia con el blanco de fase móvil. T. ret. 3.1 min.
3	50 μL de la sol. de 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 μL de plasma, 125 μL imidazol 0.2 $\mu\text{g/mL}$, mezclar 30 seg. Adicionar 1 mL de acetonitrilo mezclar. Transferir a vial ámbar e inyectar	X Terra C ₁₈ Temp. 25°C	Fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 3.2 : MeOH (98.5:1.5)	20	1.5	311	El pico del ácido Clavulánico sale muy pegado con el blanco de plasma T. ret. 7.3
4	50 μL de Sol. 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 μL de sol. De fosfato pH 3.2 ^(*) mezclar 30 seg. Add. 125 μL de imidazol 0.2 $\mu\text{g/mL}$, mezclar 30 seg. Reposar 10 min. Add. 1 mL de acetonitrilo, mezclar. Evaporar y reconstituir con sol. Fosfatos pH 3.2. Transferir a vial ámbar e Inyectar	X Terra C ₁₈ Temp. 25°C	Fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 3.2 : ACN(99.2:0.8)	20	1.5	311	No presenta interferencias con el blanco de plasma, pero salen muy ancho el pico.
5	30 μL de Sol. 100 $\mu\text{g/mL}$, Sol. Fosfatos pH 2.2, 87.5 μL de imidazol 0.2 $\mu\text{g/mL}$, mezclar 30 seg. Reaccionar 10 min. Add. 700 μL de ACN, mezclar 30 seg. Add. 875 μL de diclorometano, mezclar 30 seg. Centrifugar a 13000 rpm por 4 min. Transferir el sobrenadante a viales ámbar con inserto e inyectar	Symmetry Shield RP 18 5 μm , 4.6X150 mm Temp. 25°C	Fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 : ACN(98:2)	20	1	311	No se presentan interferencias del blanco con el ácido Clavulánico, T. ret. 3.4
6	30 μL de Sol. 100 $\mu\text{g/mL}$, Sol. Fosfatos pH 2.2, 87.5 μL de imidazol 0.2 $\mu\text{g/mL}$, mezclar 30 seg. Reaccionar 10 min. Add. 700 μL de ACN, mezclar 30 seg. Add. 875 μL de diclorometano, mezclar 30 seg. Centrifugar a 13000rpm por 4 min. Transferir el sobrenadante a viales ámbar con inserto e inyectar. Preparar muestras empleando plasma	Symmetry Shield RP 18 5 μm , 4.6X150 mm Temp. 25°C Termostato automuestreador 10°C	Fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 : ACN(98:2)	20	0.9	311	No se presentan interferencias del blanco con el ácido Clavulánico,

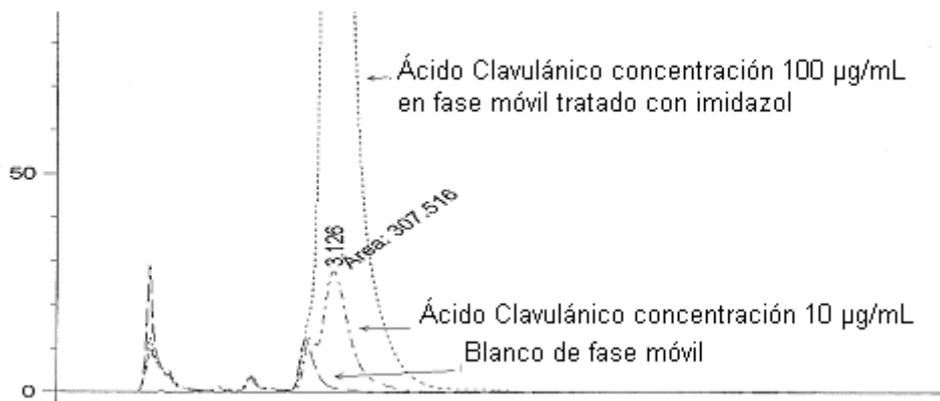
8.1.1 Cromatogramas de la optimización del método

Se enlistan los cromatogramas de acuerdo al número de prueba.

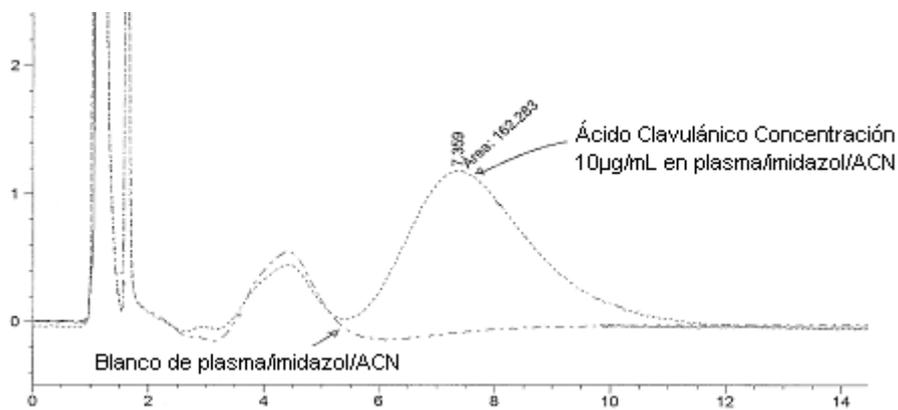
1.



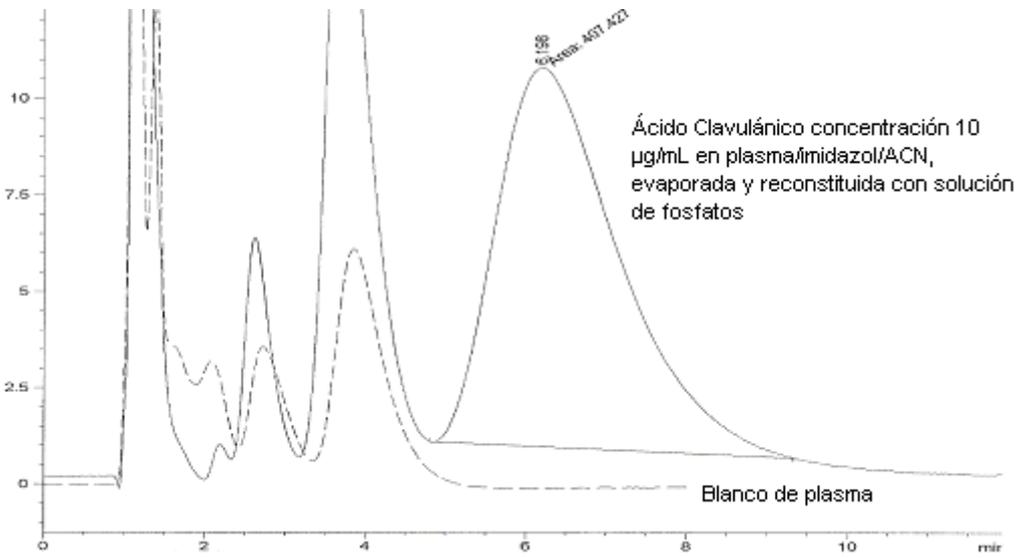
2.



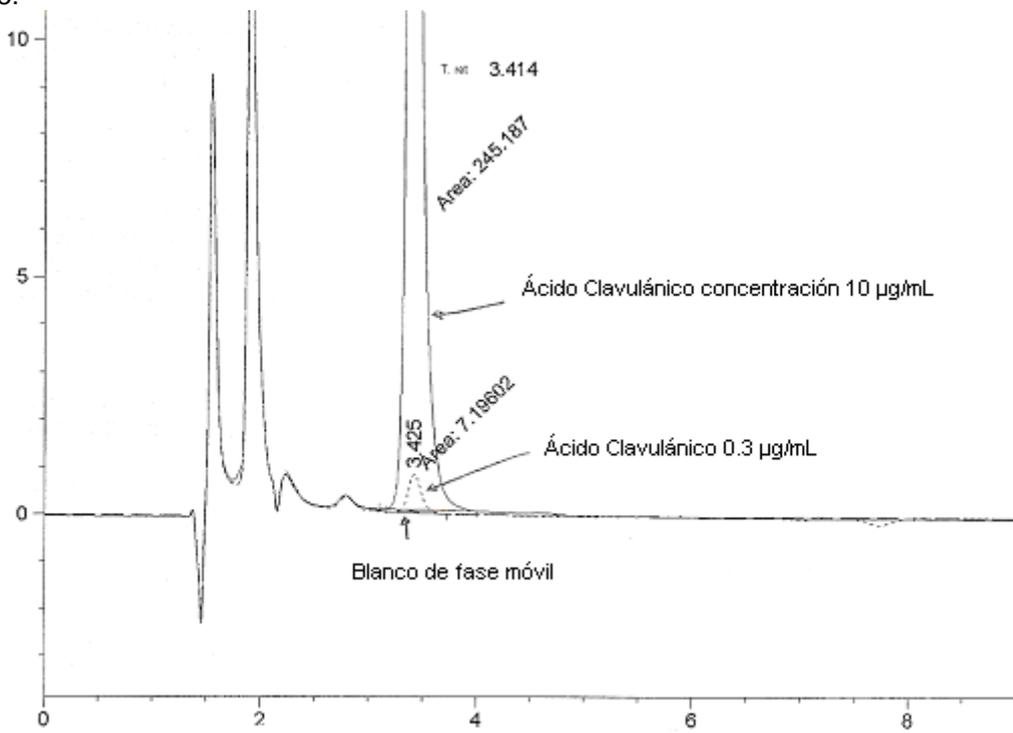
3.



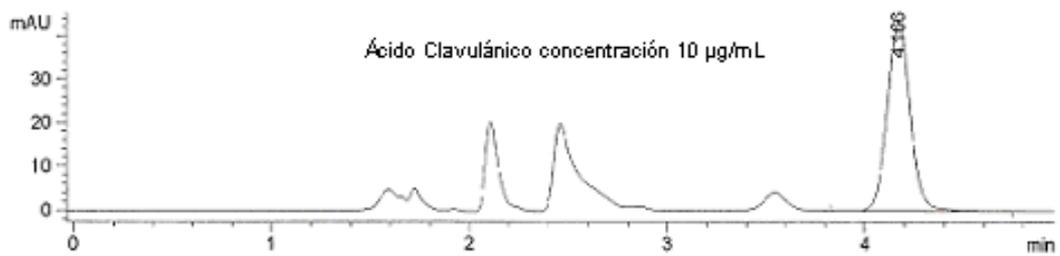
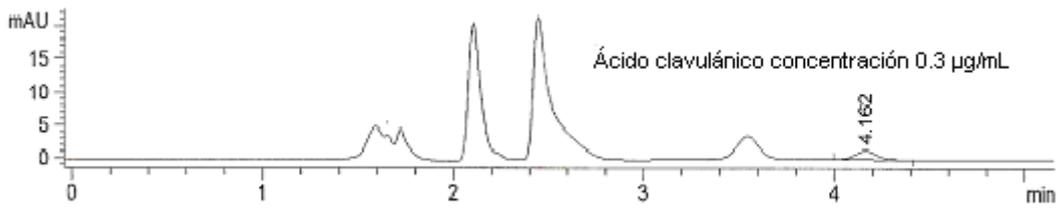
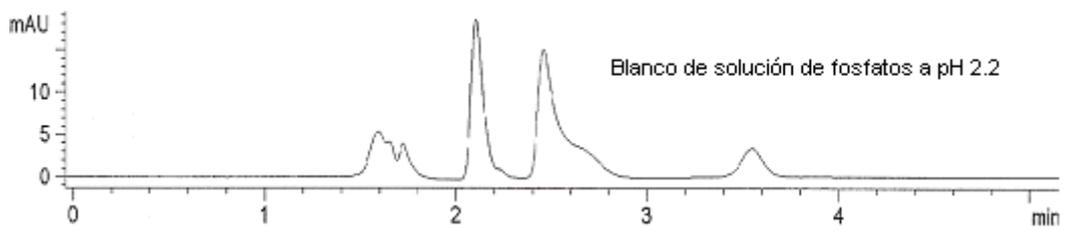
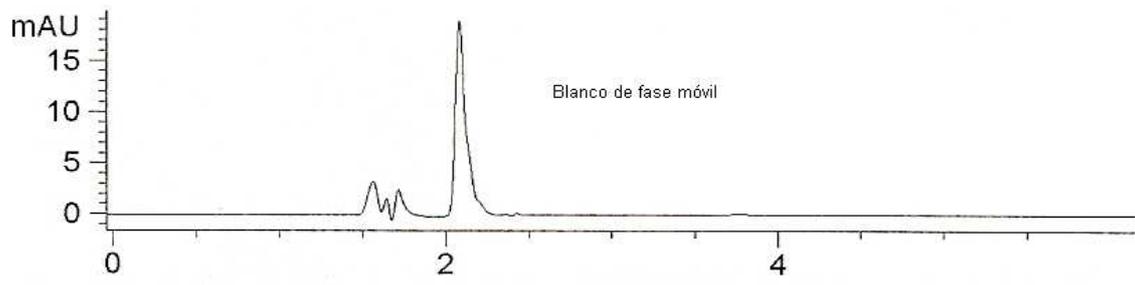
4.



5.



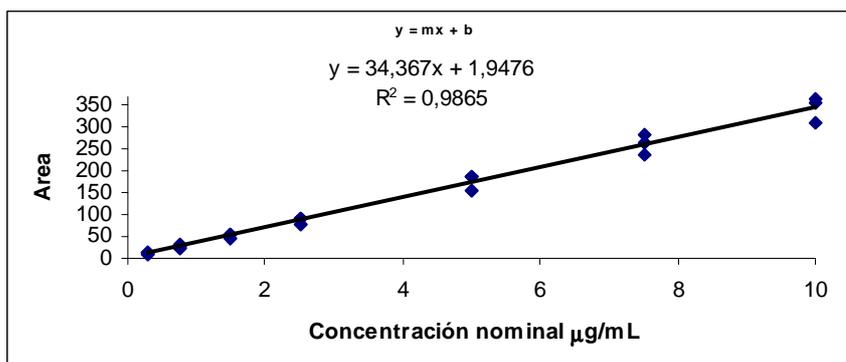
6.



8.2. Validación

8.2.1 Linealidad del método

La siguiente figura muestra la linealidad del método con un intervalo de concentraciones de 0.3 a 10 µg/mL, con un coeficiente de correlación promedio de 0.9932, lo que indica que la relación matemática entre concentración y respuesta es continua dentro del intervalo de trabajo.



En la siguiente tabla se presentan los valores de las concentraciones de las tres curvas preparadas en plasma para evaluar la linealidad del método, observando que el C. V. varía entre 0,21 y 9,34 %, lo que demuestra que la relación matemática es reproducible.

CONC. NOMINAL (µg/mL)	AREA	Conc. Obtenida µg/mL	Promedio	Desv. estándar	C.V
0,3	9,9773	0,289	0,270	0,0252	9,34
	11,8602	0,242			
	11,8035	0,280			
0,75	24,1528	0,747	0,761	0,0559	7,34
	32,3077	0,822			
	27,8189	0,713			
1,5	47,5036	1,502	1,472	0,0289	1,97
	54,1959	1,444			
	55,7349	1,469			
2,5	78,1689	2,492	2,491	0,0052	0,21
	90,8372	2,485			
	93,6169	2,495			
5	155,6926	4,997	5,058	0,0527	1,04
	185,0391	5,090			
	189,324	5,086			
7,5	235,4774	7,574	7,538	0,1490	1,98
	262,9913	7,374			
	284,6076	7,665			
10	308,974	9,948	9,938	0,0906	0,91
	356,2509	10,023			
	365,0198	9,842			

r=	0,9932
b=	1,9476
m=	34,3673
r ² =	0,9865

Por lo anterior y de acuerdo a los criterios establecidos, la linealidad del método para la cuantificación de Ácido Clavulánico en plasma es lineal dentro del intervalo de 0.3 a 10 µg/mL.

8.2.2 Repetibilidad

A continuación se presentan los resultados de la Repetibilidad del método obtenidas al evaluar por quintuplicado cinco muestras a concentraciones baja, media y alta de ác. Clavulánico en plasma.

CONC. NOMINAL (µg/mL)	AREA	CONC. RECUPERADA (µg/mL)	PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C. V.	EXACTITUD
0,60	21,4327	0,56	0,56	0,0085	1,51	6,66
	21,7128	0,57				
	20,8598	0,55				
	21,3971	0,56				
	21,2235	0,56				
4,00	144,9890	3,89	3,90	0,0287	0,74	2,58
	145,1046	3,89				
	144,0479	3,86				
	146,9724	3,94				
	145,0133	3,89				
8,00	293,6028	7,89	7,86	0,0795	1,01	1,79
	295,0587	7,93				
	287,4405	7,73				
	293,5290	7,89				
	291,6559	7,84				

Los resultados obtenidos muestran un coeficiente de variación menor o igual a 1,51 % demostrando que el método es repetible, mientras que la desviación absoluta (exactitud) es menor o igual al 6.76% indicando que el método es exacto ya que cumple con los criterios indicados en la normatividad vigente.

8.2.3 Reproducibilidad

En las siguientes tablas se muestran los resultados de la reproducibilidad del método para cuantificar ácido Clavulánico para el analista 1 y el analista 2. Se presentan los resultados promedio para cada día y por analista, evaluando la variación de ambos expresada como C. V.

ANALISTA 1

CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)			PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C. V.	EXACTITUD
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3				
0,60	0,57	0,52	0,54	0,54	0,0318	5,87	9,68
	0,58	0,51	0,53				
	0,59	0,50	0,54				
4,00	4,10	4,01	3,92	4,00	0,0805	2,01	0,01
	4,07	3,97	3,90				
	4,08	4,06	3,89				
8,00	8,04	8,19	7,71	7,97	0,2026	2,54	0,32
	8,00	8,14	7,78				
	7,92	8,25	7,74				

ANALISTA 2

CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)			PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C. V.	EXACTITUD
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3				
0,60	0,569	0,588	0,579	0,577	0,0091	1,58	3,75
	0,570	0,584	0,576				
	0,562	0,588	0,582				
4,00	4,020	3,964	3,886	3,956	0,0430	1,09	1,10
	3,933	3,997	3,980				
	3,909	3,979	3,938				
8,00	8,072	7,953	7,881	7,973	0,0706	0,89	0,33
	8,062	7,914	7,940				
	8,033	7,905	7,999				

ANALISTA 1 y 2 Durante 3 días.

		DIA 1	DÍA 2	DÍA 3	PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C.V.	EXACTITUD
CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)				
ANALISTA 1	0,60	0,57	0,52	0,54	0,56	0,0292	5,21	7,20
		0,58	0,51	0,53				
		0,59	0,50	0,54				
ANALISTA 2		0,57	0,59	0,58				
		0,57	0,58	0,58				
		0,56	0,59	0,58				
ANALISTA 1	4,00	4,10	4,01	3,92	3,98	0,0665	1,67	0,56
		4,07	3,97	3,90				
		4,08	4,06	3,89				
ANALISTA 2		4,02	3,96	3,89				
		3,93	4,00	3,98				
		3,91	3,98	3,94				
ANALISTA 1	8,00	8,04	8,19	7,71	7,97	0,1472	1,85	0,33
		8,00	8,14	7,78				
		7,92	8,25	7,74				
ANALISTA 2		8,07	7,95	7,88				
		8,06	7,91	7,94				
		8,03	7,91	8,00				

Los resultados muestran coeficientes de variación menores o igual a 5.87 % por analista y en promedio menor o igual a 5.21 %, y la desviación absoluta por analista y promedio presenta un valor menor o igual a 9.68 %, por lo que de acuerdo a los criterios establecidos el método fue reproducible y exacto.

8.2.4 Límite de cuantificación

En la siguiente tabla se muestran los resultados para la concentración empleada como límite de cuantificación.

CONC. NOMINAL (µg/mL)	AREA	CONC. RECUPERADA (µg/mL)	PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C. V.
0,3	9,6792	0,26	0,26	0,003	1,05
	9,5084	0,26			
	9,6685	0,26			
	9,7887	0,27			
	9,6583	0,26			

Se observa un coeficiente de variación menor al 20 %.

8.2.5 Límite de detección

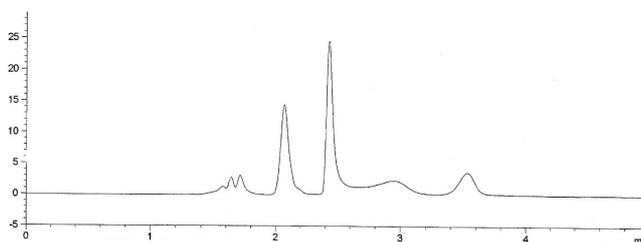
Se determinó un límite de detección de 0.1 µg/mL

8.2.6 Selectividad

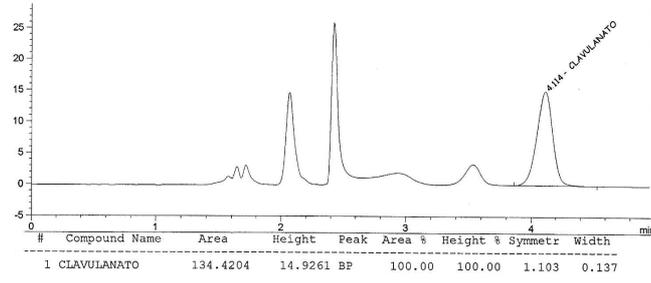
Se cargaron muestras de plasma con ácido acetil salicílico, paracetamol, cafeína, heparina, EDTA y amoxicilina se procesaron y se inyectaron al cromatógrafo de líquidos, no se observaron interferencias que interfirieran con el pico de interés, por lo cual el método se consideró selectivo para la cuantificación de ácido Clavulánico.

Cromatogramas

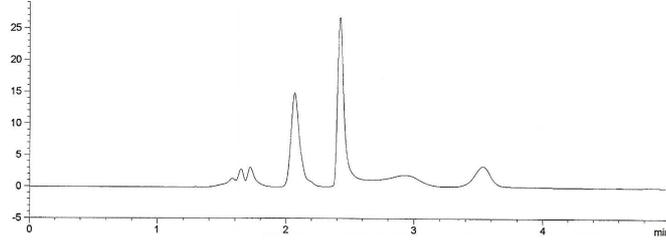
a. Blanco de plasma



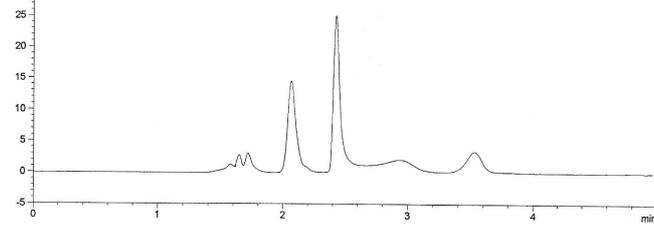
b. Plasma con Ac. Clavulánico



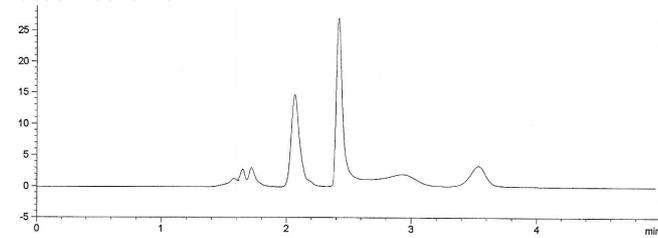
b. Plasma con ácido acetilsalicílico



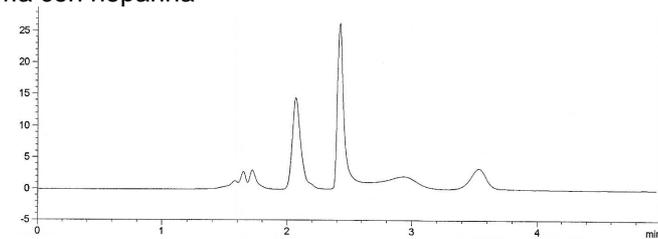
c. Plasma con paracetamol



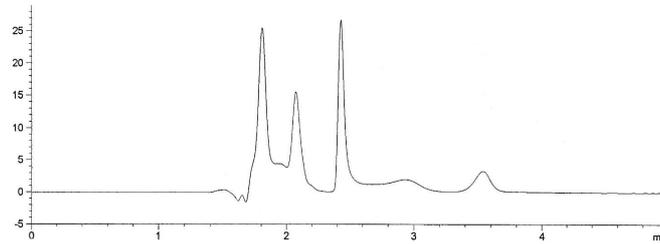
d. Plasma con cafeína



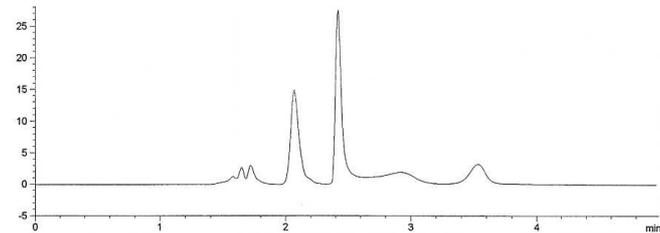
e. Plasma con heparina



f. Plasma con EDTA



g. Plasma con Amoxicilina



8.2.7 Recuperación absoluta

En la siguiente tabla se muestra el por ciento de recobro obtenido para ácido Clavulánico en plasma. Se observa que el porcentaje recuperado promedio estuvo entre el 55.49 y 57.56 %. De acuerdo a las especificaciones el porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100 %, pero debe ser consistente y reproducible en cada nivel de concentración.

CONC. NOMINAL ($\mu\text{g/mL}$)	AREA METODO	AREA EN SOLUCION	PORCIENTO RECUPERADO	PROMEDIO	DESV. ESTANDAR	% C. V.
0,60	21,4327	38,0182	56,37	55,49	0,8019	1,45
	21,7128	38,9414	55,76			
	20,8598	38,0548	54,82			
	21,3971	38,1944	56,02			
	21,2235	38,9421	54,50			
4,00	144,9890	252,3054	57,47	57,56	0,4252	0,74
	145,1046	252,7577	57,41			
	144,0479	252,1052	57,14			
	146,9724	252,2111	58,27			
	145,0133	252,2170	57,50			
8,00	293,6028	511,2757	57,43	57,05	0,8069	1,41
	295,0587	508,7191	58,00			
	287,4405	514,8831	55,83			
	293,5290	513,3422	57,18			
	291,6559	513,1607	56,84			
PROMEDIO				56,70	1,12	1,97

8.2.8 Estabilidad

8.2.8.1 Estabilidad a temperatura ambiente

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la estabilidad a temperatura ambiente para muestras de plasma más el activo, las cuales permanecieron en la mesa de trabajo durante 24 horas. Transcurridas la 24 horas, las muestras fueron procesadas e inyectadas, obteniendo un coeficiente de variación menor al 15 %, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas cargadas con clavulanato son estables a temperatura ambiente durante 24 horas.

CONC. NOMINAL (ng/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)		PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C.V.	EXACTITUD
	INICIAL	24 HORAS				
0,60	0,53	0,48	0,50	0,0406	8,05	5,38
4,00	3,90	3,30	3,60	0,4263	11,83	7,72
8,00	7,74	7,15	7,44	0,4199	5,64	3,84

8.2.8.2 Estabilidad en automuestreador

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la estabilidad en el automuestreador para muestras procesadas, las cuales permanecieron en el automuestreador a 10° C por 24 horas. Las muestras procesadas fueron inyectadas a las 24 horas, obteniendo un coeficiente de variación menor al 15 %, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas cargadas con clavulanato son estables procesadas y mantenidas en el automuestreador a 10 °C por 24 horas.

CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)		PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C.V.	EXACTITUD
	INICIAL	24 HORAS				
0,60	0,53	0,56	0,54	0,0153	2,81	4,06
4,00	3,90	4,08	3,99	0,1271	3,18	4,61
8,00	7,74	8,55	8,14	0,5700	7,00	10,41

8.2.8.3 Estabilidad en refrigeración

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la estabilidad para muestras de plasma más el clavulanato, las cuales fueron almacenadas en refrigeración a 3° C. Transcurridas 24 horas de almacenamiento, se procesaron y analizaron, obteniendo un coeficiente de variación menor al 15 %, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas cargadas con clavulanato son estables en refrigeración hasta por 24 horas.

CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)		PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C.V.	EXACTITUD
	INICIAL	24 HORAS				
0,60	0,53	0,59	0,56	0,0427	7,58	11,32
4,00	3,90	4,23	4,07	0,2303	5,66	8,34
8,00	7,74	8,67	8,20	0,6564	8,00	11,99

8.2.8.4 Estabilidad en congelación

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la estabilidad para muestras de plasma más clavulanato, las cuales fueron almacenadas en congelación a -70°C .

Al cumplirse los 30, 63 y 91 días de almacenamiento, las muestras fueron procesadas y analizadas, obteniendo un coeficiente de variación menor al 15 %, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas cargadas con clavulanato son estables en congelación a -70°C hasta por 91 días.

CONC. NOMINAL ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)				PROMEDIO CONC. RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)	DESV. ESTANDAR	% C. V.	EXACTITUD
	INICIAL	30 DÍAS	63 DÍAS	91 días				
0,60	0,53	0,53	0,54	0,47	0,51	0,0372	7,27	3,95
4,00	3,90	3,48	3,76	3,32	3,52	0,2239	6,36	9,82
8,00	7,74	6,95	7,47	6,68	7,03	0,4026	5,72	9,12

8.2.8.5 Ciclos de congelación descongelación

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la estabilidad para muestras cargadas con clavulanato, las cuales fueron almacenadas en congelación a -70°C y se realizó el proceso de congelación descongelación procesando cada vez una serie de muestras control para cubrir 3 ciclos.

Las muestras fueron analizadas para cada ciclo, obteniendo un coeficiente de variación menor al 15 %, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas cargadas con clavulanato son estables al menos durante tres ciclos de congelación descongelación.

CONC. NOMINAL ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)				PROMEDIO CONC. RECUPERADA ($\mu\text{g/mL}$)	DESV. ESTANDAR	% C.V	EXACTITUD
	INICIAL	CICLO 1	CICLO 2	CICLO 3				
0,60	0,58	0,53	0,55	0,51	0,53	0,0224	4,21	8,03
4,00	4,15	3,74	3,70	3,33	3,59	0,2226	6,20	13,51
8,00	8,15	7,54	7,47	6,61	7,21	0,5161	7,16	11,56

8.2.8.6 Tolerancia a la temperatura de la columna

En la siguiente tabla se muestran los resultados al variar la temperatura de la columna. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentran por debajo del 15 % indicando que el método es tolerante al cambio en la temperatura de la columna.

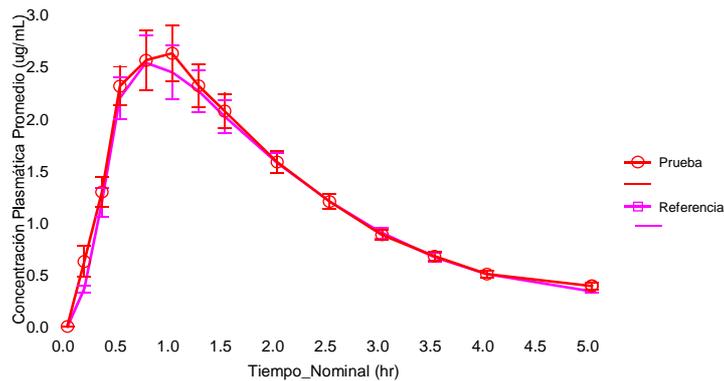
CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. RECUPERADA (µg/mL)			PROMEDIO CONC. RECUPERADA (µg/mL)	DESV. ESTANDAR	% C.V	EXACTITUD
	INICIAL	Temperatura de columna a 24 °C	Temperatura de columna a 26 °C				
0,60	0,53	0,55	0,56	0,55	0,0067	1,21	7,61
4,00	3,90	4,00	4,00	4,00	0,0015	0,04	0,09
8,00	7,74	8,14	8,27	8,21	0,0910	1,11	2,61

8.3 Estudio de bioequivalencia

Los parámetros farmacocinéticos promedio derivados de las curvas plasmáticas concentración contra tiempo tanto del producto de prueba como de referencia se presentan en las siguientes gráficas.

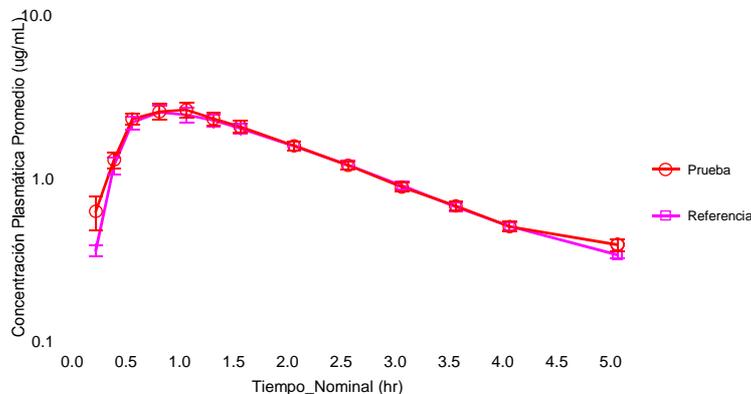
Concentración plasmática promedio de Ác. Clavulánico (±EE) vs. Tiempo, después de la administración de ambas formulaciones.

Perfil Comparativo Promedio de dos Formulaciones orales de Ác. Clavulánico



Logaritmo natural (Ln) de la concentración plasmática promedio de Ácido clavulánico (±EE) vs tiempo, después de la administración de ambas formulaciones.

Perfil Comparativo Promedio de dos Formulaciones orales de Ác. Clavulánico (Escala semilogarítmica)



Estadística descriptiva promedio de los parámetros farmacocinéticos (T_{máx}, C_{máx}, ABC_{0-t}, ABC inf, y Ke), de Ác. Clavulánico para el producto de Prueba (B).

Formulación		Tmax (h)	Cmax (µg/ml)	ABC 0-t (h*µg/ml)	ABC 0-inf (h*µg/ml)	Ke (h)
PRUEBA	N	26	26	26	26	26
	Media	1.163	2.897	5.648	6.340	1.094
	Desv. Est.	0.616	1.236	2.002	1.992	0.189
	Error Est.	0.121	0.242	0.393	0.391	0.037
	Min	0.75	1.13	2.74	3.30	0.70
	Mediana	1.00	2.94	5.17	5.65	1.06
	Max	3.00	5.04	10.69	11.37	1.52
	CV%	53.0	42.7	35.4	31.4	17.3
	Media Log	0.0514	0.9700	1.6729	1.8011	0.0750
	Desv. Est. Log	0.4240	0.4520	0.3478	0.3072	0.1749

Estadística descriptiva promedio de los parámetros farmacocinéticos (T_{máx}, C_{máx}, ABC_{0-t}, ABC inf, y Ke), de Ác. Clavulánico para el producto de Referencia (A).

Formulación		Tmax (h)	Cmax (µg/ml)	ABC 0-t (h*µg/ml)	ABC 0-inf (h*µg/ml)	Ke (h)
REFERENCIA	N	26	26	26	26	26
	Media	1.135	2.711	5.463	6.189	1.122
	Desv. Est.	0.575	1.176	1.930	1.896	0.209
	Error Est.	0.113	0.231	0.379	0.372	0.041
	Min	0.50	1.00	2.59	3.85	0.85
	Mediana	1.00	2.59	4.95	5.58	1.09
	Max	2.50	5.60	10.29	11.05	1.75
	CV%	50.7	43.4	35.3	30.6	18.7
	Media Log	0.0263	0.9071	1.6404	1.7809	0.0995
	Desv. Est. Log	0.4339	0.4382	0.3455	0.2905	0.1744

Intervalos de Confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos transformados logarítmicamente (Ác. Clavulánico)

Parámetro Farmacocinético	Intervalo de Confianza Clásico		Intervalo de Confianza de Westlake		T doble unilateral de Shuirmann		Prueba de Anderson Hauck	Potencia
	CI_90 Inferior	CI_90 Superior	WL_90 Inferior	WL_90 Superior	Prob<80.0	Prob>125.0		
Ln (Tmax)	93.91	111.96	89.96	110.04	0.0000	0.0004	0.0003	0.9927
Ln (Cmax)	99.03	114.53	87.37	112.63	0.0000	0.0005	0.0005	0.9992
Ln (ABC 0-t)	96.25	110.88	90.84	109.16	0.0000	0.0001	0.0001	0.9994
Ln (ABC 0-inf)	96.77	107.59	93.61	106.39	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
Ln (Ke)	90.09	105.71	91.34	108.66	0.0001	0.0000	0.0001	0.9974
Criterio	> 80	< 125	> 80	< 125	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.8

9. DISCUSIÓN

El método alternativo descrito aquí es similar en algunas etapas a otros métodos previamente publicados. Sin embargo, esos métodos requieren el empleo de detectores de masas y el laboratorio no contaba con este equipo. El proceso de desnaturalización de proteínas con acetonitrilo fue empleado, pero este no fue suficiente para obtener cromatogramas limpios, por lo que se empleó un solvente de extracción como es el diclorometano. La etapa de extracción en este trabajo fue suficiente para los fines deseados y además mostró consistencia de recuperación a través de los diferentes niveles de concentración empleados. El ambiente de trabajo bajo luz roja evitó la degradación del activo.

El método alternativo propuesto presentó ventajas sobre las técnicas analíticas mencionadas anteriormente (Hozey; 2002 ⁽²⁾, Foulstone; 1982 ⁽³⁾, Yoon;2004 ⁽⁴⁾), ya que permitió analizar muestras con la confiabilidad que se requiere para ser aplicado a un estudio de bioequivalencia.

Respecto a la Bioequivalencia. Las medias geométricas del producto de prueba sobre el producto de referencia (suspensión de 675 mg de ácido clavulánico) de los parámetros: C_{max}, ABC_{0-t}, ABC_{0-inf} y sus intervalos de confianza al 90 % quedaron comprendidas dentro de los límites de 80-125 %. La prueba doble t de Shurman corroboró que no se excedieron éstos límites. Además la potencia estadística para estos parámetros no fue menor a 0.80.

Todos estos requerimientos marcados por la NOM-177, para considerar a los productos como genéricos intercambiables, fueron cumplidos.

10. CONCLUSIONES

Partiendo de las referencias (Hozey; 2002 ⁽²⁾, Foulstone; 1982 ⁽³⁾, Yoon;2004 ⁽⁴⁾), se optimizó un método para cuantificar ácido clavulánico en plasma por CLAR, logrando una mayor estabilidad en las muestras procesadas, que permite analizar un número suficiente, de manera confiable y lo hace útil para emplearse en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

El método analítico desarrollado, se validó y mostró los siguientes parámetros de ejecución:

Lineal, exacto, preciso, estable, y capaz de detectar concentraciones de ácido Clavulánico en pequeños volúmenes de plasma humano, lo que hace que este método sea confiable dentro de las condiciones experimentales del estudio.

El estudio de bioequivalencia evidenció, que los productos probados: suspensiones conteniendo ácido Clavulánico, fueron bioequivalentes con respecto al grado y velocidad de absorción, ya que cumplen con los requisitos marcados por la regulación mexicana y por lo tanto pueden considerarse como intercambiables.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
ACN	Acetonitrilo
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
$ABC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada al infinito
ABC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t.
b	Ordenada al origen
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución (en inglés HPLC)
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
Conc.	Concentración
C.V	Coefficiente de variación
Desv.	Desviación
Desv. Est.	Desviación estándar
Desv. Est. Log.	Desviación estándar logarítmica
E.E	Error estándar
±	Más, menos
Error est.	Error estándar
Ke	Constante de eliminación
Ln	Logaritmo natural
Media Log.	Media logarítmica
Min.	Minutos
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
mL	Mililitros
m	Pendiente
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
hr	Hora
Prom.	Promedio
r	Coefficiente de regresión
T _{max}	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima

12. ANEXOS

Anexo 1 Condiciones del método analítico

1. Solución para adecuabilidad del sistema.

Preparar una muestra de concentración media (4µg/mL) a partir de la solución B de Ácido Clavulánico (100 µg/mL), como lo muestra la siguiente tabla:

Tabla 1 Preparación de la adecuabilidad del sistema

MUESTRA	µL utilizados de la Soln. B de 100 µg/mL	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	Concentración (µg/mL)
MEDIA	12	18	300	4

Adicionar 82.5 µL de la solución de imidazol, mezclar en vortex durante 30 segundos y dejar reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, adicionar 600 µL de acetonitrilo y mezclar durante 30 segundos en vortex, adicionar 750 µL de diclorometano, mezclar en vortex durante 30 segundos y centrifugar a 15000 rpm por 5 minutos a 14 °C. Transferir el sobrenadante a viales ámbar con inserto e inyectar 20 µL al cromatógrafo de líquidos.

2. Blanco de sistema.

Medir 330 µL de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6, adicionar 82.5 µL de la solución de imidazol, mezclar en vortex durante 30 segundos y dejar reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, adicionar 600 µL de acetonitrilo y mezclar durante 30 segundos en vortex, adicionar 750 µL de diclorometano, mezclar en vortex durante 30 segundos y centrifugar a 15000 rpm por 5 minutos a 14 °C. Transferir a viales ámbar con inserto e inyectar 20 µL al cromatógrafo de líquidos

3. Muestras a concentración baja, media y alta en solución.

Preparar las muestras a concentración baja, media y alta en solución como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 2 Preparación de las muestras en solución

CONCENTRACIONES BAJA, MEDIA Y ALTA EN SOLUCIÓN					
CONCENTRACIÓN	µL utilizados de la Soln. B de 100 µg/mL	µL utilizados de la Soln. D de 7.5 µg/mL	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	Concentración
BAJA	—	24	6	300	0.6 µg/ml
MEDIA	12	—	18	300	4 µg/ml
ALTA	24	—	6	300	8 µg/ml

Adicionar 82.5 µL de la solución de imidazol, mezclar en vortex durante 30 segundos y dejar reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, adicionar 600 µL de acetonitrilo y mezclar durante 30 segundos en vortex, adicionar 750 µL de diclorometano, mezclar en vortex durante 30

segundos y centrifugar a 15000 rpm por 5 minutos a 14 °C. Transferir a viales ámbar con inserto e inyectar 20 µL al cromatógrafo de líquidos.

4. Curva de calibración.

Preparar la curva de calibración como se indica en la siguiente tabla

Tabla 3 Preparación de la curva de calibración

LINEALIDAD DEL MÉTODO						
MUESTRA	µL de solución B (100 µg/mL)	µL de solución C (30 µg/mL)	µL de solución D (7.5 µg/mL)	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	µL de plasma	Concentración (µg/mL)
LM 1	—	—	12	18	300	0.3
LM 2	—	—	30	—	300	0.75
LM 3	—	15	—	15	300	1.5
LM 4	—	25	—	5	300	2.5
LM 5	15	—	—	15	300	5.0
LM 6	22.5	—	—	7.5	300	7.5
LM 7	30	—	—	—	300	10.0

5. Muestras a concentración baja, media y alta en plasma.

Preparar las muestras a concentración baja, media y alta como indica la siguiente tabla

Tabla 4 Preparación de las muestras a concentración baja, media y alta en plasma

CONCENTRACIONES BAJA, MEDIA Y ALTA DEL MÉTODO					
Concentración	µL de solución B (100 µg/mL)	µL de solución D (7.5 µg/mL)	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	µL de plasma	Concentración Ácido □lavulánico (µg/mL)
BAJA	—	24	35	300	0.6
MEDIA	12	—	27.5	300	4.0
ALTA	24	—	7.5	300	8.0

6. Preparación de las muestras para el límite de detección y cuantificación.

Preparar muestras para evaluar los límites de detección y de cuantificación como indica la siguiente tabla.

Tabla 5 Límite de detección y cuantificación

CONCENTRACIONES PARA LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN				
Concentración	µL de solución D (7.5 µg/mL)	µL utilizados de la Soln. Amortiguadora de fosfatos pH 6	µL de plasma	Concentración (µg/mL)
L. cuantificación	12	90	300	0.3
L. detección	8	22	300	0.2
L. detección	4	24	300	0.1

7. Blanco de plasma

Medir 30 µL de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6, transferir a un tubo eppendorf de 2.0 mL, adicionar 300 µL de plasma y mezclar en vortex durante 30 segundos.

ANEXO 2 Diseño Clínico para el estudio de Bioequivalencia

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, simple ciego, de dosis única por periodo, con dos formulaciones, dos tratamientos, dos periodos, balanceado, con distribución al azar de las dos posibles secuencias, con un periodo de eliminación del fármaco de 48 horas y con un número de 26 voluntarias.

La descripción de los dos tipos de tratamiento es la siguiente:

Fármaco A. Producto de referencia: Amoxicilina/ácido Clavulánico, suspensión pediátrica, administradas por vía oral.

Fármaco B. Producto de prueba: Amoxicilina/ácido Clavulánico, suspensión, administradas por vía oral.

Los dos productos fueron proporcionados por el patrocinador.

Los tratamientos fueron administrados bajo el siguiente código:

Tratamiento A: Fármaco A. Producto de referencia.

Tratamiento B: Fármaco B. Producto de prueba.

En forma aleatoria, las voluntarias sanas fueron distribuidas en 2 grupos de tratamiento (A y B):

Grupo A. Recibió 10 mL de amoxicilina/ácido Clavulánico suspensión de 250 mg/62.5 mg/5 mL, administrados por vía oral, producto de referencia en el primer periodo y en el segundo periodo recibió 10 mL de amoxicilina/ácido Clavulánico suspensión de 250 mg/62.5 mg/5 mL, administrados por vía oral, producto de prueba.

Grupo B. Recibió 10 mL de amoxicilina/ácido Clavulánico suspensión de 250 mg/62.5 mg/5 mL, administrados por vía oral, producto de prueba en el primer periodo y en el segundo periodo recibió 10 mL de amoxicilina/ácido Clavulánico suspensión de 250 mg/62.5 mg/5 mL, administrados por vía oral, producto de referencia.

La dosis administrada por voluntaria y por periodo fue de 500 mg/125 mg/10 mL de amoxicilina/ácido Clavulánico suspensión.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. R. Yogev, C. Melick, W. J. Kabat. In vitro and in Vivo Synergism Between Amoxicillin and Clavulanic Acid Against Ampicillin Resistant *Haemophilus influenzae* Type b. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981; 19 (6): 993-996.
2. Hozey G, Lamiable D, Frances C, Trenque T, Kaltenbach M, Denis J, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *J. Pharm. Biom Anal.* 2002; 30: 661-666.
3. Foulstone M, Reading CH. Assay of amoxicillin and Clavulanic Acid, the Components of Augmentin, in Biological Fluids with High-Performance Liquid Chromatography. *Antim. Ag. Chem.* 1982 Nov; 753-762.
4. Yoon K-H, Lee S-Y, Kim W, Park J-S, Kim H-J. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 2004; 813 (1-2): 121-127.
5. Reading. C. Cole M. Clavulanic acid: a betalactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977; 11: 852-857.
6. Sweetman S. C. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Martindale. España: Pharma editores; 2003. p. 296.
7. FEUM 8a. Ed. SSA México 2004. p. 942.
8. O' Neil, Smith A, Heckelman PE, et al. The Merck index. 30ª ed. USA. 2001. p. 408, 409.
9. The United States Pharmacopeial Convention USP 30. NF 25 Edición anual en español. Convención de la farmacopea de los EUA. US Pharmacopoeia. 2007; V. 1, p. 1907, V. 2, p. 842.
10. Summary of product characteristics [Consulta: 21 de mayo 2008] <http://www.vmd.gov.uk/espcsite/Documents/159870.DOC>
11. Petri WA. Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Limbird LE and Goodman A. The pharmacological basis of therapeutics. 10ª ed. United States of America: McGraw-Hill; 2001. p. 1189-1218.
12. Katzung BG. Farmacología básica y Clínica. 7ª ed. México D. F. El manual moderno; 1999: p. 843, 849.
13. Rodríguez PC, Rodríguez PA, Servin HD. Farmacología Clínica. México D. F. Mc Graw-Hill; 2005: p. 378.
14. Thummel KE, Shen DD. Design and optimization of dosage regimens; pharmacokinetic data. In: Hardman JG, Limbird LE and Goodman A. The pharmacological basis of therapeutics. 10ª ed. United States of America: McGraw-Hill; 2001. p. 1917-2023.
15. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Thomson PLM. DEF. ed. 48. México D.F: Ediciones PLM; 2002: p. 104-106, 181,182.
16. Gómez GJL. Inhibidores de betalactamasas En: Alarcón CT, Alonso MMA, Garau AJ, Gómez GJL, Gudiol MF, López-Brea CM, et al. Modulo 5. Antibioticos. Criterios de uso racional y guía práctica terapéutica (II) p. 41-63. [Consulta: 22 abril 2008] Disponible en: www.sepeap.es/libros/antibioticos/7.pdf.
17. Figueroa DR, Ortiz IFJ. Parte XVI. Fármacos de otras especialidades En: Uriarte BV, Trejo FCSS. Farmacología Clínica. México D. F. Trillas; 2003: p. 1048.
18. Vree TB, Dammers E and Exler PS. Identical pattern of highly variable absorption of clavulanic acid from four different oral formulations of co-amoxiclav in healthy subjects. *The Br Soc Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 373-378.
19. United States Pharmacopeial Convention. Drug Information for the Health Care Professional. Penicillins and Beta-Lactamase Inhibitors Systemic. En: United States Pharmacopeial Convention, eds. 19 ed. Englewood: Micromedex, Inc.; 1999. pp. 2263-8.
20. Arteta JM, Rosado MC, Puig RA, García DF, Gómez CA. Hepatitis colestática aguda secundaria a amoxicilina-ácido Clavulánico. *Farmacía Hospitalaria.* 2001; 25 (5):306-309.

21. McNair H M, Esquivel H B. Cromatografía líquida de alta presión. Serie de química, monografía No. 10. USA: 1980. p.1-46.
22. Johnson E L, Stevenson R. Basic liquid Chromatography. Varian Associates. USA: 1978. p. 4-13.
23. McNair H, Polite L. Curso de HPLC, Ciudad Universitaria, UNAM ABC; D.F. Noviembre 2001, México ; p I.1-Xb.5
24. NOM 177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realcen las pruebas. Diario Oficial de la federación. Tomo DXLVIII No. 4. Mayo de 1999. p. 44-67.
25. Flores MFJ, Castañeda HG, Medina SR. Biodisponibilidad y bioequivalencia en los medicamentos genéricos. Ed. Asclepius, Edo. de México. 2002. p. 40-45.
26. Shah VP, Midha KK, Shikant D, McGilveray IJ, SKelly JP, Yacobi A et al. Analytical Methods Validation : Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. Pharm Res, 1992; (4): 588-59.
27. Braggio S, Barnaby R, Grossa P, Cugola M. A strategy for validation of binalytical methods. J. Pharm. Biom. Anal. 1996; 14: 375-388.
28. Guideline for submitting simples and analytical data for methods validation, Food and Drug Administration Center for Drugs and Biologics Dep. Of Health and Human Services. February 1987.
29. Johnson JD, Van Buskirk G E. Analytical method validation J. Validation Tech. 1996; 2 (2):88-105.
30. Castillo AB, González HR. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev. Cubana Farm. 1997; 30(1).
31. Estévez CFE. Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos. Rev. Med. Uruguay. 2000; 16:133-143.
32. Guía para la industria. Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente – consideraciones generales.Dpto de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Administración de Alimentos y Medicamentos Centro de evaluación e Investigación de Fármacos (CDER). Octubre 2000.Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
33. Khalil alkhamis. Pharm PK Discusión-Clavulanate Assay. [Consulta: 16 agosto 2005] Disponible en: <http://www.boomer.org/pkin/PK00/PK2000049.html>.
34. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. Edición 2002.