



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE IOHEXOL EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

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

PRESENTA

LUZ XOCHIQUETZALLI VÁSQUEZ BOCHM



MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ALFREDO RAFAEL GARZÓN SERRA

VOCAL: INÉS FUENTES NORIEGA

SECRETARIO: MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO

1ER SUPLENTE: ALEJANDRO ORTÍZ OSORNIO

2º SUPLENTE: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

LUGAR EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Medicina Genómica

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Isabel Ruiz Olmedo _____

SUSTENTANTE:

Luz Xochiquetzalli Vásquez Bochm _____

Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar
en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein
(1879-1955)

AGRADECIMIENTOS

Con la emoción de llegar a cumplir este objetivo me gustaría dejar constancia de mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que de una u otra forma han ayudado a que esto se hiciera realidad.

A mis papás que me han apoyado incondicionalmente en este camino, que me han brindado su amor y comprensión, que se preocupan y hacen todo lo que está en sus manos para que yo salga adelante, porque para mí ustedes son lo mejor. MUCHAS GRACIAS. Por toda la mantequilla donada durante estos años, por todos los curitas que me han ayudado a colocar, por todas las horas invertidas, aunque estas hayan sido en el gran tráfico de esta ciudad, por enseñarme a cuidar de mi misma a pesar de seguirse preocupando tanto por todo lo que pueda pasar y por la confianza depositada la cual espero nunca defraudar.

A mi hermano: Tnks for check check my homework, por esas idas al estadio, por ser ese acompañante que faltaba, por tantas alegrías y enojos, por ser mi hermano y dejar de serlo, por cuidarme y echarte peleas cuando no debías, por estar ahí para mí, espero que sepas que aquí estaré SIEMPRE para lo que necesites.

GRACIAS a ti por todo, por el interminable tiempo por la falta de él, por las largas y hermosas charlas ya fuera en persona o por teléfono. Por las ausencias, por los detalles, por cada uno de los momentos compartidos que nos han ayudado a crecer y ser más fuertes. Por el apoyo y las palabras exactas en los momentos oportunos. Por los silencios cuando solo necesitaba un hombro. ANIMO, MUCHO ÁNIMO.

Issa gracias por todo, desde los conocimientos y gran ayuda prestada, hasta los fines de semana y experiencias compartidas, por ser quien eres, por encontrar todo lo que fue necesario para que esto se lograra, por las llamadas de atención y las expresiones de alegría, eres una excelente profesora pero eres una mejor persona a la cual me alegro mucho de haber conocido.

A mi familia por su apoyo, consejos, aplausos y rostros de orgullo, la convivencia, reuniones, juegos, ejercicios y demás momentos que me ayudaron a crecer como persona a formarme un criterio y aprender a diferenciar lo que estaba bien de lo que estaba mal, a mi abuelito, abuelitas, tíos, tías, primos, primas GRACIAS por todas y cada una de las experiencias que dejaron en mi vida y que me ayudaron a ser quien soy en este momento. GRACIAS EQUIPO

A **TODOS** mis amigos y amigas, a los que actualmente aún puedo decirles así, a los que sé que alguna vez lo fueron. A todos aquellos a los que al marcarles muestran una gran alegría; por las reuniones instantáneas a las que nadie podía asistir y a las que al final todos llegan. Por el fútbol y el Básquet, por el esfuerzo, sudor, triunfos y derrotas, por esas caídas, aplausos y porras, por el compañerismo, amistad, horas de estudio frente a la computadora haciendo preguntas una a otra, por la gran ayuda en todos los semestres, buenos consejos, es más hasta por los malos porque hasta de esos hay que aprender. Por ayudarme a terminar esta carrera, por imprimir el esfuerzo que faltaba y la práctica que siempre llegaba en la madrugada, por cada uno de los pequeños y grandes detalles que me acompañaron a lo largo de mi vida en la facultad y que me ayudaron en esta larga y ardua carrera que a la vez y gracias a ustedes ha sido una de las mejores etapas de mi vida.

Al Dr. Juan Pablo y al personal del INMEGEN porque aparte de darme una parte de su tiempo y preocuparse por ayudarme a que este trabajo se realizará me brindaron su amistad y apoyo incondicional.

A todas aquellas personas y amigos que no solo me ayudaron en la cuestión académica sino también en la vida, y tal vez no se hayan encontrado incluidos en los párrafos anteriores no es verdad, si me acuerdo de ustedes (especialmente a los del INP e IFaB) simplemente que esto ya era muy largo, muchas gracias.

A la UNAM y en particular a la FACULTAD DE QUÍMICA porque es gracias a sus profesores y enseñanzas que he logrado formarme como profesionista y como persona para servir y ayudar a mi país y mi universidad con mis conocimientos y proyectos. Espero algún día poder regresar por lo menos una pequeña parte de todo lo que me ha brindado.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITÚ

Luz X. Vásquez Bochm

ÍNDICE GENERAL

CÁPITULO	PÁGINA
Índice general	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
3. GENERALIDADES	4
3.1. Enfermedad renal crónica	4
3.1.1. Consideraciones generales	4
3.1.2. Manifestaciones clínicas	4
3.1.3. Tratamiento	5
3.2. Monografía del iohexol	5
3.2.1. Propiedades fisicoquímicas	5
3.2.2. Propiedades farmacológicas	7
3.2.2.1. Propiedades farmacocinéticas	7
3.2.2.2. Propiedades farmacodinámicas	7
3.2.2.3. Régimen de dosificación	7
3.2.2.4. Reacciones adversas	8
3.3. Estudios de iohexol	9
3.4. Condiciones analíticas reportadas	10
3.5. Fundamentos de cromatografía	11
3.5.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	11
3.5.2. Instrumentación	12
3.6. Validación de métodos analíticos	14
3.6.1. Parámetros de validación	14
4. PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1. Reactivos material y equipos	17
4.2. Preparación de soluciones de trabajo	18
4.3. Preparación de las soluciones estándar, adecuación del sistema, curva de calibración y puntos control de iohexol	19
4.4. Método de precipitación de proteínas	21
4.5. Condiciones cromatográficas	22
4.6. Validación del método analítico para la cuantificación de iohexol en plasma	23
4.6.1. Rango de trabajo	24
4.6.2. Recuperación absoluta	24
4.6.3. Linealidad	25
4.6.4. Precisión	26
4.6.4.1. Repetibilidad (precisión intradía)	26

CÁPITULO	PÁGINA
4.6.4.2. Reproducibilidad (precisión intradías)	26
4.6.5. Exactitud	26
4.6.6. Estabilidad	27
4.6.6.1. Estabilidad a corto plazo	27
4.6.6.2. Estabilidad a largo plazo	28
4.6.7. Límite de cuantificación	28
4.6.8. Límite de detección	29
4.6.9. Selectividad	29
4.7. Validación en suero	30
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	31
5.1. Desarrollo del método analítico	31
5.2. Validación del método analítico	36
5.2.1. Adecuabilidad del sistema	36
5.2.2. Recuperación absoluta	37
5.2.3. Linealidad	39
5.2.4. Precisión y exactitud	41
5.2.5. Estabilidad	45
5.2.5.1. Estabilidad a corto plazo	45
5.2.5.2. Estabilidad a largo plazo	47
5.2.6. Límite de cuantificación	48
5.2.7. Límite de detección	49
5.2.8. Selectividad	50
5.3. Validación en suero	52
5.3.1. Selectividad	52
5.3.2. Linealidad	52
5.3.3. Precisión y exactitud	54
6. CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO	NOMBRE	PÁGINA
Tabla 1.	Métodos analíticos para la cuantificación de iohexol.	10
Tabla 2.	Parámetros de validación.	15
Tabla 3.	Preparación de las soluciones de la curva de calibración en plasma.	20
Tabla 4.	Preparación de los puntos control en plasma.	20
Tabla 5.	Gradiente de la fase móvil.	23
Tabla 6.	Ensayo de diferentes agentes precipitantes.	32
Tabla 7.	Adecuabilidad del sistema (n=5).	36
Tabla 8.	Recobro absoluto del primer isómero del iohexol.	37
Tabla 9.	Recobro absoluto del segundo isómero del iohexol.	38
Tabla 10.	Recobro absoluto del estándar interno.	39
Tabla 11.	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para el primer isómero del iohexol en plasma.	40
Tabla 12.	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para el segundo isómero del iohexol en plasma.	41
Tabla 13.	Linealidad. Concentraciones cuantificadas del primer isómero del iohexol en plasma.	41
Tabla 14.	Linealidad. Concentraciones cuantificadas del segundo isómero del iohexol en plasma.	41
Tabla 15.	Precisión del método analítico para la cuantificación del primer isómero de iohexol en plasma.	42
Tabla 16.	Precisión del método analítico para la cuantificación del segundo isómero de iohexol en plasma.	43
Tabla 17.	Exactitud del método analítico para la cuantificación del primer isómero de iohexol en plasma.	44
Tabla 18.	Exactitud del método analítico para la cuantificación del segundo isómero de iohexol en plasma.	44
Tabla 19.	Estabilidad a temperatura ambiente.	45
Tabla 20.	Estabilidad de la muestra procesada.	46
Tabla 21.	Estabilidad después de 3 ciclos de congelación y descongelación.	47
Tabla 22.	Estabilidad a largo plazo.	48
Tabla 23.	Límite de cuantificación.	49
Tabla 24.	Límite de detección.	49
Tabla 25.	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para los isómeros del iohexol en suero.	53
Tabla 26.	Linealidad. Concentraciones cuantificadas de iohexol en suero.	53

NÚMERO	NOMBRE	PÁGINA
Tabla 27.	Precisión del método analítico para la cuantificación del primer isómero del iohexol en suero.	54
Tabla 28.	Precisión del método analítico para la cuantificación del segundo isómero del iohexol en suero.	55
Tabla 29.	Exactitud del método analítico para la cuantificación del primer isómero del iohexol en suero.	55
Tabla 30.	Exactitud del método analítico para la cuantificación del segundo isómero del iohexol en suero	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
Figura 1.	Estructura química del iohexol.	6
Figura 2.	Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.	12
Figura 3.	Método de precipitación de proteínas.	22
Figura 4.	Estructuras de los diferentes compuestos evaluados como estándar interno.	33
Figura 5.	Cromatograma típico de una solución de 140 µg/mL de iohexol (PCM) y 20 µg/mL amiodarona.	34
Figura 6.	Cromatograma típico de una solución de 1 µg/mL de naproxeno y 1 µg/mL de diclofenaco.	35
Figura 7.	Cromatograma típico de una muestra en solución a 140 µg/mL de iohexol y 48 µg/mL de naproxeno.	36
Figura 8.	Linealidad del método analítico para la cuantificación de los isómeros del iohexol en plasma de 10 a 1000 µg/mL.	40
Figura 9.	Evaluación de selectividad. Cromatograma de un blanco de suero (A) y un blanco de plasma (B).	50
Figura 10.	Evaluación de selectividad. Fármacos de uso común. Cromatograma de cafeína (A), ácido salicílico (B), diclofenaco (C) y paracetamol (D).	51
Figura 11.	Evaluación de selectividad. Cromatogramas de muestras lipídica (A) y hemolizada (B).	52
Figura 12.	Linealidad del método analítico para la cuantificación de los isómeros del iohexol en suero de 10 a 1000 µg/mL.	53

INTRODUCCIÓN

La determinación del índice de filtración glomerular (GFR) juega un papel importante en la práctica nefrológica actualmente, debido a que es crucial para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (ERC) o para evaluar el riesgo de desarrollarla. En México dicha enfermedad ocupa el noveno lugar en mortalidad (INEGI, 2005), es por ello que es necesario la selección de un marcador para determinar el GFR, este debe ser una sustancia que pueda filtrarse de forma libre, no se absorba ni se secrete en los túbulos, además debe ser atóxica y no metabolizarse en ninguna parte del cuerpo (Cavalier y cols., 2008).

La inulina un polímero de la fructuosa cumple con estos requisitos, por lo que es denominada como el “estándar de oro”, sin embargo, su aplicación es compleja y costosa; debido a esto es más comúnmente utilizada la creatinina, a pesar de presentar ciertas desventajas como son: el ser secretada y absorbida en los túbulos, así como no ser específica a bajas concentraciones, en pacientes con obesidad, anorexia o con algún otro desorden que afecte la masa muscular (Stevens y cols., 2009).

Es por ello que recientemente en nuestro sistema de salud ha sido necesaria la búsqueda incesante de elementos y medios que permitan la precisión requerida para la medición de la función renal, de tal forma que se pueda obtener una buena correlación del deterioro funcional y la realidad clínica del paciente.

Una de las posibles alternativas que ya es utilizada en diferentes países europeos son los marcadores radiológicos no iónicos, como el iohexol, el cual cuenta con las

características del marcador ideal, ya que presenta mínimas reacciones adversas, costo accesible y fácil administración (Soman y cols., 2005).

Debido a lo anteriormente expuesto y dado que en el hospital Juárez de la Ciudad de México no se cuenta con un método analítico validado que asegure la cuantificación de los niveles de iohexol en plasma y suero, se llevó a cabo el presente proyecto cuyos objetivos fueron los siguientes:

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de iohexol en plasma y suero humano por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV.

ESPECIFICOS

- Encontrar las condiciones cromatográficas y de extracción para la cuantificación de iohexol en plasma y suero.
- Validar el método analítico según los parámetros indicados en la NOM-177-SSA1-1998 vigente en nuestro país.

GENERALIDADES

3.1. Enfermedad renal crónica

3.1.1. Consideraciones generales

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las afecciones de mayor interés a nivel mundial dado que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En México, ocupa el noveno lugar en mortalidad (INEGI, 2005), sin embargo se ha calculado que hoy en día 8.3 millones de personas presentan una insuficiencia renal leve, y que la mayoría de ellas no está consciente de la situación, debido a que no presentan ningún síntoma hasta que la enfermedad alcanza un progreso significativo. Como consecuencia cada vez es mayor la necesidad de recurrir a procedimientos de diálisis, hemodiálisis o en su defecto al trasplante renal, por lo que el costo, tanto del grupo familiar como para los planes de salud y la seguridad social es extremadamente elevado (Inserra y cols., 2007).

La principal característica de este padecimiento es el deterioro progresivo e irreversible de la función renal, el cual se caracteriza por la presencia de un índice de filtración glomerular (GFR) menor a 60 mL/1.73 m² durante un periodo de tres meses y/o la presencia de daño renal diagnosticado por proteinuria o anomalías anatómicas (Francisco y cols., 2007).

3.1.2. Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la ERC se desarrollan a menudo con lentitud y son inespecíficos, debido a esto las personas permanecen asintomáticas hasta que la insuficiencia renal ya esté muy avanzada (GFR <10 a 15 mL/min.). El cuadro fundamental está

conformado por sensación de malestar general, fatiga, debilidad, dolor de cabeza, picazón generalizada, pérdida de peso, dolor óseo y sed excesiva. Por lo general son frecuentes los síntomas gastrointestinales y los problemas neurológicos. En escasas ocasiones se presentan síntomas generados por toxicidad farmacológica, estos son provocados por los agentes eliminados por vía renal ya que se acentúan conforme se deteriora la depuración renal (McPhee y cols., 2006).

3.1.3. Tratamiento

El tratamiento en primera instancia es denominado como conservador, y consiste en evitar complicaciones, prever secuelas a largo plazo y ralentizar en la medida de lo posible la progresión del daño renal. Esto se lleva a cabo mediante un control dietético, en el que deben formularse recomendaciones específicas acerca del consumo de proteína, sal, potasio y fósforo, además de fármacos que reduzcan el trabajo renal, un control de la presión arterial y la reducción de la proteinuria.

Cuando el tratamiento conservador es insuficiente, la alternativa es el tratamiento sustitutivo, en la actualidad existen tres que son: hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante renal (Mezzano y cols. 2005).

3.2. Monografía del iohexol

3.2.1. Propiedades fisicoquímicas

El iohexol es un polvo blanco con peso molecular de 821.14 g/mol, es estable a temperatura ambiente y sensible a la luz. Se prepara mediante una alquilación. Su nombre químico es 5-(acetil-(2,3-dihidroxi)propil) amino)-N,N'-bis(2,3-

dihidroxi-propil)- 2,4,6-triiodobencil-1,3-dicarboxamida y su fórmula molecular es $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$ (figura 1). Este compuesto es soluble en agua y metanol. Presenta un valor de pKa de 11.3.

Los nombres comerciales de los productos en los que se encuentra este principio activo son: Exypaque, Histodenz, Nycodenz y Omnipaque.

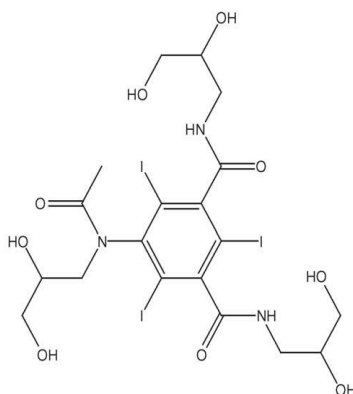


Figura 1. Estructura química del iohexol.

El iohexol contiene varios centros potenciales de isomería derivados de los D, L hidroxil alquilo, los sustituyentes de la amida, el nitrógeno de la anilida alquilada y el nitrógeno de la anilida acetilada. Dado que estas mezclas son inevitables, deben considerarse como una entidad farmacológica.

Los más representativos son los endo-/exo- isómeros N-acetilados debido a que son cristalizables por disolventes alcohólicos y pueden ser identificados por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y resonancia magnética nuclear (Foster y cols., 1988).

3.2.2. Propiedades farmacológicas

3.2.2.1. Propiedades farmacocinéticas

Presenta una unión a proteínas menor al uno por ciento y casi el 100% se elimina sin metabolizar en la orina después de 24 horas de una administración intravenosa (Miyagawa y cols. 2010). La vida media de eliminación es de aproximadamente 2 horas en pacientes con función renal normal. El iohexol no es reabsorbido, metabolizado o secretado por el riñón (Schwartz y cols. 2009).

Después de una administración intravenosa de iohexol en dosis de 500 mg/kg y 1500 mg/kg a 16 voluntarios adultos se reportó una depuración renal de 120 mL/min y un volumen de distribución de 165 mL/kg (FDA, 2010).

3.2.2.2 Propiedades farmacodinámicas

Pertenece al grupo farmacoterapéutico de los medios de contraste para rayos X de baja osmolaridad, hidrosolubles y nefrotrópicos.

Se ha observado que la mayoría de los parámetros hemodinámicos, bioquímicos y de coagulación evaluados después de la inyección intravenosa de iohexol en voluntarios sanos, no presentan desviaciones significativas respecto a los valores obtenidos antes de la administración. Los pocos cambios observados en los parámetros de laboratorio fueron menores y sin importancia clínica (Essential drug information, 2006).

3.2.2.3. Régimen de dosificación

En la determinación de la tasa de filtración glomerular para adultos la dosis recomendada es de 10 mL (647 mg/mL de iohexol) vía intravenosa (Soman y

cols., 2005) y para niños de 5 mL (Schwartz y cols., 2006).

3.2.2.4 Reacciones adversas

La incidencia de una nefrotoxicidad aguda debido al iohexol es 66% menor que con otros agentes iónicos (Rudnick y cols., 1995). En un estudio realizado en los Estados Unidos a pacientes a los que se les inyectó un medio de contraste yodado no iónico entre los años 1999 y 2005 arrojó que las reacciones de hipersensibilidad son raras y habitualmente se presentan en forma de síntomas respiratorios o cutáneos ligeros como disnea, erupción, eritema, urticaria, prurito y angioedema, además solo el 0.6% de la población presentó algún tipo de reacción alérgica, de los cuales las reacciones leves representaron el 77% y las moderadas el 21%, también se confirmó que rara vez se desarrollan secuelas importantes a largo plazo (Wang y cols., 2008). En cuanto a la administración concomitante con otros fármacos se sabe que presenta interacción con la amiodarona incrementando el riesgo de cardiotoxicidad y arritmias (DrugBank, 2010).

Por otro lado al compararlo con los medios de contraste convencionales iónicos y con los nuevos agentes no iónicos en una variedad de modelos animales, se ha documentado que el iohexol tiene una toxicidad menor. Al realizar la prueba de Ames se comprobó que no es genotóxico, además al administrar dosis de hasta 4 g/kg en ratas no se ve afectada la fertilidad de ratas machos o hembras (Shaw y cols., 1985). La dosis letal 50 evaluada para OMNIPAQUE es de 24.2 g/kg en ratón y de 15.0 g/kg en ratas (FDA, 2010).

3.3 Estudios de iohexol

Rocco y cols. (1996) encontraron que existe una alta correlación (90-95%) entre el iohexol y el iotalamato al ser utilizados como marcadores en la determinación del GFR. En el mismo artículo dicho grupo reportó haber desarrollado una técnica por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ajustando los resultados a un modelo de un compartimento farmacocinético, que de una manera simple puede evaluar el GFR en pacientes con diversos grados de insuficiencia renal.

Dichos resultados fueron confirmados por Gaspari y cols. en 1998 al realizar un estudio semejante del análisis del GFR con iohexol, obteniendo como resultados una buena precisión en la estimación de la GFR en pacientes con función renal normal y en diferentes grados de disfunción renal, además de corroborar que el género del paciente no afecta la medición.

Soman y colaboradores (2005) se sumaron al uso de dicho compuesto al desarrollar y validar un método para la determinación de iohexol en plasma. Este se realizó mediante la administración de 10 mL de Omnipaque (647 mg/mL de iohexol) vía intravenosa a 24 pacientes de trasplante renal. Se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 7 horas. La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) del iohexol fue de 483.1 ± 108.9 $\mu\text{g/mL}$ y el tiempo para alcanzar la concentración máxima del fármaco ($T_{m\acute{a}x}$) fue de 15 min. La concentración mínima ($C_{m\grave{i}n}$) encontrada fue de 123.5 ± 61.1 $\mu\text{g/mL}$ al cuantificarlo a las 7 horas.

Estudios realizados en niños por Schwartz y cols. (2006) para determinar si el iohexol era un correcto marcador de la GFR al compararlo con la creatinina, consistió en la administración el iohexol por vía intravenosa, las muestras

sanguíneas fueron recolectadas a los 10, 20, 30, 60, 120, 240, 300 y 360 min; las muestras de orina se recolectaron durante cuatro tiempos. La medición en plasma presenta una correcta correlación del GFR, en cambio la correlación en la prueba de orina es pobre y presenta poca precisión.

3.4 Condiciones analíticas reportadas

Existen a la fecha varios métodos reportados en revistas internacionales para la cuantificación de iohexol los cuales utilizan cromatografía de líquidos en la tabla 1 se presenta un resumen de los mismos.

Tabla 1. Métodos analíticos para la cuantificación de iohexol.

Método	Método de extracción	Matriz biológica	CONDICIONES CROMATÓGRAFICAS
CLAR/UV (Cavalier y cols., 2008)	Ácido perclórico 5%	Suero y orina humano	Lichrospher C ₁₈ (250 x 4mm) 5µm λ=254nm, vol. inyección: 20 µL Temperatura: 40 °C Fase móvil= Agua: ACN (95:5 v/v) ajustado a pH=3 con ácido orto fosfórico. Flujo= 1 mL/min
CLAR/UV (Edelson y cols., 1982)	Precipitación con distintos disolventes	Plasma, orina y heces de humano	Spherisorb ODS Excalibur (250 x 4.6mm) 5µm λ=254nm, vol. inyección: 100 µL Fase móvil= Metanol: Sol. de fosfato de sodio 0.01M pH=7.4 (96:4 v/v). Flujo= 1.75 mL/min
CLAR/UV (Farthing y cols., 2005)	Agua con 0.1% TFA	Plasma y orina humano	Supleco Discovery C ₁₈ (250 x 4mm) 5µm λ=254nm, vol. inyección: 10 µL Temperatura: 40°C Fase móvil= Gradiente de TFA en agua (pH=2.2) y metanol. Flujo= 1 mL/min
CLAR/UV (Soman y cols., 2005)	Ácido perclórico 5%	Plasma humano	µBondpack C ₁₈ (250 x 4mm) 5µm λ=254nm, vol. inyección: 90 µL Temperatura: 30°C Fase móvil= Gradiente de agua y ACN. Flujo= 0.8 -1.2 mL/min
CLAR-MS/MS (Lee y cols., 2006)	ZnSO ₄	Suero	Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (100 x 2.1mm) 3.5µm λ=254nm, vol. inyección: 10 µL Temperatura: 45°C Fase móvil= Gradiente de sol. de acetato de amonio 2mM + 0.1% de ácido fórmico en agua y sol. de acetato de amonio 2mM + 0.1% de ácido fórmico en metanol. Flujo= 0.4 mL/min

3.5 Fundamentos de cromatografía

La cromatografía es una técnica que nos permite separar, identificar y cuantificar componentes de una mezcla de compuestos químicos. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada fase estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada fase móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación (Rouessac, 2003).

Existen tres tipos de cromatografía: líquidos, gases y fluidos supercríticos (Skoog y cols., 2001).

3.5.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

En esta cromatografía el analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. Los solventes más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada o soluciones amortiguadoras con líquidos orgánicos, para mejorar la separación de los componentes. También se usan algunos ácidos como el ácido trifluoroacético (TFA) para actuar como formador de pares iónicos.

Existen cuatro tipos básicos de cromatografía en los que la fase móvil es un líquido:

Cromatografía de fase normal: se usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar que se usa cuando el analito es polar.

Cromatografía de fase reversa: se usa una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar.

Cromatografía de exclusión: separa las partículas en función del tamaño. Es una cromatografía de baja resolución.

Cromatografía de intercambio iónico: la retención está basada en la atracción entre iones del soluto y la carga complementaria de la fase estacionaria. Si los iones del soluto y la fase estacionaria tienen la misma carga, son excluidos.

3.5.2 Instrumentación

El cromatógrafo de líquidos consiste básicamente de un sistema de bombeo, inyector, automuestreador, columna cromatográfica, detector, integrador y registrador (figura 2).

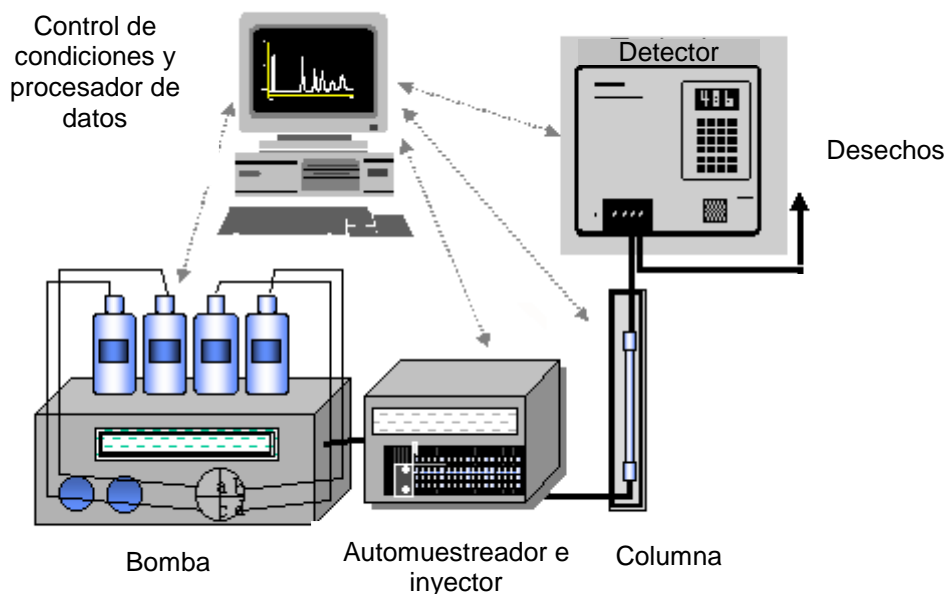


Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Bombas

Las bombas permiten liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático), o de composición variable para hacer un gradiente de elución (Skoog, 2005).

Columna cromatográfica

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 25 cm. y un diámetro interno de 2-5 mm. En ellas se encuentra la fase estacionaria, la cual está conformada por un material de empaque, este es seleccionado dependiendo de la separación que se quiera realizar. Existen tres tipos diferentes de empaque:

- a) Gel de sílice: sólido amorfo y rígido cuya fórmula es $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$, se utiliza convencionalmente transformado.
- b) Gel de sílice modificada químicamente para obtener un comportamiento de selectividad específico (con fase enlazada). Para disminuir su polaridad, a menudo excesiva, se aprovecha la reactividad de los silanoles para fijar moléculas orgánicas a través de enlaces covalentes, esto da origen a la cromatografía de reparto de polaridad en fase reversa.
- c) Alúmina (Rouessac, 2003).

Detector

Es un dispositivo capaz de monitorear en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que la misma sale de la columna.

El detector más utilizado en CLAR, es un detector de absorción (UV/Vis); que responde a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta, tales como sustancias que tienen electrones sin compartir, así como todos los aromáticos.

Otros detectores también utilizados en CLAR son:

- Detector de índice de refracción
- Detector de fluorescencia
- Detector electroquímico
- Detector infrarrojo

3.6. Validación de métodos analíticos

La validación de un método es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Es necesario realizar la validación del método para cumplir con regulaciones como la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

La NOM-177-SSA1-1998 señala, en el punto nueve, los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas. Además de los parámetros mínimos que deben incluirse en la validación de métodos analíticos, señala la necesidad de establecer, previo a la validación, una estrategia la cual, debe incluir los criterios de aceptación o rechazo para cada parámetro y las medidas correctivas en caso de fallas y especifica claramente que el método debe realizarse con el mismo tipo de matriz biológica que aquella de las muestras biológicas.

3.6.1. Parámetros de validación

Según la NOM-177-SSA1-1998, la validación de métodos analíticos debe incluir

como mínimo los parámetros indicados en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de validación

Parámetro	Definición	Determinación
Rango	Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre el nivel superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.	Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas, cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del intervalo.
Recuperación absoluta	Comparación de la respuesta que se obtiene de una cantidad de la sustancia de interés que es adicionada y extraída de la matriz biológica, contra la respuesta que se obtiene de la adición de esa misma cantidad a una solución.	Analizar al menos por triplicado un mínimo de 3 concentraciones conocidas (baja, media y alta) del o los compuestos por analizar en la matriz biológica dentro del rango y comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes.
Linealidad	Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.	Se determina construyendo una curva de calibración, con la misma matriz biológica en la que se encuentra el analito de interés. La curva debe consistir en un blanco de la muestra, una muestra cero y de 6 a 8 puntos sin incluir el cero, que cubran el rango de concentración esperado en el estudio y que incluya el límite de cuantificación.
Precisión	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. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. La reproducibilidad expresa la precisión bajo las variaciones que comúnmente ocurren dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas y/o diferentes equipos.	Analizar una serie de muestras de concentración conocida del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, denominados puntos control. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el intervalo. Generalmente, los puntos control constan de tres concentraciones distintas cuyos valores son: para el punto control bajo, tres veces el valor del límite de cuantificación; para el punto control medio, la media geométrica del rango de la curva de calibración y para el punto control alto, el 70 u 85% de la concentración más alta de la curva de calibración.

Tabla 2. Parámetros de validación (continuación)

Exactitud	Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.	Se evalúa al comprobar que el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad está dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.
Estabilidad	Propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis. Los procesos de estabilidad que se pueden evaluar son: muestreo, manipulación, largo plazo (congelados a temperatura de almacenamiento), corto plazo (temperatura ambiente) y después de congelar y descongelar a través de varios ciclos.	Evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango.
Límite de cuantificación	Concentración más baja del compuesto de interés que puede ser cuantificada cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.	Analizar al menos por quintuplicado, la concentración más baja del rango de trabajo. El punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.
Límite de detección	Concentración mínima de un compuesto en una muestra en el que a las condiciones de operación establecidas se puede detectar pero no necesariamente cuantificar el compuesto.	Para su evaluación deben realizarse diluciones con plasma a partir del límite de cuantificación a fin de obtener la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.
Selectividad	Habilidad de un método analítico de cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.	Analizar muestras blanco de la matriz biológica correspondiente proveniente de por lo menos 6 voluntarios y evaluar posibles interferencias como son: metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado de forma concomitante.

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos, material y equipo

- Reactivos y material biológico.
 - ~ Agua destilada, desionizada y filtrada.
 - ~ Metanol, LC/MS, Fluka.
 - ~ Acetonitrilo, HPLC, J.T. Backer (ACN).
 - ~ Ácido trifluoroacético 99% Fluka, (TFA).
 - ~ Ácido fórmico ~98%, Fluka.
 - ~ Ácido tricloroacético, 98%, Fluka (TCA).
 - ~ Plasma humano congelado bajo condiciones normales, lipidémicas y hemolizadas, con etiqueta de sangre segura y resultado negativo a las pruebas de HIV, VHC, AgSHB, Sífilis y Chagas.

- Sustancias de referencia
 - ~ Iohexol, Fluka (Lote: 37890).
 - ~ Naproxeno sódico, USP (Lote: 700 A).
 - ~ Diclofenaco sódico, Sigma-Aldrich (Lote: D6899).
 - ~ Acetaminofén, Sigma-Aldrich (Lote: A3035).
 - ~ Cafeína, Sigma-Aldrich (Lote: 016K8806).
 - ~ Ácido salicílico, Sigma-Aldrich (Lote: 84210).

➤ Material y equipo

- ~ Balanza analítica Sartorius CP 225D.
- ~ Sistema desionizador de agua Milli-Q System-Waters.
- ~ Refrigerador Revco 4, -20 y -70 °C Thermo Electron Corporation.
- ~ Ultracentrifuga Beckman Coulter Allegra 25R.
- ~ Agitador Vortex Thermolyne MaxMix II, modelo 37600 mixer.
- ~ Potenciómetro Hanna Instruments, modelo TH213.
- ~ Campana de extracción Fisher Hamilton.
- ~ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba cuaternaria 2695 y detector espectrofotométrico con lámpara de arreglo de diodos 2996, marca Waters.
- ~ Columna Spherisorb C₁₈ODS2, 250 x 4.6 mm, 5 µm.
- ~ Análisis cuantitativo en software Empower 2.0.
- ~ Membranas Millipore de 0.45 µm tipo HVLP, diámetro de 45 mm.

4.2. Preparación de soluciones de trabajo

Solución de ácido trifluoroacético al 0.1%

En un matraz volumétrico de 1 L se colocaron 900 mL de agua desionizada, se adicionó 1 mL de TFA. Se llevó a volumen con agua desionizada y se mezcló. Finalmente se le midió el pH.

Mezcla de ACN: H₂O (10:90 v/v)

Se mezclaron 10 partes de ACN con 90 partes de agua desionizada. Lavado del inyector.

Mezcla de MeOH: H₂O (50:50v/v)

Se mezcló metanol LC-MS y agua desionizada en proporción 50:50 según la cantidad a utilizar. Limpieza de válvulas.

Solución de TFA al 0.1% en ACN

Se transfirieron 80 mL de ACN a un matraz volumétrico de 100-mL, se adicionó una alícuota de 0.08 mL de TFA, se mezcló y llevó a volumen con ACN.

Todas las soluciones fueron filtradas al vacío con una membrana Millipore de 0.45 µm tipo HVLP y diámetro de 45 mm. Se desgasificaron colocando el recipiente en el sonicador durante 15 minutos.

4.3. Preparación de las soluciones estándar, adecuación del sistema, curva de calibración y puntos control de iohexol

Soluciones de iohexol.

- Solución madre 1. Ref 1. (100 000 µg/mL): se pesó 1 g de iohexol y se mezcló con agua desionizada. Se sonicó durante 20 minutos. Una vez disuelto, se llevó a volumen con agua desionizada a 10 mL.
- Solución de referencia 2. Ref 2. (10 000 µg/mL): de la solución madre se tomaron 100 µL y se llevó a 1 mL con ACN: H₂O (50:50).
- Solución de referencia 3. Ref 3. (1 000 µg/mL): de la solución de referencia 2 se tomaron 100 µL y se llevaron a 1 mL con ACN: H₂O (50:50).

Curva de calibración en plasma

Utilizando las soluciones de referencia de iohexol se prepararon las soluciones de trabajo de la curva, a partir de las cuales fueron elaborados las soluciones de 10, 25, 50, 125, 250, 500, 750 y 1 000 µg/mL como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de las soluciones de la curva de calibración en plasma.

ID Cal	ID Solución	[Inicial] µg/mL	Alícuota µL	Volumen de ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	[Parcial] µg/mL	Alícuota µL	Volumen de plasma µL	[Final] µg/mL
C1	Ref 3	1 000	100	900	100	100	900	10
C2	Ref 2	10 000	25	975	250	100	900	25
C3	Ref 2	10 000	50	950	500	100	900	50
C4	Ref 2	10 000	125	875	1 250	100	900	125
C5	Ref 1	100 000	25	975	2 500	100	900	250
C6	Ref 1	100 000	50	950	5 000	100	900	500
C7	Ref 1	100 000	75	925	7 500	100	900	750
C8	Ref 1	100 000	100	900	10 000	100	900	1 000

Puntos control

Los puntos control se prepararon a partir de las soluciones de referencia elaboradas anteriormente. Las alícuotas tomadas y las concentraciones finales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de los puntos control en plasma.

ID	ID Solución	[Inicial] µg/mL	Alícuota µL	Volumen de ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	[Parcial] µg/mL	Alícuota µL	Volumen de plasma µL	[Final] µg/mL
PCB	Ref 3	1 000	30	970	300	100	900	30
PCM	Ref 2	10 000	140	860	1 400	100	900	140
PCA	Ref 1	100 000	80	920	8 000	100	900	800

Solución madre de naproxeno

Se pesaron 19 mg del estándar de naproxeno y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y se llevaron a volumen con metanol. Concentración final de naproxeno de 1.9 mg/mL.

Solución de referencia de naproxeno (EI)

Se colocaron 252 μ L de la solución madre de naproxeno en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con solución al 0.1% de TFA en ACN. Concentración final 48 μ g/mL.

Solución de adecuabilidad

Se preparó una solución de 30 μ g/mL como se indica para el punto control bajo (tabla 4) llevando a volumen con solución al 0.1% de TFA en agua en lugar de plasma.

Solución para uso de blanco de reactivos

Se mezclaron 900 μ L de una solución al 0.1% de TFA en agua con 100 μ L de ACN y se procesó junto con las muestras, sin adicionar estándar interno.

Solución para uso de blanco plasma

Se tomaron 100 μ L de plasma y se proceso al igual que las muestras sin adicionar EI.

4.4. Método de precipitación de proteínas

Las condiciones utilizadas para realizar la precipitación de proteínas se esquematizan en el siguiente diagrama de flujo (figura 3).

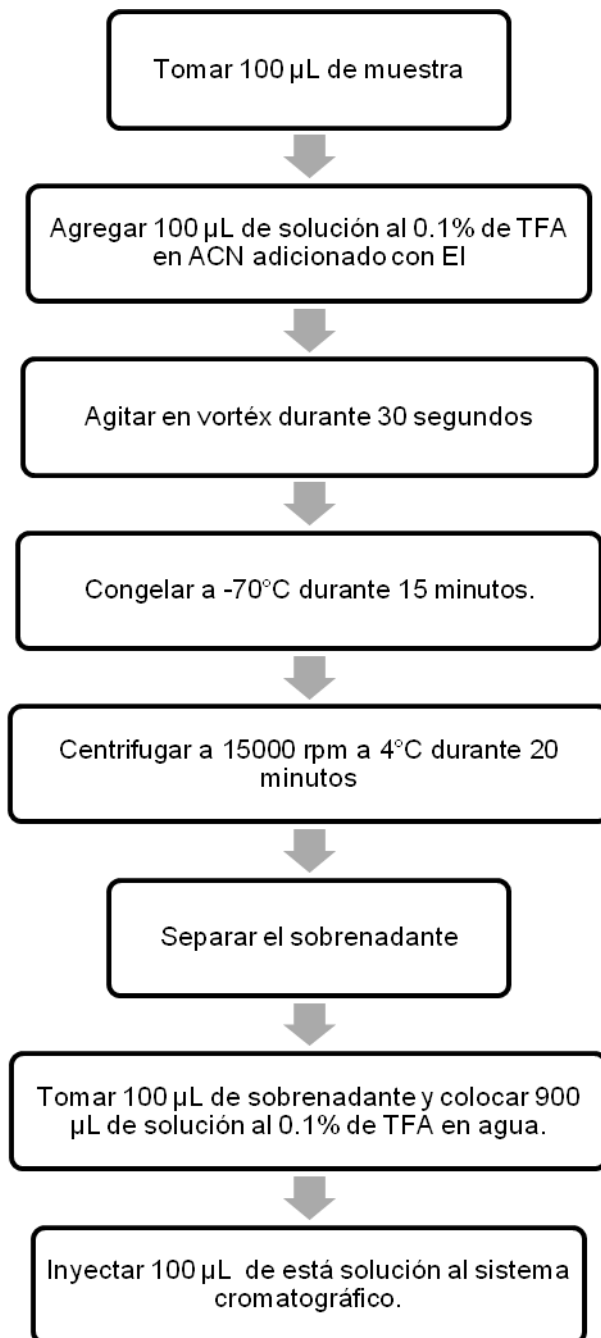


Figura 3. Método de precipitación de proteínas.

4.5. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Columna: SpherisorbC₁₈ ODS2 (250 x 4.6mm x 5µm) Waters.

- Temperatura de la columna: 30°C.
- Temperatura del automuestreador: 15°C.
- Volumen de inyección: 100 µL.
- Tiempo de corrida: 25 minutos.
- Longitud de onda: 245 nm.
- Respuesta: área relativa (analito/estándar interno).
- Gradiente de la fase móvil:

Tabla 5. Gradiente de la fase móvil.

Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	% Sol. al 0.1% de TFA en agua	% ACN
1	0 – 2	98	2
	9	92	8
	11	82	18
	15 -24	50	50
	25	98	2

4.6. Validación del método analítico para la cuantificación de iohexol en plasma

Para la realización de la validación se diseñó una corrida analítica en la que por cada día de trabajo se inyectaban cinco muestras de una solución de concentración conocida (adecuabilidad del sistema), un blanco de reactivos, un blanco de plasma y una curva de calibración, después de estas muestras se inyectaban las muestras correspondientes al experimento que sería realizado ese día.

Para que la corrida pudiera ser considerada como válida era necesario que la adecuabilidad del sistema presentara un coeficiente de variación (% CV) menor o

igual al 2%, que los blancos no presentarán señales de interferencia en el tiempo de retención de los compuestos de interés y que la curva de calibración cumpliera con los criterios de linealidad.

Para cumplir con lo establecido en la NOM-177-SSA1-1998 en lo referente a la validación de métodos analíticos en fluidos biológicos se evaluaron los siguientes parámetros.

4.6.1. Rango de trabajo

Se estableció en función de las concentraciones esperadas de iohexol en plasma en estudios farmacocinéticos descritos en la literatura por Soman, y cols., 2005 y en suero por Cavalier y cols., 2008. El intervalo establecido fue de 10 a 1 000 µg/mL.

4.6.2. Recuperación absoluta

Se analizaron por quintuplicado tres concentraciones conocidas (30, 140 y 800 µg/mL) en plasma y en solución con ACN: H₂O (50:50 v/v), preparadas según lo indicado en la tabla 4.

Se calculó el promedio y el porcentaje de recuperación absoluta a partir de la comparación de las respuestas en solución y en plasma para ambos picos cromatográficos y el estándar interno.

$$\text{Recuperación absoluta} = \left(\frac{\text{Respuesta promedio en plasma}}{\text{Respuesta promedio en solución}} \right) * 100$$

Criterio de aceptación: el porcentaje de recuperación no debe ser necesariamente del 100% para los compuestos analizados, pero deber ser reproducible a cada

nivel de concentración, presentar un % CV menor o igual al 15% y una variación entre ellas menor al 10%.

4.6.3. Linealidad

Para su evaluación se procesaron tres curvas de calibración en plasma, a concentraciones de 10, 25, 50, 125, 250, 500, 750 y 1 000 µg/mL de iohexol de acuerdo a lo indicado en la tabla 3. Las muestras fueron procesadas según la precipitación de proteínas señalada en la sección 4.4 e inyectadas en el sistema cromatográfico.

Una vez obtenidos los resultados se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación (r^2). Con estos datos se determinó el modelo matemático que mejor describiera la relación entre la concentración y la respuesta, verificando que fuera continuo y reproducible en todo el intervalo de trabajo y a través de la evaluación de diferentes ponderaciones se eligió el modelo pertinente. Con el modelo obtenido, se calcularon las concentraciones recuperadas para cada punto, obteniéndose la diferencia porcentual entre la concentración calculada y la concentración nominal mediante la fórmula:

$$\% \text{ diferencia} = \left(\frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración calculada}}{\text{Concentración nominal}} \right) * 100$$

Criterio de aceptación: el método es lineal si el coeficiente de determinación es mayor o igual a 0.98 para la relación respuesta contra concentración. Al evaluar el porcentaje de diferencia en cada nivel de concentración esta debe ser menor o igual al 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo, el cuál puede

presentar un valor menor o igual al 20%.

4.6.4. Precisión

Para determinar la precisión del método analítico, se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad con el siguiente procedimiento:

4.6.4.1. Repetibilidad del método (precisión intradía)

Se preparó una curva patrón y por quintuplicado una serie de puntos control adicionados en plasma a concentraciones de 30, 140 y 800 $\mu\text{g/mL}$ (bajo, medio y alto). Se procesaron con el método de extracción indicado en la sección 4.4 y se inyectaron al sistema cromatográfico.

4.6.4.2. Reproducibilidad (precisión interdías)

Se analizó por quintuplicado, en tres días continuos de trabajo, las concentraciones de los puntos control bajo, medio y alto (30, 140 y 800 $\mu\text{g/mL}$).

Para ambos casos se calculó la concentración interpolando en la curva de calibración preparada el día del análisis. Se obtuvo el promedio de la concentración, la desviación estándar y el % CV.

Criterio de aceptación: el método es repetible y reproducible si el %CV no es mayor al 15% para los 3 niveles.

4.6.5. Exactitud

Se determinó este parámetro calculando el valor absoluto del por ciento de diferencia con respecto a la concentración nominal (% diferencia). Para lo cual se tomaron los valores de las determinaciones de cada nivel de concentración, tanto de los datos de repetibilidad, como los datos de reproducibilidad.

Criterio de aceptación: el método es exacto si el valor promedio de la diferencia con respecto a la concentración nominal es menor o igual al 15%.

4.6.6. Estabilidad

El compuesto a analizar debe permanecer estable en plasma desde el momento de muestreo hasta finalizar su análisis, es por ello que se evaluaron las siguientes condiciones de estabilidad:

4.6.6.1. Estabilidad a corto plazo

- Temperatura ambiente

Se preparó una serie de puntos control (bajo, medio y alto) y se mantuvieron sobre la mesa de trabajo por un periodo de 8 horas. Trascurrido este tiempo se procesó de acuerdo a lo indicado en la sección 4.4 realizando replicas por triplicado y se inyectaron en el sistema cromatográfico.

- Estabilidad de la muestra procesada

Consistió en la preparación de una serie de puntos control en plasma por triplicado a las concentraciones establecidas según lo indicado en la tabla 4. Después de ser procesada se mantuvo en el automuestreador (15° C) durante 50 horas y transcurrido este tiempo se inyectó al sistema cromatográfico.

- Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación

Fueron evaluadas por triplicado las muestras control bajo, medio y alto para lo cual se preparó una serie de puntos control a las concentraciones determinadas y fueron congeladas durante 24 horas a -70°C, descongeladas completamente y vueltas a congelar por 24 horas bajo las mismas condiciones. Este ciclo de

congelación-descongelación se repitió dos veces más y las muestras fueron procesadas y analizadas al tercer ciclo.

4.6.6.2. Estabilidad a largo plazo

Para su evaluación se elaboró una serie de puntos control en solución a las concentraciones de 300, 1400 y 8000 $\mu\text{g/mL}$. A partir de estas soluciones se prepararon dos series de puntos control en plasma y se almacenaron a -70°C . Una de las series se mantuvo a -70°C durante un mes para su posterior evaluación. Después de un mes fue descongelada y se analizó por triplicado junto con una curva de calibración preparada el día del análisis.

Para todas las pruebas anteriores se calculó la concentración interpolando el valor de la respuesta en la curva de calibración preparada el día del análisis, el promedio de la concentración, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el porcentaje de diferencia con respecto a la concentración nominal, siendo la concentración inicial la obtenida de las muestras frescas y la concentración final la obtenida después de la estabilidad evaluada.

Criterio de aceptación: los valores de concentración final deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos. El porcentaje de diferencia no deberá ser mayor que el 15% respecto al valor obtenido de las muestras generadas el día del análisis.

4.6.7. Límite de cuantificación

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración (10 $\mu\text{g/mL}$) en plasma.

Criterio de aceptación: el punto tiene validez si el valor promedio de las cinco determinaciones presenta una diferencia de $\pm 20\%$ del valor nominal, con un % CV no mayor al 20%. Y presenta una señal de cuando menos 5 veces la respuesta del ruido del blanco.

4.6.8. Límite de detección.

Se determinó realizando diluciones del límite de cuantificación con plasma en una proporción 1:1 y 1:2, las cuales se procesaron por quintuplicado.

Criterio de aceptación: es la concentración mínima de iohexol en plasma que es detectable, es decir que se diferencia del ruido, aunque esta no cumpla con los criterios de precisión y exactitud.

4.6.9. Selectividad.

Con el fin de determinar la selectividad del método, se aplicó el método de precipitación de proteínas (sección 4.4) a las siguientes muestras:

- Muestra blanco de la matriz biológica de cada uno de 6 donadores.
- Muestra blanco de la mezcla de la matriz biológica de 6 donadores.
- Muestra blanco de la mezcla de la matriz biológica adicionada de fármaco a la concentración más baja de la curva así como del estándar interno.
- Muestra de la mezcla de la matriz biológica adicionada de estándar interno.
- Muestra blanco de la mezcla de la matriz biológica adicionada de los posibles fármacos que pudieran estar presentes. Fueron evaluados: cafeína, ácido salicílico, diclofenaco y acetaminofen.
- Muestra blanco de un plasma hemolizado (con adición y sin adición de

fármaco y estándar interno).

- Muestra blanco de un plasma lipídico (con adición y sin adición de fármaco y estándar interno).

Criterio de aceptación: no deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni del estándar interno según sea el caso. De presentarse alguna señal está deberá ser menor del 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración. Para el estándar interno no debe ser mayor del 5% de su respuesta.

4.7. Validación en suero

La evaluación de esta prueba se realizó, debido a que el grupo clínico informó que en ciertas ocasiones se lleva a cabo la recolección de muestras de suero. Por lo cual se validó utilizando las mismas concentraciones que en plasma, evaluando linealidad, precisión y repetibilidad.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Desarrollo del método analítico

Para poder desarrollar el método analítico para la cuantificación de iohexol en plasma y suero se revisaron los métodos previamente reportados en la literatura internacional (tabla 1), de los cuales se tomaron diferentes condiciones buscando las que mejores resultados proporcionaban.

Condiciones de detección

Los sistemas de detección reportados en la literatura son UV-Visible y espectro de masas (tabla 1). Se seleccionó el UV-Visible al ser más económico y confiable.

Se estableció la longitud de onda realizando un barrido de 200 a 400 nm a una solución de iohexol de 1 µg/mL obteniendo como resultado una longitud de onda de máxima absorbancia de 245nm.

Elección de la columna cromatográfica y la fase móvil

Se probaron tres columnas cromatográficas:

- XBridge C₁₈ (1.0 x 100 mm x 3.5 µm).
- XTerra® RP18 (4.6 x 150mm x 5 µm).
- Spherisorb C₁₈ ODS2 (250 x 4.6mm x 5 µm).

En cada una de estas columnas se evaluaron diferentes condiciones cromatográficas como fueron la modificación de la proporción de fase móvil (constituida por ACN o metanol y agua), así como la velocidad de flujo, de tal forma que se obtuvieran una óptima separación de los isómeros del iohexol.

La columna Spherisorb C₁₈ ODS2 (250 x 4.6mm x 5 μm) fue la que presentó mejores resultados al separar los isómeros del iohexol con una mayor resolución.

Selección del método de extracción

Antes de realizar la validación del método fue necesario el desarrollo de un método de extracción del fármaco de la matriz biológica (plasma y suero), debido a la complejidad que éstas presentan para ser analizada de forma directa.

Era necesaria la implementación de un método de extracción que fuera rápido, permitiera la cuantificación selectiva del iohexol y el naproxeno, efectivo, sencillo y que presentará un porcentaje de recobro alto. Se decidió utilizar el método de precipitación de proteínas como primera opción ya que era el que se encontraba reportado en el mayor número de artículos.

Se evaluaron diferentes agentes precipitantes (tabla 6), así como la proporción donde la respuesta presentará la mejor reproducibilidad, estableciendo como constante el volumen de muestra (100 μL). Todas las pruebas se realizaron por triplicado a 3 concentraciones diferentes.

Tabla 6. Ensayo de diferentes agentes precipitantes.

Agente Precipitante	Proporción evaluada (Plasma: agente precipitante)
ACN	1:4, 1:2 y 1:1
ACN (0.1% TFA)	1:4, 1:2 y 1:1
ACN (0.1% ácido fórmico)	1:4, 1:2 y 1:1
ACN (0.1% TCA)	1:4, 1:2 y 1:1

Para optimizar el método de precipitación se modificaron otros parámetros como fueron el tipo de agitación y el tiempo de congelación. Se encontró que para obtener un mayor recobro y mejor reproducibilidad las condiciones adecuadas

para un volumen de 100 μ L de muestra, era la proporción 1:1 (v/v) plasma: ACN al 0.1% TFA y 15 minutos de congelación a -70° C.

Selección de estándar interno

En la selección del estándar interno se probaron diferentes compuestos (figura 4) que presentarán propiedades fisicoquímicas similares al iohexol, principalmente su estructura (amiodarona), solubilidad (diclofenaco) y longitud de onda (naproxeno).

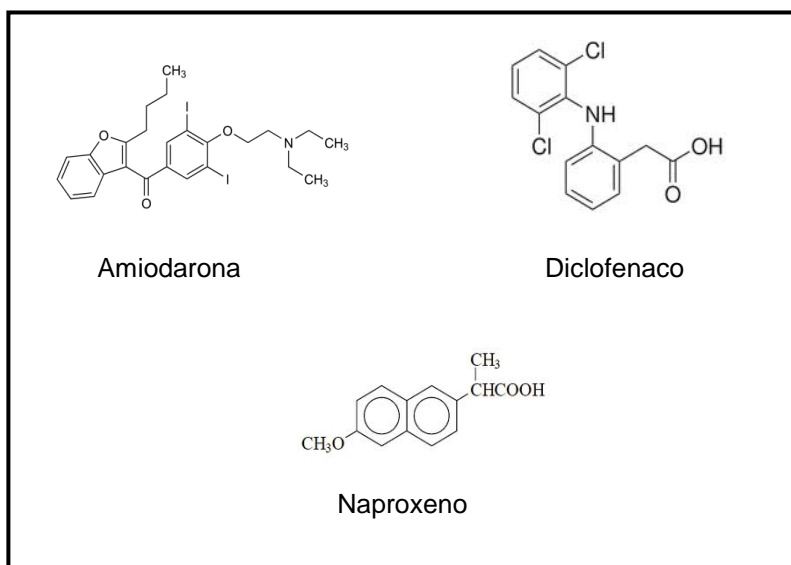


Figura 4. Estructuras de los diferentes compuestos evaluados como estándar interno.

El primer compuesto analizado fue la amiodarona, debido a que tiene propiedades fisicoquímicas similares. Sin embargo las condiciones ya utilizadas no permitían la adecuada elución y el factor de respuesta era pequeño a la longitud establecida. En la figura 5 se muestra el cromatograma obtenido para la amiodarona a una concentración de 20 μ g/mL.

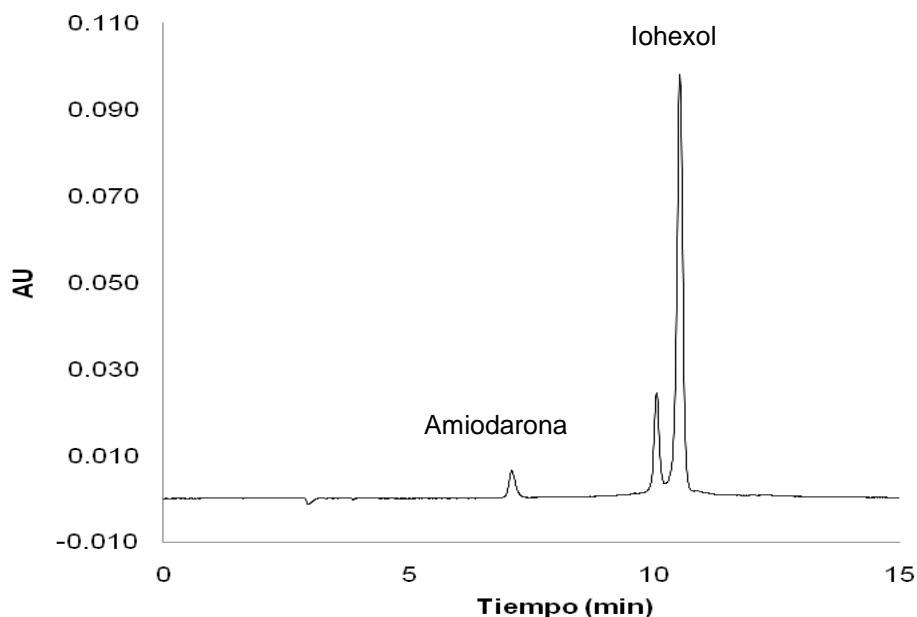


Figura 5. Cromatograma típico de una solución de 140 $\mu\text{g/mL}$ de iohexol (PCM) y 20 $\mu\text{g/mL}$ amiodarona.

Los fármacos restantes (naproxeno y diclofenaco) fueron evaluados inyectando una solución de concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los fármacos, en una proporción de ACN: H_2O (0.1% TFA) 50:50, por lo reportado por Karidas y cols. (1993), y Arcelloni y cols. (2001) para realizar la elución de dichos compuestos (figura 6). Debido a esto fue necesario adicionar al gradiente de elución esta proporción donde se observó que ambos presentaban un tiempo de retención favorable al no interferir con el pico de interés, y ambos generaban una respuesta simétrica a las condiciones evaluadas, así como reproducible.

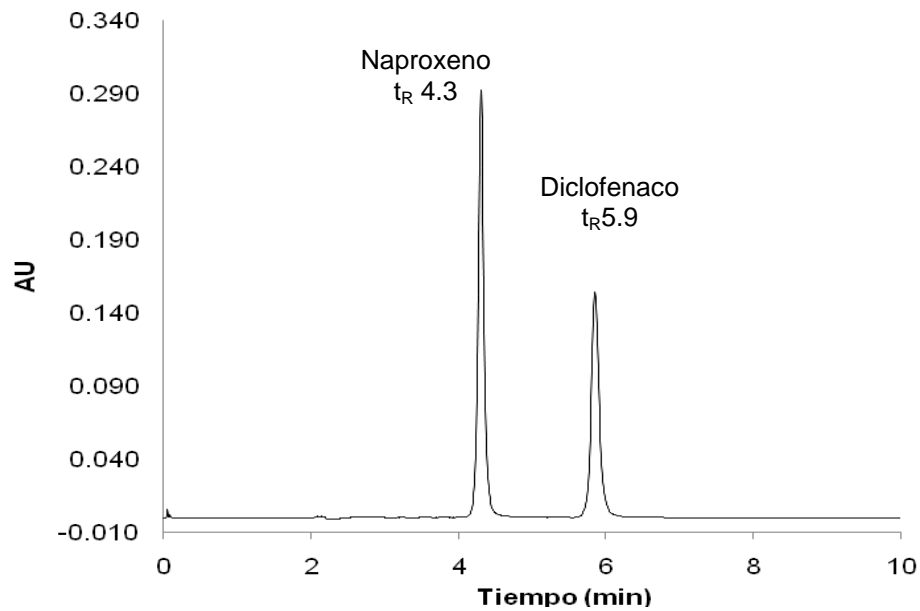


Figura 6. Cromatograma típico de una solución de 1 $\mu\text{g/mL}$ de naproxeno y 1 $\mu\text{g/mL}$ de diclofenaco.

El compuesto que resultó presentar una mejor afinidad al método fue el naproxeno al presentar una longitud de onda de máxima absorción cercana a 245 nm, no interferir con la señal del iohexol, adecuada simetría y un porcentaje de recobro alto y reproducible. Se realizó una consulta con el grupo clínico y se estableció que el naproxeno no sería un fármaco administrado durante el estudio.

En la figura 7 se muestra el cromatograma representativo en solución del fármaco y el estándar interno, el tiempo de retención encontrado fue de 10.2 min. para el primer isómero, 10.8 min. para el segundo isómero y 21.5 min. para el estándar interno.

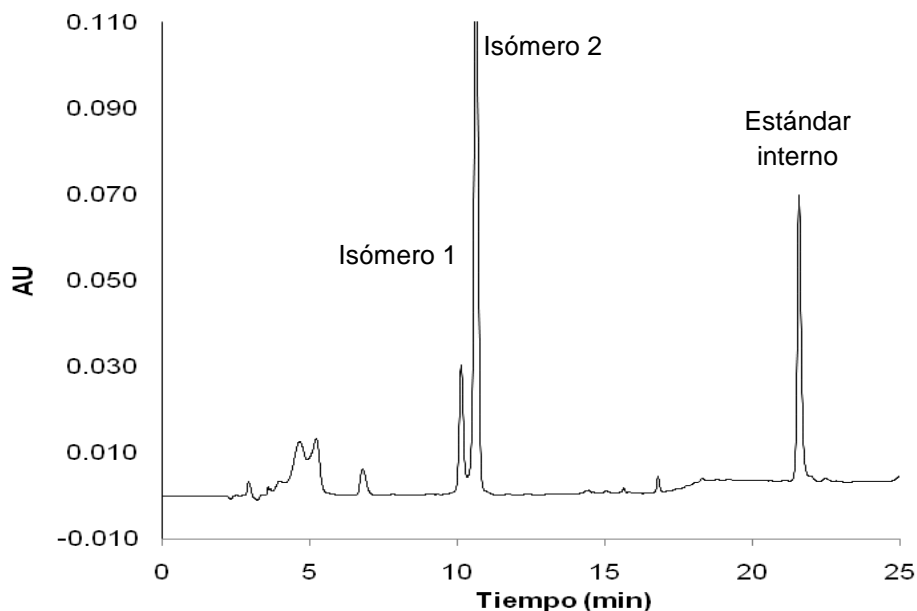


Figura 7. Cromatograma típico de una muestra en solución a 140 µg/mL de iohexol y 48 µg/mL de naproxeno.

5.2. Validación del método analítico en plasma

A continuación se resumen los resultados de la validación del método analítico.

5.2.1. Adecuabilidad del sistema

La evaluación del coeficiente de variación de la adecuabilidad del sistema para todas las corridas realizadas se muestra en la tabla 7, donde se indica que se cumple con el criterio establecido al no presentar un resultado mayor al 5%.

Tabla 7. Adecuabilidad del sistema (n=5).

Día de análisis	CV (%)	
	Isómero 1	Isómero 2
1	0.3	0.2
2	0.4	0.1
3	0.7	0.1
4	0.5	0.1
5	0.6	0.1

5.2.2. Recuperación absoluta

Las tablas 8 y 9 muestran los resultados del recobro para los compuestos analizados. En ellas se puede observar que el método presenta un porcentaje de recobro alto, después de analizar el área de los picos cromatográficos se determinó que el primer isómero presenta un recobro de 98.88% y de 97.05% para el segundo, los cuales presentan una diferencia menor del 10% a lo largo de las concentraciones evaluadas. El % CV del área para cada nivel de concentración evaluado no fue mayor al 3%.

Tabla 8. Recobro absoluto del primer isómero del iohexol.

	Nivel de concentración de iohexol (µg/mL)		
	30	140	800
	Área del primer isómero en las muestras en solución		
	54583	243393	1458256
	54845	244106	1463685
	54193	244288	1468828
	54175	245485	1475351
	54605	245072	1479765
Promedio	54480.20	244468.80	1469177.00
% D.E.	289.33	824.34	8657.02
% C.V.	0.53	0.34	0.59
	Área del primer isómero en las muestras de plasma		
	55689	241938	1438751
	55277	238416	1407909
	55320	243040	1388942
	54213	247626	1437834
	54278	247083	1387827
Promedio	54955.40	243620.60	1412252.60
% D.E.	667.94	3817.31	25077.05
% C.V.	1.22	1.57	1.78
	Recuperación absoluta (%)		
	100.87	99.65	96.13
	Recuperación absoluta promedio (%)		
	98.88		
	Diferencia del % de recuperación respecto a la recuperación absoluta promedio		
	2.01	0.78	2.79

Tabla 9. Recobro absoluto del segundo isómero del iohexol.

	Nivel de concentración de iohexol (µg/mL)		
	30	140	800
	Área del segundo isómero en las muestras en solución		
	302489	1294530	7880362
	302239	1290811	7874040
	302052	1289374	7860810
	302239	1291707	7860339
	302529	1293025	7875744
Promedio	302309.60	1291889.40	7870259.00
% D.E.	197.89	1986.57	9139.77
% C.V.	0.07	0.15	0.12
Área del segundo isómero en las muestras de plasma			
	297096	1292470	7355013
	294761	1289347	7354962
	295823	1293475	7320673
	297022	1288088	7331725
	298963	1287784	7287867
Promedio	296733	1290232.80	7330048.00
% D.E.	1573.62	2593.18	27901.16
% C.V.	0.53	0.20	0.38
Recuperación absoluta (%)			
	98.16	99.87	93.14
Recuperación absoluta promedio (%)			
97.05			
Diferencia del % de recuperación respecto a la recuperación absoluta promedio			
	1.13	2.90	4.04

En la tabla 10 se presentan los valores correspondientes a la respuesta del estándar interno. Obteniendo un porcentaje de recuperación del 76%, el % CV del área para el nivel de concentración evaluado no fue mayor al 3%.

Tabla 10. Recobro absoluto del estándar interno.

Área del estándar interno en las muestras en solución			
	673370	721376	674460
	671904	720806	674968
	670361	720737	673798
	669985	720421	675506
	671399	719255	674576
Promedio	671403.80	720519.00	674661.60
% D.E.	1343.19	786.07	632.59
% C.V.	0.20	0.11	0.09
Área del estándar interno en las muestras de plasma			
	537984	535906	510114
	540012	537923	506022
	528618	518401	510792
	541566	535112	511972
	536573	527425	512112
Promedio	536950.60	530953.40	510202.40
% D.E.	5032.81	8068.61	2480.39
% C.V.	0.94	1.52	0.49
Recuperación absoluta (%)			
	79.97	73.69	75.62
Recuperación absoluta promedio (%)			
	76.43		
Diferencia del % de recuperación respecto a la recuperación absoluta promedio			
	4.64	3.58	1.05

Con estos resultados se establece que la recuperación absoluta es constante para el iohexol y el estándar interno a lo largo del intervalo del trabajo al cumplir con los criterios de aceptación establecidos.

5.2.3. Linealidad

El resultado de graficar la relación de áreas para los isómeros del iohexol entre el estándar interno contra la concentración nominal del fármaco de interés está representada en la figura 8. La ecuación de la curva representa el ajuste a un modelo matemático lineal por mínimos cuadrados, con una ponderación 1/x.

Las tablas 11 y 12 muestran los valores de la ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de las 3 curvas de calibración para ambos isómeros, en ellos se indica que el método analítico para la cuantificación de iohexol en plasma es lineal en el rango de concentración de 10 a 1000 µg/mL al presentar coeficientes de correlación mayores a 0.98. Por otro lado en las tablas 13 y 14 se observa que la diferencia entre la concentración experimental global y la concentración nominal es menor al 20% para el punto más bajo de la curva y menor al 15% para las demás concentraciones evaluadas.

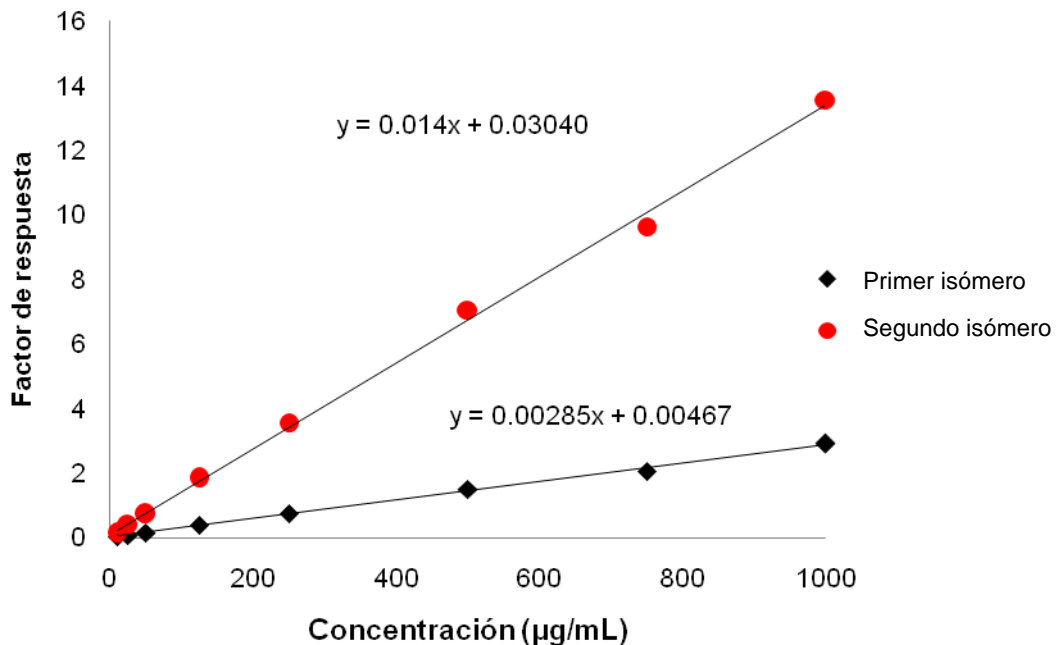


Figura 8. Linealidad del método analítico para la cuantificación de los isómeros del iohexol en plasma de 10 a 1000 µg/mL.

Tabla 11. Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para el primer isómero del iohexol en plasma.

Día de análisis	Pendiente	Ordenada	r ²
1	0.00270	0.00374	0.9990
2	0.00307	0.00042	0.9985
3	0.00285	0.00467	0.9993

Tabla 12 Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para el segundo isómero del iohexol en plasma.

Día de análisis	Pendiente	Ordenada	r ²
1	0.01470	0.02180	0.9987
2	0.01620	0.00747	0.9987
3	0.01450	0.03040	0.9991

Tabla 13. Linealidad. Concentraciones cuantificadas del primer isómero del iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras del primer isómero de iohexol (µg/mL)							
	10	25	50	125	250	500	750	1000
	Concentración cuantificada de las muestras del primer isómero (µg/mL)							
1	9.57	24.22	49.47	129.90	261.51	519.48	733.86	981.99
2	9.86	25.24	49.68	126.30	243.71	508.04	785.37	961.80
3	9.04	24.40	53.47	128.01	260.13	509.02	727.29	998.66
Promedio	9.49	24.62	50.87	128.07	255.11	512.18	748.84	980.82
D.E. %	0.42	0.54	2.25	1.80	9.90	6.34	31.81	18.46
C.V. %	4.41	2.21	4.42	1.41	3.88	1.24	4.25	1.88
% Diferencia	5.09	1.51	1.74	2.45	2.05	2.44	0.15	1.92

Tabla 14. Linealidad. Concentraciones cuantificadas del segundo isómero del iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras del segundo isómero de iohexol (µg/mL)							
	10	25	50	125	250	500	750	1000
	Concentración cuantificada de las muestras del segundo isómero de iohexol (µg/mL)							
1	9.36	24.09	49.78	131.45	263.65	521.52	734.68	975.46
2	9.56	25.25	50.15	128.21	245.78	508.86	785.99	956.19
3	8.79	24.56	53.59	129.13	262.09	510.47	728.14	993.22
Promedio	9.24	24.63	51.17	129.60	257.17	513.62	749.60	974.96
D.E. %	0.40	0.58	2.10	1.67	9.89	6.89	31.68	18.52
C.V. %	4.33	2.36	4.11	1.29	3.85	1.34	4.23	1.90
% Diferencia	7.60	1.47	2.35	3.68	2.87	2.72	0.05	2.50

5.2.4. Precisión y exactitud

Habiendo evaluado los tres niveles de concentración 30, 140, y 800 µg/mL correspondientes a los puntos control en diferentes días y obtener como resultado un coeficiente de variación que no excede el 3% para ambos isómeros (tabla 15 y

16) es posible indicar que el método es repetible y reproducible. Así mismo el porcentaje de diferencia existente entre la concentración nominal y la concentración experimental que se muestran en las tablas 17 y 18, presenta un valor menor al 15% sugiriendo que la evaluación realizada cumple con lo indicado por la NOM-177-SSA-01 para la parte de exactitud.

Tabla 15. Precisión del método analítico para la cuantificación del primer isómero de iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de plasma del primer isómero de iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30	140	800
	Concentración cuantificada de las muestras de plasma del primer isómero de iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
Día 1	31.61	141.27	802.49
	32.29	143.90	796.25
	32.25	144.18	845.78
	32.78	144.79	824.25
	33.25	143.72	847.05
Promedio	32.43	143.57	823.16
% D.E.	0.61	1.35	23.64
% C.V.	1.89	0.94	2.87
Día 2	30.38	147.61	872.63
	31.18	153.47	846.83
	30.71	151.78	826.26
	31.76	148.45	837.45
	31.63	151.12	858.89
Promedio	31.13	150.49	848.41
% D.E.	0.59	2.42	18.09
% C.V.	1.89	1.61	2.13
Día 3	29.25	144.49	790.91
	29.55	144.40	814.93
	28.91	149.09	797.70
	30.24	145.21	795.32
	30.93	151.21	823.59
Promedio	29.78	146.88	804.49
% D.E.	0.81	3.09	14.04
% C.V.	2.72	2.11	1.74

Tabla 16. Precisión del método analítico para la cuantificación del segundo isómero de iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de plasma del segundo isómero de iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30	140	800
	Concentración cuantificada de las muestras de plasma del segundo isómero de iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
Día 1	31.32	139.49	781.97
	31.82	141.66	771.99
	31.89	141.84	812.78
	32.03	142.42	789.89
	32.38	140.59	811.01
Promedio	31.89	141.20	793.53
% D.E.	0.39	1.16	17.94
% C.V.	1.21	0.82	2.26
Día 2	29.83	147.42	855.90
	30.09	152.66	826.63
	30.03	150.65	799.81
	31.33	146.67	809.30
	31.03	149.17	829.36
Promedio	30.46	149.32	824.20
% D.E.	0.67	2.43	21.53
% C.V.	2.21	1.63	2.61
Día 3	28.54	140.30	755.46
	28.50	139.77	772.67
	27.76	143.69	753.31
	29.21	140.05	747.66
	29.40	144.80	769.49
Promedio	28.68	141.72	759.72
% D.E.	0.65	2.35	10.82
% C.V.	2.27	1.65	1.42

Tabla 17. Exactitud del método analítico para la cuantificación del primer isómero de iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de plasma de iohexol (µg/mL)		
	30	140	800
	% de diferencia con respecto a la [nominal]		
Día 1	5.37	0.91	0.31
	7.64	2.79	0.47
	7.49	2.99	5.72
	9.26	3.42	3.03
	10.82	2.66	5.88
Promedio	8.12	2.55	3.08
Día 2	1.26	5.44	9.08
	3.92	9.62	5.85
	2.38	8.42	3.28
	5.85	6.03	4.68
	5.42	7.95	7.36
Promedio	3.77	7.49	6.05
Día 3	2.50	3.21	1.14
	1.48	3.14	1.87
	3.64	6.49	0.29
	0.80	3.72	0.58
	3.08	8.01	2.95
Promedio	2.50	4.92	1.36
Promedio total	4.79	4.99	3.50

Tabla 18. Exactitud del método analítico para la cuantificación del segundo isómero de iohexol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de plasma de iohexol (µg/mL)		
	30	140	800
	% diferencia con respecto a la [nominal]		
Día 1	4.40	0.36	2.25
	6.06	1.18	3.50
	6.31	1.31	1.60
	6.78	1.73	1.26
	7.94	0.42	1.38
Promedio	6.30	1.00	2.00
Día 2	0.58	5.30	6.99
	0.31	9.04	3.33
	0.12	7.61	0.02
	4.45	4.76	1.16
	3.45	6.55	3.67
Promedio	1.78	6.65	3.03
Día 3	4.86	0.21	5.57
	5.02	0.16	3.42
	7.47	2.63	5.84
	2.64	-0.03	6.54
	1.99	3.43	3.81
Promedio	4.39	1.28	5.04
Promedio total	4.16	2.98	3.36

5.2.5. Estabilidad

5.2.5.1. Estabilidad a corto plazo

- Temperatura ambiente.

En la tabla 19 se muestran los resultados de los tres niveles de puntos control utilizados para evaluar la estabilidad a temperatura ambiente, para los cuales la diferencia es menor al 15% con respecto a la concentración inicial, al ser evaluados después de permanecer durante 8 horas en la mesa de trabajo a temperatura ambiente, por lo que el proceso de preparación de la muestra puede durar el tiempo indicado.

Tabla 19. Estabilidad a temperatura ambiente.

Primer isómero	Concentración de iohexol en las muestra de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	32.73	156.45	860.43
	Concentración de iohexol en las muestras de plasma después de 8 horas (µg/mL)		
	33.64	155.01	826.43
	34.54	153.86	840.24
	33.24	158.95	824.67
	Promedio	33.81	155.94
% DE	0.67	2.67	8.53
% CV	1.98	1.71	1.03
% Diferencia	3.29	0.33	3.48
Segundo isómero	Concentración de iohexol en las muestra de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	31.86	144.74	827.55
	Concentración de iohexol en las muestras de plasma después de 8 horas (µg/mL)		
	29.98	141.08	748.40
	30.83	139.64	760.29
	29.67	143.30	744.79
	Promedio	30.16	141.34
% DE	0.60	1.85	8.11
% CV	1.98	1.31	1.08
% Diferencia	5.35	2.35	9.23

- Estabilidad de la muestra procesada

Las muestras pueden permanecer en el automuestreador hasta 50 horas a 15°C sin perder sus propiedades por lo que sería posible diseñar una corrida que durará ese tiempo, lo que nos permitiría mantener las muestras procesadas bajo estas condiciones si ocurriera una eventualidad, tal como una falla eléctrica o en el sistema cromatográfico, y poder continuar con la corrida sin ningún inconveniente. Los siguientes resultados sugieren que las muestras son estables bajo dichas condiciones (tabla 20) donde se observa un porcentaje de diferencia con respecto al valor inicial menor al 15%.

Tabla 20. Estabilidad de la muestra procesada.

	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
		29.90	140.57
Primer isómero	Concentración de iohexol en para las muestras de plasma después de 50 horas (µg/mL)		
	32.75	159.82	913.76
	32.16	161.23	893.13
	32.98	157.79	908.66
Promedio	32.63	159.61	905.18
% DE	0.42	1.73	10.75
% CV	1.28	1.08	1.19
% Diferencia	9.12	13.55	11.33
	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	29.27	138.64	796.46
Segundo isómero	Concentración de iohexol en para las muestras de plasma después de 50 horas (µg/mL)		
	28.90	125.23	714.32
	27.93	125.68	697.97
	28.67	123.06	710.41
Promedio	28.50	124.66	707.57
% DE	0.51	1.40	8.54
% CV	1.78	1.12	1.21
% Diferencia	2.64	10.09	11.16

- Estabilidad en ciclos de congelación y descongelación

Los resultados de estabilidad al evaluar los ciclos de congelación-descongelación que se presentan en la tabla 21 indican que las muestras pueden someterse a 3 ciclos de congelación-descongelación sin sufrir degradación, ya que cumplen con el criterio de aceptación al presentar una diferencia entre el valor inicial y el valor experimental menor al 15%.

Tabla 21. Estabilidad después de 3 ciclos de congelación y descongelación.

	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	Primer isómero	29.90	140.57
Concentración de iohexol en las muestras después de 3 ciclos (µg/mL)			
29.94		125.72	701.63
29.84		127.40	698.64
29.62		122.06	724.48
Promedio	29.80	125.06	708.25
% DE	0.16	2.73	14.13
% CV	0.54	2.18	2.00
% Diferencia	0.34	11.03	12.89
	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	29.27	138.64	796.46
Segundo isómero	Concentración de iohexol en las muestras después de 3 ciclos (µg/mL)		
	30.49	127.43	704.43
	30.13	128.30	698.46
	29.96	122.87	721.14
	Promedio	30.20	126.20
% DE	0.27	2.92	11.76
% CV	0.89	2.31	1.66
% Diferencia	3.16	8.97	11.11

5.2.5.2. Estabilidad a largo plazo

Al ser comparadas muestras frescas contra aquellas que permanecieron almacenadas durante un mes a -70°C los resultados indican que no existe un porcentaje de diferencia entre la concentración inicial y la concentración final (tabla

22), lo que nos sugiere que son estables en este intervalo de tiempo, por lo que es posible realizar análisis de muestras que tengan un periodo de almacenamiento igual o menor al evaluado.

Tabla 22. Estabilidad a largo plazo.

	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	Primer isómero	31.38	152.91
Concentración final de iohexol en las muestras de plasma después de un mes (µg/mL)			
29.76		157.95	840.50
31.01		156.54	819.55
	30.78	151.58	801.85
Promedio	30.52	155.35	820.63
% DE	0.66	3.35	19.35
% CV	2.17	2.15	2.36
% Diferencia	2.75	1.60	2.68
	Concentración de iohexol en las muestras de plasma preparada el día del análisis (µg/mL)		
	29.32	141.09	771.53
Segundo isómero	Concentración final de iohexol en las muestras de plasma después de un mes (µg/mL)		
	29.17	153.04	803.95
	29.95	151.18	779.25
	29.86	145.31	758.47
Promedio	29.66	149.85	780.56
% DE	0.43	4.03	22.77
% CV	1.44	2.69	2.92
% Diferencia	1.17	6.20	1.17

5.2.6 Límite de cuantificación

En la evaluación del límite de cuantificación (tabla 23) se obtuvo un coeficiente de variación menor al 4% y una diferencia entre el valor nominal y el experimental menor al 15%, por lo que se cumple con la precisión y exactitud requerida.

Tabla 23. Límite de cuantificación.

	Concentración nominal de iohexol en las muestras de plasma ($\mu\text{g/mL}$)	
	10	
	Concentración experimental de iohexol en las muestras de plasma ($\mu\text{g/mL}$)	
	Primer isómero	Segundo isómer
	10.83	9.59
	11.10	10.23
	11.89	10.54
	11.37	10.42
	11.76	10.51
Promedio	11.39	10.26
% DE	0.44	0.39
% CV	3.90	3.81
% Diferencia	13.88	2.57

5.2.7 Límite de detección

En la tabla 24 se puede apreciar que el límite de detección es de 5 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a la dilución 1:2, ya que al evaluar dicha proporción los parámetros de exactitud superan para el primer isómero el 15%.

Tabla 24. Límite de detección.

	Concentración nominal de iohexol en las muestras de plasma ($\mu\text{g/mL}$)	
	5	
	Concentración experimental de iohexol en las muestras de plasma ($\mu\text{g/mL}$)	
	Primer isómero	Segundo isómero
	6.06	5.26
	6.29	5.54
	5.97	5.32
	6.52	5.43
	6.25	5.34
Promedio	6.22	5.38
% DE	0.21	0.11
% CV	3.44	2.03
% Diferencia	24.34	7.61

5.2.8 Selectividad

Ninguna de las muestras preparadas para la evaluación de la selectividad del método presentó en el cromatograma interferencias al tiempo de retención de los isómeros del iohexol o del estándar interno, como se muestra en la figura 9.

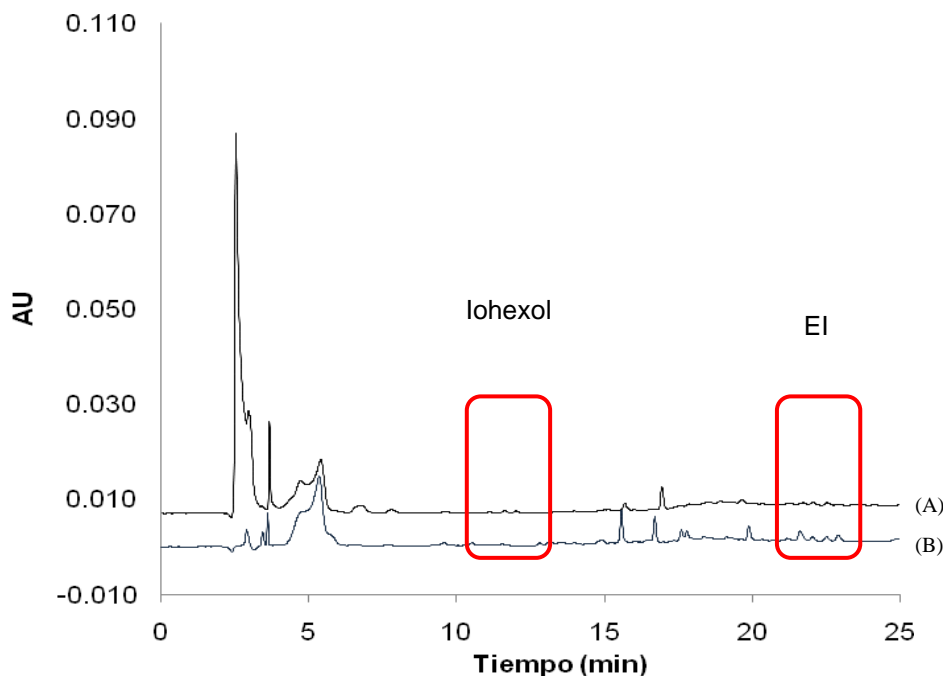


Figura 9. Evaluación de selectividad. Cromatograma de un blanco de suero (A) y un blanco de plasma (B).

Al ser el iohexol un marcador, su administración es controlada, por lo tanto es posible controlar de la misma forma los fármacos que se administran de forma concomitante, por tal motivo se decidió realizar la evaluación de fármacos de uso común que pudieran ser necesarios dar al paciente durante el estudio, ya fuera por reacciones adversas (paracetamol, diclofenaco, ácido acetilsalicílico) o por consumo del paciente (cafeína). La cafeína, el ácido salicílico, el paracetamol y el diclofenaco no presentaron ninguna interferencia con los tiempos de retención de los compuestos de interés (figura 10).

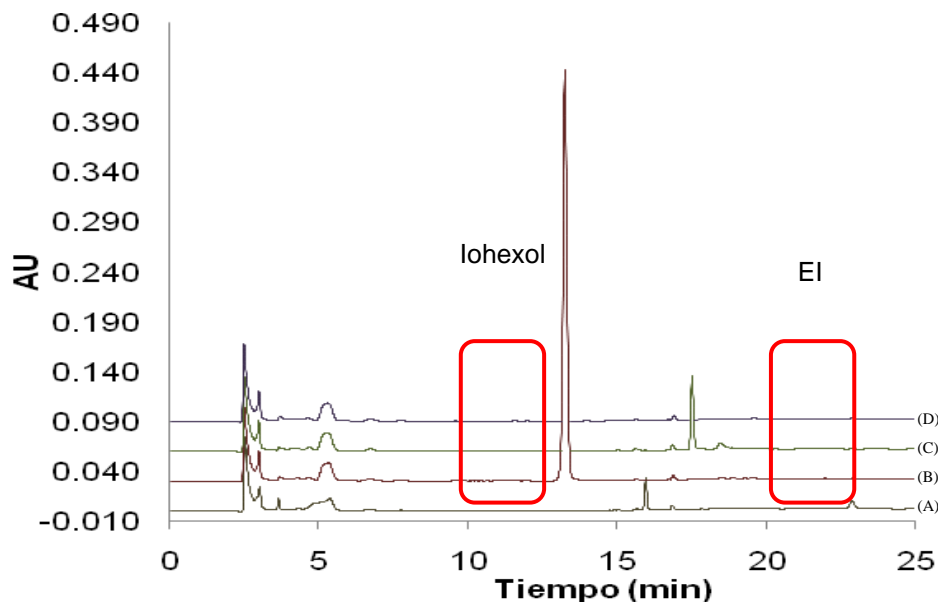


Figura 10. Evaluación de selectividad. Fármacos de uso común. Cromatograma de cafeína (A), ácido salicílico (B), diclofenaco (C) y paracetamol (D).

Para el caso de muestras lipídemicas o hemolizadas en la figura 11 podemos apreciar que no se presentan interferencias al tiempo de retención del iohexol ni al del estándar interno.

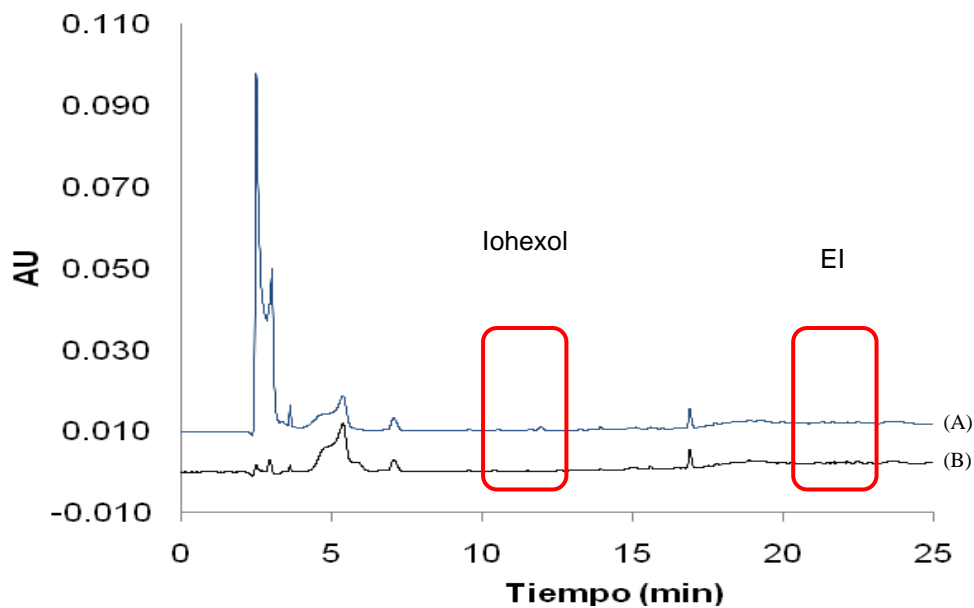


Figura 11. Evaluación de selectividad. Cromatograma de muestras lipídemicas (A) y hemolizada (B).

5.3 Validación en suero

Después de la validación realizada en plasma y debido a la información proporcionada por el grupo clínico se realizó una validación en suero.

5.3.1 Selectividad

Esta prueba se encuentra reportada en la sección 5.2.8 debido a que fue evaluada junto con las demás muestras de selectividad (figura 9).

5.3.2 Linealidad

En la figura 12 se muestra la relación respuesta contra concentración nominal del método para la cuantificación de iohexol en suero. Los valores de los datos de la pendiente y la ordenada al origen obtenidos se muestran en la tabla 25, aunado a estos datos se demuestra que el método es lineal al observar que en la tabla 26 no se presentó una diferencia de la concentración nominal y la concentración real superior al 15% en todo el intervalo de trabajo.

Las pendientes que se observan en la tabla 25 son similares a las encontradas en la validación en plasma. Por lo que se puede demostrar que tanto en plasma como en suero la respuesta en el intervalo de 10 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es la misma.

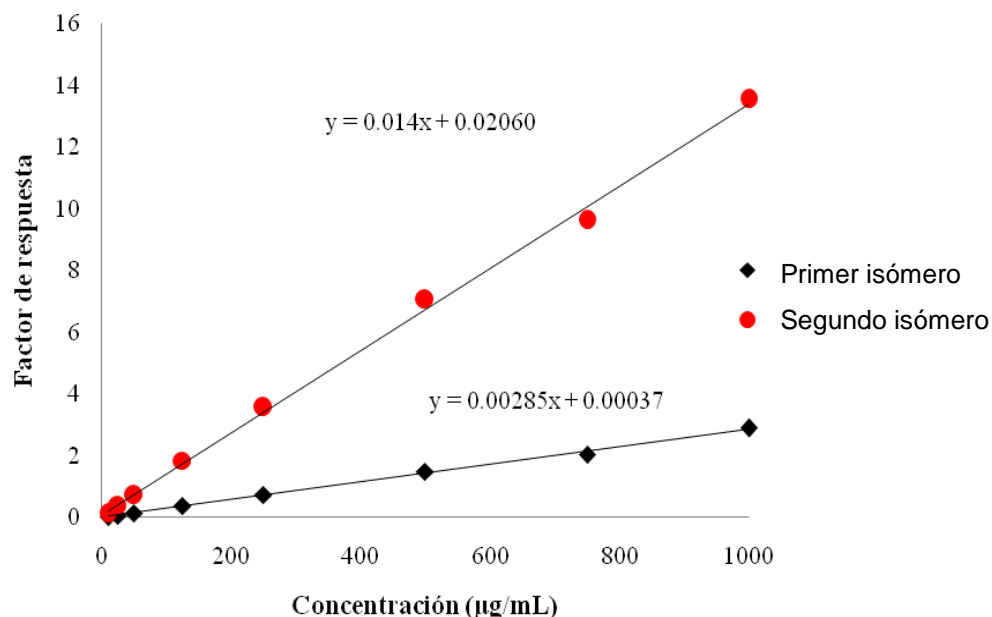


Figura 12. Linealidad del método analítico para la cuantificación de los isómeros del iohexol en suero de 10 a 1000 µg/mL.

Tabla 25. Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación para los isómeros del iohexol en suero.

Analito	Pendiente	Ordenada	r ²
Isómero 1	0.00285	0.00037	0.9984
Isómero 2	0.01360	0.02060	0.9981

Tabla 26. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de iohexol en suero.

	Concentración nominal de las muestras de suero de iohexol (µg/mL)							
	10	25	50	125	250	500	750	1000
	Concentración cuantificada de las muestras de suero de iohexol (µg/mL)							
Isómero 1	9.11	24.48	51.00	133.15	259.42	517.96	709.37	1005.52
% Diferencia	8.91	2.10	2.00	6.52	3.77	3.59	5.42	0.55
Isómero 2	8.47	25.04	52.17	134.74	261.36	519.45	709.48	999.28
% Diferencia	15.27	0.18	4.35	7.79	4.54	3.89	5.40	0.07

5.3.3 Precisión y exactitud

El coeficiente de variación encontrado para los tres niveles de concentración evaluados (30, 140 y 800 µg/mL) correspondientes a la precisión es menor al 6% (tabla 27 y 28) lo que indica que el método es reproducible para ambos isómeros en suero.

Para la exactitud la desviación fue menor al 10% como se puede apreciar en las tablas 29 y 30, por lo que al cumplir con el criterio de aceptación, se indica que el método es exacto en suero para ambos isómeros.

Tabla 27. Precisión del método analítico para la cuantificación del primer isómero del iohexol en suero.

	Concentración nominal de las muestras de suero del primer isómero del iohexol (µg/mL)		
	30	140	800
	Concentración cuantificada de las muestras de suero del primer isómero del iohexol (µg/mL)		
	30.52	142.46	870.71
	29.51	148.25	808.29
	29.15	160.66	817.06
	30.87	143.64	863.85
	28.62	159.41	816.53
Promedio	29.73	150.88	835.29
% D.E.	0.94	8.64	29.51
% C.V.	3.17	5.73	3.53

Tabla 28. Precisión del método analítico para la cuantificación del segundo isómero del iohexol en suero.

	Concentración nominal de las muestras de suero del segundo isómero del iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30	140	800
	Concentración cuantificada de las muestras de suero del segundo isómero del iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30.91	139.94	844.59
	29.40	145.61	783.45
	28.95	157.63	787.80
	30.52	140.63	827.27
	27.96	155.76	784.98
Promedio	29.55	147.91	805.62
% D.E.	1.19	8.33	28.38
% C.V.	4.03	5.63	3.52

Tabla 29. Exactitud del método analítico para la cuantificación del primer isómero del iohexol en suero.

	Concentración nominal de las muestras de suero del primer isómero del iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30	140	800
	% diferencia con respecto a la [nominal]		
	1.75	1.75	8.84
	1.65	5.89	1.04
	2.84	14.76	2.13
	2.90	2.60	7.98
	4.60	13.87	2.07
Promedio	2.75	7.77	4.41

Tabla 30. Exactitud del método analítico para la cuantificación del segundo isómero del iohexol en suero

	Concentración nominal de las muestras de suero del segundo isómero del iohexol ($\mu\text{g/mL}$)		
	30	140	800
	% diferencia con respecto a la [nominal]		
	3.04	0.04	5.57
	2.02	4.01	2.07
	3.49	12.59	1.53
	1.72	0.45	3.41
	6.79	11.25	1.88
Promedio	3.41	5.67	2.89

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método para la cuantificación de iohexol en plasma y suero por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector UV-Visible
- El método analítico desarrollado es lineal, preciso y exacto en un intervalo de concentraciones de 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ en plasma y suero, además de que presenta una recuperación absoluta cercana al 100% que es reproducible y constante. Es selectivo a muestras lipídicas, hemolizadas, así como a la adición de cafeína, ácido salicílico, diclofenaco y paracetamol.
- El analito es estable en plasma a corto plazo durante 8 horas a temperatura ambiente, y durante 50 horas cuando las muestras son procesadas y almacenadas en el automuestreador a 15°C. Es posible aplicar a las muestras 3 ciclos de congelación y descongelación sin que estas sufran ninguna degradación. A largo plazo las muestras son estables durante un mes a -70°C, lo que permite analizar muestras que hayan estado en un periodo igual o menor en almacenamiento.
- El método puede emplearse para la cuantificación de iohexol en plasma y suero humano en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y/o bioequivalencia.

Perspectivas

Este trabajo busca ser implementado en estudios farmacocinéticos en hospitales nacionales para ayudar a los pacientes que sufren una enfermedad renal a una detección oportuna y así lograr evitar posibles complicaciones. Aunado a que no existe una cura, el avance de esta enfermedad termina con la calidad de vida de la mayoría de las personas que la padecen, por lo que su pronta detección podría evitar un gasto en el sistema de salud y mejorar la forma de vida de muchas personas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arcelloni C., Lanzi R., Pedercini S., Molteni G., Fermo I., Pontiroli A., Paroni R. (2001) High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *J. Chromatograph B* 763: 195-200
- 2 Cavalier E., Rozet E., Dubois N., Charlier C., Hubert P., Chapelle J.P., Krzesinski J.M., Delanaye P. (2008) Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: Validation, risk and uncertainty assessment. *Cli. Chim. Acta.* 396: 80-85
- 3 Drug Bank (2010) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01362>
- 4 Edelson J., Palace G., Park G. (1983) High-performance liquid chromatographic determination of iohexol in plasma, urine and feces. *J. Chromatograph B* 274: 428-433
- 5 Essential drug information MIMS Singapore (2010) <http://www.mims.com>
- 6 Farthing D., Sica D., Fakhry I., Larus T., Ghosh S., Farthing C., Vranian M., Gehr T. (2005) Simple HPLC-UV method for determination of iohexol, iohalamate, p-aminohippuric acid and n-acetyl-p-aminohippuric acid in human plasma and urine with ERPF, GFR and ERPF/GFR ratio determination using colorimetric analysis. *J. Chromatograph.* 826: 267-272
- 7 FDA Guidance for industry, Bionalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Reserch (CEDER) (2010), <http://www.fda.gov/cder/quality/quality7index.htm>.
- 8 Foster S., Sovak M. (1988) Isomerism in iohexol and ioxilan. Analysis and implications. *Invest. Radiol.* 1: 106-109
- 9 Francisco ÁLM., De la Cruz J.J., Cases A., Figuera M., Egocheaga M.I., Górriz J.I., Llisterri J.I., Marín R., Martínez A. (2007) Prevalencia de insuficiencia renal en Centros de Atención Primaria en España: Estudio EROCAP. *Nefrología.* 27 (3):300-312
- 10 Gaspari F., Perico N., Matalone M., Signorini O., Azzollini N., Mister M., Remuzzi G. (1998) Precision of plasma clearance of iohexol for estimation of GFR in patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 9: 310–313
- 11 Guyton A.C., Hall J.E. (2006) *Medical Physiology* 17^aed. Elsevier España 404-415
- 12 Inserra F., Cusumano A.M. (2007) Enfermedad renal crónica: Necesidad de implementar programas para su detección precoz y prevención de su progresión. *Nefrología, diálisis y trasplante.* 27 (3) 113-118
- 13 Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2005) <http://www.inegi.org.mx>. Palabra clave: Enfermedad renal crónica.
- 14 Karidas Th., Avgerinos A., Malamataris S. (1993) Extractionless HPLC Method for Determination of Naproxen in Human Plasma and Urine. *Analytical Letters.* 26: 2341-2348
- 15 Lee S., Chun M.R., Kim D.J., Kim J. (2006) Determination of iohexol clearance by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatograph B* 839: 124-129
- 16 McPhee S., Papadakis M. (2009) *Lange Diagnóstico clínico y tratamiento* 48^a ed. McGraw-Hill. México 797-811. España 404-415
- 17 Mezzano S.A., Claudio A.E. (2005) Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev. Méd. Chile* 133: 338-348
- 18 Miyagawa Y., Takemura N., Hirose H. (2010) Evaluation of a single sampling method

- for estimation of plasma iohexol clearance in dogs and cats with various kidney functions. *J. Vet. Med. Sci.* 72(3): 271-278
- 19 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas. Diario Oficial de la federación 7 de mayo 1999.
 - 20 Polson C., Sarkar P., Incedon B., Raguvaran V., Grant R. (2003) Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatograph B.* 785: 263-275
 - 21 Rocco M.V., Buckalew V.M. Jr, Moore L.C., Shihabi Z.K. (1996) Measurement of glomerular filtration rate using nonradioactive iohexol: comparison of two one-compartment models. *Am. J. Nephrol.* 16(2):138-143
 - 22 Rouessac F., Rouessac A. (2003) Análisis químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas. 5ª ed. Mc Graw Hill. España 7-121
 - 23 Rudnick M.R., Goldfarb S., Wexler L., Ludbrook P.A., Murphy M.J., Halpern E.F., Hill J.A., Winniford M., Cohen M.B., VanFossen D.B. (1995) Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The Iohexol Cooperative Study. *Kidney Int.* 47(1): 254-261
 - 24 Schwartz G.J., Furth S., Cole S.R., Warady B., Munoz A. (2006) Glomerular filtration rate via plasma iohexol disappearance: pilot study for chronic kidney disease in children. *Kidney Int.* 69: 2070-2077
 - 25 Schwartz G.J., Work D.F. (2009) Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4(11): 1832-1843
 - 26 Shaw D.D., Kido D.K., Stroshane R.M., Palace G.P., Sahler L. (1985) Pharmacokinetics and excretion of iohexol after lumbar myelography in man. *Invest. Radiol.* 20 (6) 632-637
 - 27 Skoog D., West D.M., Hollor F.J., Crouch S.R. (2001) Química analítica 7ª ed. McGraw-Hill. México, 658-684
 - 28 Soman R., Zahir H., Akhlaghi F. (2005) Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *J. Chromatograph B* 816: 339-343
 - 29 Stevens L.A., Levey A.S. (2009) Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (11): 2305-2313
 - 30 Tan G.D., Lewis A.V., James T.J., Altmann P., Taylor R.P., Levy J.C. (2002) Clinical usefulness of cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetes: Reproducibility and accuracy compared with standard measures and iohexol clearance. *Diabetes Care* 25: 2004–2009
 - 31 Wang C.L., Cohan R.H., Ellis J.H., Caoili E.M., Wang G., Francis I.R. (2008) Frequency, outcome, and appropriateness of treatment of nonionic iodinated contrast media reactions. *AJR Am J Roentgenol.* 191(2):409-415