



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO,
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION
(CLAR) PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

HOMERO OMECIHUATL GARCIA HERNANDEZ



MEXICO, D.F

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. **HELGI HELEN JUNG COOK**
VOCAL: M. en C. **LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ**
SECRETARIO: M. en F. **LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE**
1er SUPLENTE: M. en C. **JOSÉ MANUEL MORALES HERNÁNDEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2 DE FARMACOCINÉTICA,
EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN,
FACULTAD DE MEDICINA U.N.A.M.

ASESRO DEL TEMA:

M. en F. **LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE**

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B ABRAHAM AYALA BAUTISTA

SUSTENTANTE:

HOMERO OMECIHUATL GARCÍA HERNANDEZ

***PATER NOSTER QUI ES IN CAELIS SANCTIFICETUR NOMEN TUUM
ADVENIAT REGNUM TUUM, FIAT VOLUNTAS TUA SICUT IN CAELO
ET IN TERRA, PANEM NOSTRUM QUITIDIANUM DANOVIS ODIE, ET
DIMITE NOBIS DEBITA NOSTRA SICUT ET NOS DIMITIMUS
DEBITORIBUS NOSTRIS, NE NOS INDUCAS IN TENTATIONEM SED
LIBERANOS A MALO. AMEN***

A MIS SEÑORES PADRES:

DON ANSELMO Y DOÑA GISELA:

Deseo que con todo el corazón que mi triunfo como

Hombre y como profesionista lo sientan como el suyo propio.

Con amor, admiración y respeto: Homero Omecihuatl

RESUMEN

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad optimizar y validar un método analítico para la cuantificación de clavulanato en plasma, por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que pueda ser aplicado en un estudio de farmacocinética en población mexicana.

El método analítico fue validado de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

El método analítico optimizado y validado se basó en un método de desproteinización con metanol y una extracción líquido-líquido, utilizando diclorometano como disolvente. Una alícuota de 80 μL de la fase acuosa extraída se derivatizó con 20 μL de una solución de imidazol 3.0 M para formar un complejo con el que es posible cuantificar la cantidad de clavulanato existente en las muestras plasmáticas, posteriormente se procedió a inyectar 20 μL de la muestra al sistema cromatográfico, bajo las siguientes condiciones: se utilizó una columna Waters Xterra RP8 de 250X4.6 mm, un detector de arreglo de diodos UV/VIS Waters 996, como fase móvil se utilizó solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 al 100%, una temperatura de 29°C, velocidad de flujo de 1.0 mL/min, una longitud de onda de 315 nm, y finalmente un tiempo de corrida de 8.0 minutos.

Los resultados mostraron que el método analítico optimizado y validado, fue lineal en el intervalo de concentraciones de 1.15-5.0 $\mu\text{g/mL}$, preciso (repetible y reproducible) tanto en un día como en varios, exacto, selectivo, tolerante ante pequeñas variaciones deliberadas de temperatura, estable solo hasta los seis minutos después de procesar las muestras, así como estable en congelación al menos 44 días.

De acuerdo a lo anterior se consideró que el método analítico optimizado y validado, es confiable para la cuantificación de clavulanato en plasma

INDICE

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	7
2. GENERALIDADES.....	9
2.1 MONOGRAFÍA DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO.....	9
2.1.1 Propiedades químicas.....	10
2.1.1.1 Nombre químico del Ácido clavulánico.....	10
2.1.1.2 Nombre químico del Clavulanato de potasio.....	10
2.1.1.3 Fórmula condensada del ácido clavulánico.....	10
2.1.1.4 Fórmula desarrollada del ácido clavulánico.....	10
2.1.1.5 Peso molecular del ácido clavulánico.....	11
2.1.1.6 Peso molecular del clavulanato de potasio.....	11
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	11
2.1.2.1 Descripción.....	11
2.1.2.2 Solubilidad.....	11
2.1.2.3 Punto de fusión.....	11
2.1.2.4 pKa.....	11
2.1.3 Propiedades farmacológicas.....	11
2.1.3.1 Mecanismo de acción.....	11
2.1.3.2 Usos	12
2.1.3.3 Dosis y vías de administración.....	13
2.1.3.4 Efectos adversos.....	13
2.1.3.5 Interacciones y contraindicaciones.....	13
2.1.3.6 Precauciones y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad.....	13
2.1.3.7 Sobredosificación o ingesta accidental: manifestación y manejo (antídotos).....	14
2.1.4 Farmacocinética.....	14
2.1.4.1 Absorción.....	14
2.1.4.2 Distribución.....	14
2.1.4.3 Metabolismo.....	14
2.1.4.4 Eliminación.....	15
2.1.5 Farmacodinamia en humanos.....	15

2.2	VALIDACIÓN DE METODOS BIOANALÍTICOS.....	15
2.2.1	Linealidad.....	15
2.2.2	Precisión.....	16
2.2.2.1	Repetibilidad.....	16
2.2.2.2	Reproducibilidad intralaboratorio.....	17
2.2.3	Exactitud.....	17
2.2.4	Límite de cuantificación.....	17
2.2.5	Límite de detección.....	18
2.2.6	Selectividad.....	18
2.2.7	Recuperación absoluta.....	18
2.2.8	Estabilidad de la muestra analítica.....	18
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLAVULANATO EN PLASMA.....	18
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	22
3.1	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR CLAVULNATO EN PLASMA.....	22
3.1.1	Material y equipo.....	22
3.1.2	Reactivos.....	22
3.1.2.1	Sustancias de referencia.....	22
3.1.3	Preparación de soluciones	23
3.1.4	Preparación de soluciones de referencia.....	23
3.1.5	Preparación de la curva patrón.....	24
3.1.6	Optimización de la fase móvil, columna y temperatura de ensayo.....	25
3.1.7	Optimización del método de extracción.....	26
3.2	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA.....	27
3.2.1	Validación del método.....	27
3.2.1.1	Linealidad del método.....	27
3.2.1.2	Precisión del método.....	27
3.2.1.2.1	Repetibilidad del método.....	27
3.2.1.2.2	Reproducibilidad del método.....	28

3.2.1.3	Exactitud del método.....	28
3.2.1.4	Límite de cuantificación.....	28
3.2.1.5	Límite de detección.....	28
3.2.1.6	Selectividad.....	29
3.2.1.7	Recuperación absoluta.....	29
3.2.1.8	Estabilidad.....	29
3.2.1.9	Tolerancia.....	30
3.2.1.10	Aplicación de la metodología analítica optimizada y validada para cuantificar clavulanato en plasma.....	30
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
4.2	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLAVULANATO EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	32
4.1.1	Optimización de la fase móvil, columna y temperatura d ensayo.....	32
4.1.2	Optimización del método de extracción.....	33
4.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLAVULANATO EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	34
4.3.1	Validación del método analítico.....	34
4.3.1.1	Linealidad del método.....	34
4.3.1.2	Precisión y exactitud del método.....	36
4.3.1.2.1	Repetibilidad.....	36
4.3.1.2.2	Reproducibilidad.....	37
4.3.1.3	Límite de cuantificación.....	38
4.3.1.4	Límite de detección.....	38
4.3.1.5	Selectividad.....	39
4.3.1.6	Recobro o recuperación absoluta.....	40
4.3.1.7	Estabilidad.....	41
4.3.1.8	Tolerancia.....	45
4.3.1.9	Aplicación de la metodología analítica optimizada y validada para cuantificar clavulanato en plasma.....	46
5	CONCLUSIONES.....	49
6	BIBLIOGRAFÍA.....	51
7	APENDICE I.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de las β -lactamasas.....	9
Tabla 2.	Preparación de la curva de calibración de clavulanato de litio.....	25
Tabla 3.	Condiciones cromatográficas.....	32
Tabla 4.	Linealidad del método.....	34
Tabla 5.	Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar clavulanato en plasma.....	36
Tabla 6.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de clavulanato en plasma.....	37
Tabla 7.	Límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de clavulanato en plasma.....	38
Tabla 8.	Recobro del Clavulanato de plasma humano.....	40
Tabla 9.	Estabilidad del Clavulanato en ciclos congelación-descongelación.....	41
Tabla 10.	Estabilidad del Clavulanato a temperatura ambiente.....	42
Tabla 11.	Estabilidad de la muestra procesada a los 15,30 y 45 minutos.....	43
Tabla 12.	Estabilidad de la muestra procesada a los 0 y 6 minutos.....	43
Tabla 13.	Estabilidad del Clavulanato en congelación.....	44
Tabla 14.	Evaluación de la tolerancia del método.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Estructura molecular del ácido clavulánico.....	10
Figura 2.	Mecanismo de inactivación del ácido clavulánico, sobre las β -lactamasas.....	12
Figura 3.	Esquema de extracción para cuantificar clavulanato en plasma.....	33
Figura 4.	Linealidad del método para cuantificar clavulanato en plasma.....	35
Figura 5.	Selectividad del método para cuantificar clavulanato en plasma.....	39
Figura 6:	Gráfica de la concentración plasmática promedio de clavulanato versus tiempo, después de la administración de una dosis oral única de 125 mg de CLAVULANATO.....	46
Figura 7:	Gráfica del logaritmo de la concentración plasmática promedio de clavulanato versus tiempo, después de la administración de una dosis oral única de 125 mg de CLAVULANATO.....	47

INTRODUCCIÓN
Y
OBJETIVOS

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Uno de los logros importantes de las ciencias farmacéuticas durante los últimos años, ha sido el alcanzar un conocimiento más cabal en el ámbito de la biofarmacia, logrando así identificar la influencia de los factores fisicoquímicos de un fármaco y la forma farmacéutica en la que se administra, sobre su efecto terapéutico o tóxico. (1)

Para lograr lo anterior es importante contar con metodologías analíticas validadas que permitan cuantificar a los fármacos en estudio de manera confiable en fluidos biológicos.

El clavulanato es un fármaco de amplio uso en la terapéutica en combinación con antibióticos betalactámicos, debido a la acción que posee de inhibir a las β -lactamasas.

La determinación de clavulanato en plasma, es una actividad extremadamente compleja, ya que las propiedades fisicoquímicas de este fármaco y las concentraciones tan bajas (del orden de los $\mu\text{g/mL}$) que suelen encontrarse de manera habitual en dicho fluido biológico, no permite el uso de metodologías de análisis tradicionales, como es la cromatografía de líquidos con detección ultravioleta.

Una estrategia para lograr lo anterior, es realizar una reacción entre el clavulanato e imidazol, cuyo compuesto resultante sí puede ser analizado a una longitud de onda de 315 nm.

Por tal motivo, los objetivos planteados para la realización de este proyecto se muestran a continuación:

- Optimizar un método analítico por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar clavulanato en plasma.
- Validar el método analítico optimizado de acuerdo a los criterios de aceptación de la NOM 177-SSA-1-1998.

GENERALIDADES

2 GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFÍA DEL CLAVULANATO-ACIDO CLAVULÁNICO

Las β -lactamasas son enzimas producidas por algunos microorganismos y son la causa principal de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, llamense penicilinas, cefalosporinas o monobactamas. (2)

La información genética que codifica para la formación de β -lactamasas se encuentra presente en cromosomas y plásmidos de resistencia de ciertos microorganismos gram positivos y gram negativos. De acuerdo con el sustrato las β -lactamasas se dividen en *penicilinasas* y *cefalosporinasas*. Las β -lactamasas se han subdividido de acuerdo al sitio y localización de su información genética y se resume en la tabla 1. (2)

TABLA 1: clasificación de las β -lactamasas.

Sitio de almacenamiento de la información genética	Cromosomas			Plasmidos de resistencia	
	I	II	IV	III	V
Clase					
Sustrato	Cafalosporinas	Penicilinas	Penicilinas Cefalosporinas	Penicilinas Cefalosporinas Monobactamas	Isoxazoles Penicilinas

Existen algunas moléculas que tienen la capacidad de unirse a las β -lactamasas e inactivarlas evitando así la destrucción de los antibióticos β -lactámicos que sirven de sustrato para dichas enzimas. Los inhibidores de β -lactamasas tienen mayor acción contra β -lactamasas codificadas por plásmidos. Dentro de estos inhibidores se encuentra el ácido clavulánico.

En formulaciones farmacéuticas el ácido clavulánico es administrado en forma de sal de potasio (Clavulanato de potasio), que en medio acuoso y en condiciones ligeramente básicas, se convierte a su forma ionizada. El ión clavulanato puede captar un protón del medio, para formar su ácido correspondiente (ácido clavulánico).

En la naturaleza el ácido clavulánico es producido por *Streptomyces clavuligerus*. Tiene poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero es un inhibidor de las β -lactamasas producidas por una amplia variedad de microorganismos grampositivos y gramnegativos. El ácido clavulánico se absorbe adecuadamente después de ser ingerido y también puede aplicarse por vía parenteral. Se le ha combinado en formulaciones farmacéuticas en su forma de sal como clavulanato de potasio o clavulanato de sodio, junto con la amoxicilina en preparados orales y con la ticarcilina en preparados parenterales.³ En donde el clavulanato se une específicamente a las enzimas β -lactamasas bacterianas inhibiéndolas, en forma progresiva, evitando su acción deletérea sobre la amoxicilina que ejerce su efecto antibiótico sin la interferencia de las β -lactamasas.

2.1.1 PROPIEDADES QUÍMICAS

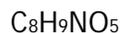
2.1.1.1 Nombre químico del ácido Clavulánico⁽⁴⁾

3-(2-hidroxiethylidieno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-ácido carboxílico.

2.1.1.2 Nombre químico del Clavulanato de potasio⁽⁵⁾

(Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxiethylidieno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0] heptano-2-carboxilato de potasio.

2.1.1.3 Fórmula condensada del ácido clavulánico.⁽⁴⁾



2.1.1.4 Fórmula desarrollada del ácido clavulánico.

En la figura 1 se muestra la estructura molecular del Ácido Clavulánico

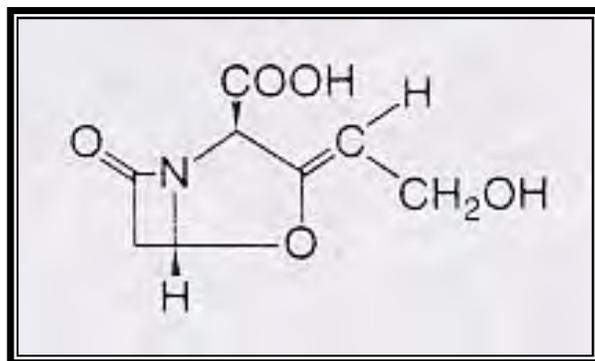


FIGURA 1: Estructura molecular del Ácido Clavulánico.

2.1.1.5 Peso molecular del ácido clavulánico. (4)

199.2 g/mol

2.1.1.6 Peso molecular del clavulanato de potasio. (6)

237.25 g/mol

2.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

2.1.2.1 Descripción. (5)

Las sales del Clavulanato de potasio se describen como polvo blanco , higroscópico.

2.1.2.2 Solubilidad. (5)

El Clavulanato de potasio es fácilmente soluble en agua; ligeramente soluble en alcohol; poco soluble en acetona.

2.1.2.3 Punto de fusión. (7)

117.5-118 °C en su forma de *p*-nitrobencil ester (C₁₅H₁₄N₂O₇)

2.1.2.4 Pka (8).

2.7

2.1.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.

2.1.3.1 Mecanismo de acción. (2)

El ácido clavulánico posee un anillo β-lactámico y es estructuralmente similar a la penicilina y cefalosporinas. Se une de manera irreversible a β-lactamasas tipo II ,V y especialmente a aquellas que son codificadas por plásmidos de resistencia.

El ácido clavulánico interactúa con el centro activo de las β-lactamasas, dando paso a una reacción de hidrólisis sobre del anillo β-lactámico del ácido clavulánico, con esta apertura del anillo, la enzima es ligada e inactivada, evitando así su ataque hidrolítico sobre antibióticos con anillos β-lactámicos.

En la figura 2 se muestra el mecanismo de inactivación del ácido clavulánico sobre las β-lactamasas.

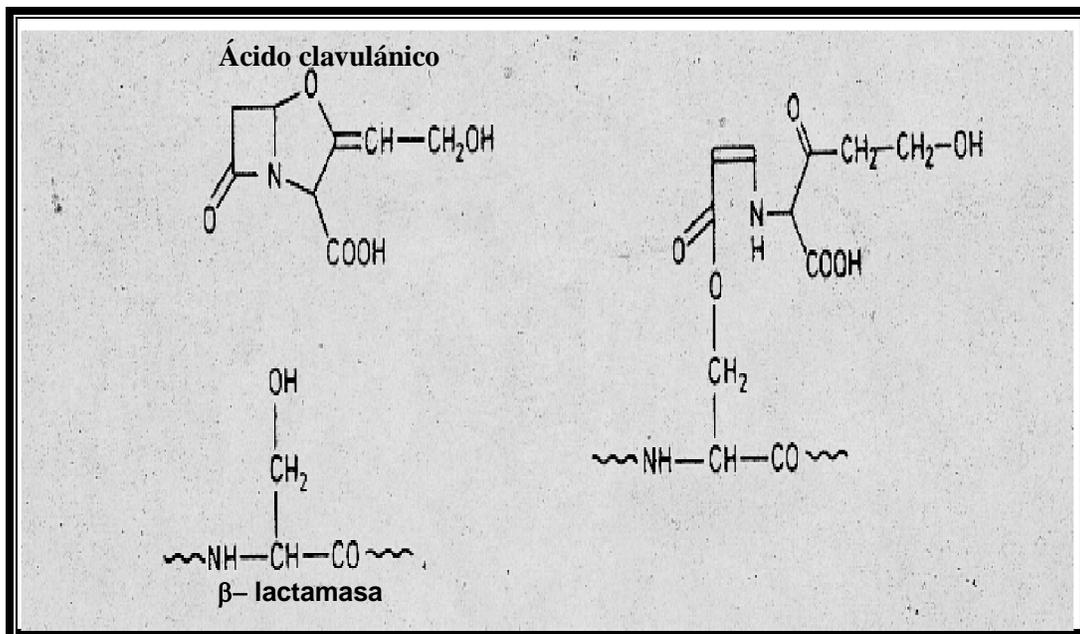


FIGURA 2: Mecanismo de inactivación del ácido clavulánico sobre las β-lactamasas

2.1.3.2 Usos . (9)

En presentaciones farmacéuticas, se utiliza la combinación amoxicilina/clavulanato de potasio, en donde el Clavulanato sólo tiene actividad antibacteriana débil y no afecta al mecanismo de acción de la amoxicilina.

Esta combinación cubre un amplio rango de microorganismos tanto grampositivos como gramnegativos, aerobios y anaerobios, productores o no productores de betalactamasas, aún resistentes a penicilinas, ampicilina y amoxicilina sola. Se emplea en los siguientes procesos infecciosos:

- Infecciones del tracto respiratorio superior como otitis media aguda, sinusitis aguda, amigdalitis, faringitis.
- Infecciones leves o moderadas del tracto respiratorio inferior, principalmente exacerbaciones de bronquitis aguda, bronquitis crónica, bronquiectasias infectadas y neumonía.
- Infecciones bucodentomaxilares como abscesos, gingivitis, parodontitis.
- Infecciones del tracto urinario como cistitis, pielonefritis, aun resistentes a la amoxicilina sola.
- Infecciones de piel y tejidos blandos como impétigo, erisipela, heridas infectadas por gérmenes susceptibles, incluyendo *Staphylococcus aureus* productor de betalactamasas.
- Enfermedades sexualmente transmitidas como gonorrea y chancroide.

- Infecciones ginecológicas y obstétricas, como enfermedad pélvica inflamatoria y vaginosis.

2.1.3.3 Dosis y vía de administración. ⁽⁹⁾

Oral.

Adultos: Una tableta (amoxicilina, 500 mg y ácido clavulánico, 125 mg) cada 8 horas.

Niños: La dosis diaria recomendada en niños es amoxicilina, 500 mg y ácido clavulánico, 62.5 mg) cada 8 horas. ⁽⁹⁾

2.1.3.4 Efectos adversos. ⁽⁹⁾

Las reacciones adversas de la combinación amoxicilina/clavulanato de potasio son similares a las producidas por la amoxicilina sola; sin embargo, las reacciones gastrointestinales pueden ser más frecuentes debido a la mayor absorción del clavulanato y se manifiestan como, náusea, vómito, diarrea e indigestión o bien se presentan reacciones de hipersensibilidad como: erupción cutánea, urticaria y anafilaxia. La administración con los alimentos disminuye los efectos secundarios gastrointestinales.

2.1.3.5 Interacciones y contraindicaciones. ⁽⁹⁾

Algunos autores postulan que la cimetidina puede incrementar el pH luminal y por tanto la solubilidad de la amoxicilina y ácido clavulánico disminuyendo su eficacia. Puede interferir con los anticonceptivos en la circulación enterohepática de los estrógenos.

La amoxicilina/clavulanato de potasio está contraindicada en pacientes que presentan hipersensibilidad conocida a cualquier otra penicilina o a las cefalosporinas. No debe administrarse en pacientes con mononucleosis infecciosa porque muchos pacientes desarrollan exantema durante el tratamiento.

La combinación se usará con precaución en pacientes con daño renal porque se excreta en la orina; en caso de insuficiencia renal moderada a grave se requiere disminuir la dosis.

2.1.3.6 Precauciones y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad. ⁽⁹⁾

No se han reportado efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos o sobre la fertilidad con esta combinación.

2.1.3.7 Sobredosificación o ingesta accidental: manifestaciones y manejo (antídotos).

Entre los signos clínicos de sobredosis se encuentra la sensibilidad neuromuscular o convulsiones. En un paciente con buena ingesta de líquidos aún cuando tenga altas concentraciones del medicamento en la orina es poco probable que tenga algún problema. Pero puede ocasionar cristaluria, la cual debe manejarse con una ingesta adecuada de líquidos. En caso de reacción alérgica de tipo anafiláctico se recomienda la administración de adrenalina por vía intramuscular, asimismo, podrían utilizarse otros recursos como esteroides, antihistamínicos y otros. (9)

La amoxicilina/clavulanato de potasio puede eliminarse con hemodiálisis.

2.1.4 FARMACOCINÉTICA.

2.1.4.1 Absorción. (9)(10)

La combinación amoxicilina trihidratada-clavulanato de potasio administrada por vía oral, se absorbe bien por el tracto gastrointestinal, 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. Después de una dosis oral (125 mg de ácido clavulánico), alcanza una concentración plasmática máxima de 2.55 a 3.5 µg/ml, en el intervalo de una a dos horas y media.

La biodisponibilidad del ácido clavulánico es 60%.

2.1.4.2 Distribución. (10)

El clavulanato de potasio se distribuyen en el líquido pleural, pulmones y líquido peritoneal; alcanzan altas concentraciones en orina. El clavulanato cruza la placenta y se detectan en concentraciones bajas en la leche materna. La unión a proteínas es 30% .

2.1.4.3 Metabolismo. (10)

No se ha identificado por completo el destino metabólico del clavulanato , aunque se sabe que es sujeto a hidrólisis y descarboxilación.

2.1.4.4 Eliminación. ⁽¹⁰⁾

El clavulanato posee una vida media de eliminación de alrededor de 60 min, la cual se prolonga en forma progresiva de acuerdo al grado de daño renal. La principal vía de eliminación es urinaria y a las 6 horas se recupera entre el 30-50% del ácido clavulánico. El ácido clavulánico se excreta por filtración glomerular. El probenecid retarda la excreción de amoxicilina pero no la de ácido clavulánico.

2.1.5 FARMACODINAMIA EN HUMANOS. ⁽¹⁰⁾

Los betalactámicos ejercen su efecto inhibiendo la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana. El sitio blanco específico es la reacción de transpeptidación que cataliza el paso en la formación de enlaces cruzados para la biosíntesis de los peptidoglicanos, por lo que son bactericidas. Con el descubrimiento de betalactamasas se encontró el principal mecanismo de resistencia antimicrobiana contra los betalactámicos, ya que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, produciendo derivados ácidos carentes de actividad antibacteriana.

Los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico, se unen en forma irreversible a la betalactamasa evitando la degradación del antibacteriano por estas enzimas.

2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS:

La validación es la evidencia experimental documentada que incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica, es adecuado para cumplir con el propósito para el cual fue diseñado. ⁽¹¹⁾

Antes de emplear un método para un análisis de muestras, el analista debe obtener suficientes datos que evalúen el desempeño y la capacidad del método para conseguir resultados confiables, esto se lleva a cabo mediante la validación del método. ⁽¹¹⁾

En nuestro país la NOM-177-SSA-1-1998 ⁽¹¹⁾, establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, recomienda validar un método analítico bajo los siguientes criterios: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, estabilidad de la muestra analítica, recuperación absoluta y tolerancia.

2.2.1 LINEALIDAD. ⁽¹¹⁾

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. El criterio para considerar a un método como lineal se da calculando un coeficiente de correlación.

El coeficiente de correlación se obtiene mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en donde se utiliza la siguiente fórmula:

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

Donde : r = coeficiente de correlación

x = concentración

y = respuesta

2.2.2 PRECISIÓN. ⁽¹¹⁾

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

2.2.2.1 Repetibilidad ⁽¹¹⁾

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para considerar un método repetible, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15% en fluidos biológicos. El cálculo del coeficiente de variación se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$C.V = (D.E / \bar{x}) \times 100$$

$$D.E = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_1 - \bar{x})^2}$$

Donde:

D.E = desviación estándar
x = concentración promedio
x = concentración individual
n = número de datos

2.2.2.2 Reproducibilidad intralaboratorio (11)

Es la precisión de un método analítico en donde se expresa la variación obtenida entre las determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como los días, equipo, columnas o analista. Un método es reproducible siempre y cuando el coeficiente de variación no sea mayor al 15%. Evaluado mínimo durante tres días

2.2.3 *EXACTITUD* (11)

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina mediante la desviación absoluta del valor promedio de cada nivel de concentración, con respecto a la concentración nominal de la muestra y para calcularla se emplea la siguiente ecuación:

$$Desv.abs\% = 100 \times \frac{|Cantidad\ adicionada - Cantidad\ recuperada|}{Cantidad\ adicionada}$$

para que el método se considere como exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración deben encontrarse dentro del 15% del valor nominal de concentración.

2.2.4 *LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.* (11)

Se define como la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse, cumpliendo con la exactitud y precisión establecidas en el método. Se establece que tiene validez como límite de cuantificación cuando el valor promedio de las cinco repeticiones se encuentran dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 20%.

2.2.5 LÍMITE DE DETECCIÓN ⁽¹¹⁾

Se define como la mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Como límite de detección se considera aquella concentración cuya respuesta es de 3 veces la señal del ruido de fondo.

2.2.6 SELECTIVIDAD. ⁽¹¹⁾

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

2.2.7 RECUPERACIÓN ABSOLUTA. ⁽¹¹⁾

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Se evalúa determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración, el cual debe de ser consistente en cada nivel dentro del rango de concentraciones.

2.2.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA. ⁽¹¹⁾

Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta, el cual debe ser menor al 15%. Con esta prueba se evalúan las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.

2.3 METODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CLAVULANATO EN PLASMA

En la actualidad se han reportado varios métodos para la cuantificación de Clavulanato en plasma, entre ellas se encuentran métodos polarográficos como el descrito por Pérez y Martín ⁽¹²⁾, espectrofotométricos UV como el descrito por Bird y Gasson ⁽¹³⁾, amperométrico desarrollado por Aghazade y Kazemifard ⁽¹⁴⁾ y por último la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

De estas cuatro variantes, las tres primeras han resultado ser metodologías poco específicas, y al cuarto método se le han realizado varias adaptaciones debido a que el Clavulanato es un compuesto inestable en plasma y lábil a cambios bruscos de temperatura y pH dentro de esta matriz, lo que lo convierte en un fármaco difícil de cuantificar por CLAR.

Dentro de la metodología de cuantificación por CLAR se encuentran las siguientes variantes:

1. Hoizey y cols ⁽¹⁵⁾ , diseñaron un método de cuantificación de Clavulanato en plasma por CLAR, utilizando el siguiente sistema: columna fase reversa 5 μ m 100 RP8, 200x4 mm, detección UV a 220 nm, una fase móvil compuesta por Acetonitrilo-solución amortiguadora de fosfatos-solución de trimetilamonio, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El sistema de extracción utilizado fue líquido-líquido iniciada por una desproteización del plasma con metanol y separación de componentes por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, inyectando 20 μ L de sobrenadante directamente al sistema cromatográfico.

Los autores reportan un tiempo de retención de 9.50 min, un coeficiente de correlación (r) de 0.998 al evaluar la linealidad en el intervalo de 0.3125 a 10 mg/L.

2. Tsou y Wu ⁽¹⁶⁾, diseñaron un método para cuantificar Clavulanato, por CLAR, usando como sistema cromatográfico una columna de β -ciclodextrinas (Cyclobond I, 250x4.6 mm), una fase móvil compuesta por metanol:solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5 (35:65 v/v), detección UV-VIS a 225 nm. Bajo estas condiciones los autores obtuvieron un tiempo de retención de 10.4 min., un recobro de 99.5% y un coeficiente de correlación (r) de 0.9962.

3. Foulstone y Reading ⁽¹⁷⁾., diseñaron un método para cuantificar Clavulanato en plasma por CLAR, basado en una reacción de derivatización entre el Clavulanato e imidazol, reacción que produce un cromógeno proporcional a la cantidad de clavulanato contenido en la matriz biológica que se detecta a 311 nm.

El cromógeno se detectó utilizando el siguiente sistema: El método de extracción utilizado fue líquido-líquido utilizando diclorometano como disolvente de extracción se utilizó una columna C₁₈ μ -Bondapak de 25x4.6 mm, detector UV de arreglo de diodos a una longitud de onda de 311 nm, una fase móvil compuesta por solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1M pH 3.2 y metanol (94:6 v/v), a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min. El autor reporta un límite de detección de 0.1 μ g/mL.

4. Kennet y cols. ⁽¹⁸⁾ Diseñan un método para cuantificar Clavulanato en plasma y orina por CLAR, utilizando la misma reacción de derivatización de Fulston y Reading ⁽¹⁶⁾, modificando los siguientes parámetros: Se utilizó un método de extracción sólido-líquido con cartuchos Sep-Pak y como reconstituyente metanol-agua (50:50 v/v), una columna C₁₈ μ -Bondapak, detector UV-VIS a una longitud de onda de 313 nm, una fase móvil compuesta por solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.5 M-metanol (75:25 v/v), pH 3.8 y una velocidad de flujo de 2.0 mL/min.

5. Martín C., Mallet M., Bernard S. ⁽¹⁹⁾. Utilizan un método basado igualmente en la reacción de derivatización de Fulston y Reading ⁽¹⁶⁾, realizando las siguientes modificaciones: el tratamiento de las muestras plasmáticas inicia con la adición de una solución de imidazol 3.0 M pH 6.8-citrato de amonio 0.1 M, para posteriormente realizar una desproteinización con 1.0 mL de acetonitrilo, posteriormente las muestras fueron extraídas con 3.0 mL de diclorometano. De la fase acuosa se tomaron 50 μ L que fueron inyectados al sistema cromatográfico compuesto por un detector UV, precolumna LiChrospher RP₁₈ E; 5- μ m 25x4 mm, columna de análisis LiChrospher RP₁₈ E; 5- μ m 125x4 mm, una longitud de onda de 311 nm, como fase móvil se utilizó solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.01 M pH 3.2:acetonitrilo (96:4 v/v), a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min. Los autores reportan un límite de detección de 0.1 μ g/mL.

De los cinco métodos descritos en la literatura, se utilizó como modelo el método de Martín y cols.⁽¹⁹⁾. Realizándole las modificaciones que se detallaron en la parte experimental.

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA

3.1.1 MATERIAL Y EQUIPO

- Agitador Vortex tipo 37600 Mixer Maxi Mix II
- Balanza analítica OHAUS modelo AS-120
- Potenciómetro OAKTON, pH 1000 series
- Centrifuga Marathon modelo 26 KM
- Centrifuga SIGMA 3K30
- Microcentrifuga EPPENDORF 5415C
- Sonificador Cole-Palmer 8890.
- Baño de agua Lab Line Aqua Bat
- Equipo para filtración Milipore con membrana de 0.45 μ .

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters que consta de
 - Bomba cuaternaria con desgasificador modelo 600 controlled Waters.
 - Detector de arreglo de diodos, modelo 996 de Waters.
 - Inyector automático modelo 717 plus Waters.
 - Integrador paquete computacional Empower, Waters.

3.1.2 REACTIVOS

Fosfato monobásico de potasio R.A SIGMA.

Ácido ortofosfórico R.A J.T Baker.

Hidróxido de Sodio R.A MERCK

Imidazol R.A SIGMA.

Acetato de amonio R.A SIGMA.

Acetonitrilo, grado HPLC Omnisolv.

Diclorometano, grado HPLC CHROMANORM.

Agua HPLC obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters System.

3.1.2.1 Sustancias de referencia

- Clavulanato de litio USP Reference Estandar al 92.5% de pureza, lote I.

3.1.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2

Transferir a un matraz volumétrico de 1 L, 13.63 g de fosfato monobásico de potasio, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar el pH a 2.2 con ácido O-fosfórico al 85%, filtrar la solución al vacío a través de una membrana milipore de 0.45 μm , desgasificar por sonicación al vacío durante 20 minutos.

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 5.5

Transferir a un matraz volumétrico de 1 L, 13.63 g de fosfato monobásico de potasio, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.5 con hidróxido de sodio diluido 1:10, filtrar la solución al vacío a través de una membrana milipore de 0.45 μm , desgasificar por sonicación al vacío durante 20 minutos.

Solución de acetato de amonio 0.1 M

Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, 0.7708 g de acetato de amonio, disolver y llevar a volumen con agua desionizada.

Solución de Imidazol 3.0 M

Pesar 8.25 g de imidazol y disolver en 40 mL de solución de acetato de amonio 0.1 M.

3.1.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE REFERENCIA

- Solución patrón de CLAVULANATO (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En el preparado de formulaciones y formas farmacéuticas, se utiliza la sal potásica del ácido clavulánico, y para fines de ensayo químico, la USP nos indica utilizar como sustancia de referencia a la sal de litio del ácido clavulánico (6). Por lo que se muestra entonces el detalle de cálculo para pesar el equivalente de ácido clavulánico en su forma de sal de litio:

- **Peso molecular del ácido clavulánico:** 199.162g/mol.
- **Peso molecular del clavulanato de litio:** 205.095g/mol.

$10 \text{ mg de ácido clavulánico} \times (205.095\text{mg}/199.162\text{mg}) \times (10\text{mg}/9.25\text{mg}) = 11.138 \text{ mg}$, por lo tanto:

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de ácido clavulánico (11.1328 mg de clavulanato de litio USP Reference Estandar al 92.5% de pureza), transferirlos

cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 5.5.

- Dilución de la solución patrón de CLAVULANATO (40 µg/mL).

Transferir cuantitativamente 4 mL de la solución de 100 µg/mL de CLAVULANATO a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 5.5.

- Dilución de la solución patrón de CLAVULANATO (20 µg/mL).

Transferir cuantitativamente 5 mL de la solución de 40 µg/mL de CLAVULANATO a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 5.5.

- Dilución de la solución patrón de CLAVULANATO (2 µg/mL).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución de 20 µg/mL de CLAVULANATO a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 5.5.

3.1.5 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN .

La curva de calibración consistió de 9 concentraciones: 0.15, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.0, 5.0 µg/mL, y tres puntos de control de calidad, cuyos valores se encontraban dentro del intervalo, pero no pertenecían a los valores establecidos para la curva de calibración. A estos se les asignaron valores de concentraciones de 0.25, 2.0, 4.0 µg/mL.

En la tabla 2 se esquematiza la preparación de los puntos correspondientes a la curva de calibración y puntos de control de calidad.

Tabla 2: preparación de la curva de calibración de Clavulanato de litio

Tubo	μL de Clavulanato (2 μg/mL)	μL de Clavulanato (20 μg/mL)	μL de Clavulanato (40 μg/mL)	μL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 5.5	μL de plasma	Concentración (μg/mL)
	20			30	400	0.1
1	30			20	400	0.15
2	40			10	400	0.20
3	50			-	400	0.25*
4		10		40	400	0.5
5		20		30	400	1
6		30		20	400	1.5
7		40		10	400	2*
8		50		-	400	2.5
9			30	20	400	3
10			40	10	400	4*
11			50	-	400	5

*Puntos control bajo, medio y alto, para la determinación de los parámetros de estabilidad, exactitud, precisión y recobro del método.

3.1.6 OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL, COLUMNA Y TEMPERATURA DE ENSAYO

Se probaron las siguientes condiciones cromatográficas, apoyadas en los métodos analíticos descritos anteriormente:

- 1 Como fase móvil se utilizó solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 - Metanol en proporción 95:5 (v/v), columna Xterra MS C₁₈ 5μm 4.6x250 mm, a una temperatura de 30°C, usando el método de extracción **A** que se describe en el siguiente apartado.
- 2 Fase móvil de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 – Acetonitrilo en proporción 96:4 (v/v), columna Xterra MS C₁₈ 5μm 4.6x250 mm, a una temperatura de 30°C, usando el método de extracción **A**.
- 3 La fase móvil usada fué fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 – Metanol en proporción 97:3 (v/v), columna Spherisorb 5μm 4.3X250 mm, a una temperatura de 30°C, utilizando el método de extracción **B**.
- 4 Se utilizó como fase móvil solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 al 100%, columna Xterra RP₁₈ 5 μm 4.6x250 mm, a una

temperatura de 35°C, utilizando el método de extracción **B** que se describe en el siguiente apartado.

- 5 Se utilizó como fase móvil solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 al 100%, columna Xterra RP₁₈ 5 µm 4.6x250 mm, a una temperatura de 29-29.6 °C, utilizando el método de extracción **B**.

3.1.7 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Como parte de la optimización del método se probaron dos métodos de extracción que se nombraron **A** y **B**, respectivamente.

Método de extracción **A** (optimizado a partir del método descrito por Martín C. y cols, ver figura en el apéndice I) ⁽¹⁹⁾:

- 1 Preparar cada una de las muestras tal y como se indica en la tabla 2 , agitar durante 30 segundos.
- 2 Adicionar a cada muestra 100 µL de solución de imidazol, agitar en vortex durante 30 segundos.
- 3 Dejar reposar 10 minutos para que se forme el complejo clavulanato-imidazol.
- 4 Precipitar cada una de las muestras con 1mL de acetonitrilo, agitar en vortex durante 15 segundos y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.
- 5 Decantar y extraer con 3 mL de diclorometano, agitar vigorosamente durante 30 segundos y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.
- 6 Extraer la fase acuosa e inyectar al equipo 20µL.

Método de extracción **B** (optimizado a partir del método descrito por H. Ellis y cols, ver figura en el apéndice I) ⁽²⁰⁾:

- 1 Preparar cada una de las muestras tal y como se indica en la tabla 2 , agitar durante 30 segundos.
- 2 Precipitar con 0.5 mL de acetonitrilo y agitar durante 15 segundos, centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, decantar en tubo cónico y adicionar 3 mL de diclorometano para extraer impurezas del plasma.
- 3 Agitar en vortex durante 30 segundos, centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.
- 4 Extraer 80 µL de la fase acuosa y añadir 20 µL de imidazol, dejar estabilizar la muestra durante 10 minutos para formar el complejo clavulanato-imidazol.

5 inyectar 20 μ L de muestra.

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA

Una vez propuestas y obtenidas las condiciones analíticas del método se realizó la validación con el fin de contar con evidencia experimental documentada de que el procedimiento se comportaba consistentemente y garantizaba la confiabilidad de los resultados.

3.2.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En base a lo establecido en la NOM-177-SSA-1-1998, en lo referente a validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad en humanos , los parámetros evaluados fueron:

3.2.1.1 Linealidad del Método

Para evaluar la linealidad del método, se analizaron tres series independientes de curvas patrón en plasma, en un día de trabajo, en el intervalo de concentraciones de 0.15-5.0 μ g/mL. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al método establecido e inyectadas en el sistema cromatográfico.

De cada curva de calibración se obtuvo tratando el área de la señal del Clavulanato en cada punto de la curva patrón como desconocidos e introduciéndolos en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados con ponderación $1/x^2$.

La linealidad del método fue definida con un coeficiente de correlación (r) mayor o igual que 0.99, también se obtuvieron y evaluaron los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) para cada una de las curvas.

3.2.1.2 Precisión del método

La precisión del método se evaluó mediante los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad.

3.2.1.2.1 Repetibilidad del método

Este parámetro se determinó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se analizaron por quintuplicado tres niveles de concentración 0.25, 2.0, 4.0 μ g/mL que corresponden a las concentraciones baja, media y alta del rango de concentraciones evaluados respectivamente. Se determinó el

promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de cada concentración recuperada. El criterio de aceptación fue que el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración no fuera mayor al 15%.

3.2.1.2.2 Reproducibilidad del método

Para evaluar la reproducibilidad del método, se prepararon por duplicado los niveles de concentraciones correspondientes a 0.25, 2.0, 4.0 µg/mL, en tres días continuos de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipo y laboratorio. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de cada concentración recuperada. El criterio de aceptación fue que el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración no fuera mayor al 15%.

3.2.1.3 Exactitud del método

Exactitud fue definida como la desviación absoluta (Desv. abs.%) del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración (tanto para los datos de repetibilidad como de reproducibilidad) con respecto al valor nominal (cantidad adicionada), en donde:

$$Desv.abs\% = 100 \times \frac{|Cantidad\ adicionada - Cantidad\ recuperada|}{Cantidad\ adicionada}$$

La exactitud fue evaluada tratando la área de CLAV de las muestras control como desconocidas e introduciéndolas en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener los valores de "cantidad recuperada".

3.2.1.4 Límite de cuantificación

Para determinar la sensibilidad del método se determinó por quintuplicado la concentración mínima cuantificable (CMC), ó límite de cuantificación (LC). El LC fue la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del ±20% del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

3.2.1.5 Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido.

3.2.1.6 Selectividad

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras blanco de la matriz biológica (plasma), muestras de plasma conteniendo amoxicilina y heparina, evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención.

3.2.1.7 Recuperación absoluta

El recobro se definió como el porcentaje de Clavulanato recuperado después de su extracción a partir de las muestras de la matriz biológica, comparada con la respuesta de una muestra no sometida al proceso de extracción. Por lo cual se evaluaron tres series de Clavulanato en plasma y tres series de Clavulanato en solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.1 M, pH 6.8 a tres niveles de concentración 0.25 µg/mL (nivel bajo), 2.0 µg/mL (nivel medio) y 4.0 µg/mL (alto). Las muestras plasmáticas se procesaron de acuerdo al método de extracción propuesto.

3.2.1.8 Estabilidad

La prueba de estabilidad tuvo como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, procesamiento y almacenamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la estabilidad de la muestra en ciclos congelación-descongelación (2 ciclos), congelación a -70°C (30 y 45 días), temperatura ambiente (30 minutos).

a. Ciclos de congelación-descongelación. La estabilidad de CLAVULANATO en plasma bajo ciclos congelación-descongelación fue documentada como a continuación se describe: se prepararon por duplicado tres series de muestras de control de calidad conteniendo CLAVULANATO a las siguientes concentraciones: 0.25, 2 y 4 µg/mL, las cuales fueron almacenadas a -70°C y sometidas a ciclos de congelación-descongelación a las 24 horas y nuevamente congelación-descongelación a las 48 horas. Las muestras de Clavulanato se consideraron estables bajo estas condiciones si la concentración recuperada promedio se encontraba dentro del límite del ± 15% del valor original.

b. Temperatura ambiente. Para determinar la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente se prepararon por duplicado muestras de CLAVULANATO en plasma a tres niveles de concentración (0.25, 2 y 4 µg/mL), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico al los tiempo 0 y 30 minutos después de su preparación. El criterio para considerar que el Clavulanato era estable bajo estas condiciones, fue que el valor de concentración de las muestras presentaran una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original.

c. Estabilidad de la muestra procesada. Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se evaluó solo el punto bajo de la curva a los tiempos 15,30 y 45 minutos, además se prepararon por duplicado muestras de CLAVULANATO en plasma a tres niveles de concentración (0.25, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico al los tiempo 0 y 6 minutos después de su preparación. El criterio para considerar que el Clavulanato era estable bajo estas condiciones, fue que el valor de concentración de las muestras presentaran una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original.

d. Congelación. La estabilidad de CLAVULANATO en plasma en congelación a -70°C se documentó preparando tres series de muestras de control de calidad conteniendo CLAVULANATO a las siguientes concentraciones: 0.25, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron almacenadas a -70°C y analizadas a los 30 y 44 días. Las muestras se consideraron estables si la concentración recuperada promedio se encontraba dentro del límite del $\pm 15\%$ del valor original.

3.2.1.9 Tolerancia

La tolerancia evaluó la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporcionan una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. Para ello se prepararon por duplicado y a partir de soluciones patrón independientes, muestras de concentraciones 0.25, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se inyectaron cambiando la temperatura de la columna de 29°C a 35°C .

3.2.1.10 Aplicación de la metodología analítica optimizado y validado para cuantificar clavulanato en plasma.

Con la metodología analítica validada y optimizada se analizaron las muestras plasmáticas de 24 voluntarios sanos, a los cuales después de administrarles una dosis oral única de 125mg de Clavulanato de potasio, se les tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0,15,30,45,60,75,90,105,120,180,240,300,360,420 minutos.

RESULTADOS
Y
ANÁLISIS
DE
RESULTADOS

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA.

Para el análisis de las muestras de plasma se utilizó un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El método analítico empleado en el siguiente trabajo se basó en los reportes Martín C. y cols. (19), y de H. Ellis y cols. (20), con modificaciones para la optimización del mismo.

4.1.1 OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL, COLUMNA Y TEMPERATURA DE ENSAYO

El criterio para la elección de la fase móvil, temperatura y columna para el ensayo cromatográfico, se enfocó a la obtención de una mejor y mayor sensibilidad, una simetría ≤ 2.0 y una $R \geq 2.0$, para garantizar la separación aceptable de los picos y una adecuada integración y cuantificación de los mismos. Una vez analizados los datos se decidió que la metodología 5 era la indicada para realizar la validación.

Las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis se resumen a en la tabla 3.

TABLA 3: Condiciones cromatográficas

Detector	Detector de arreglo de diodos UV/VIS Waters 996
Longitud de onda	315 nm
Columna	Waters Xterra RP ₈ 250x4.6 mm
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.2 al 100%
Temperatura de la columna	29 °C
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	8.0 min

4.1.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

La selección del método de extracción, se basó en aquel con el cual se pudiese obtener un mayor recobro del fármaco, una mínima presencia de impurezas procedentes de componentes del plasma, así como repetibilidad en los resultados.

El método de extracción **B**, logró cumplir con las especificaciones marcadas en la NOM-177-SSA1-1998.

El método de extracción seleccionado para las muestras plasmáticas se presenta en la siguiente figura:

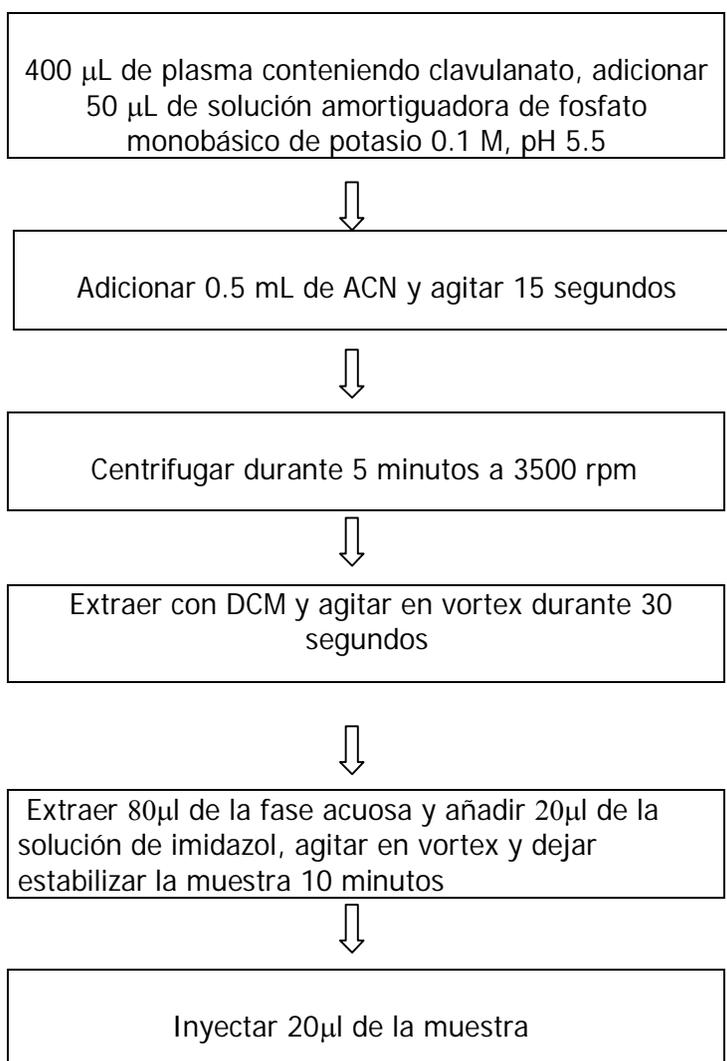


FIGURA 3: Esquema de extracción para cuantificar Clavulanato en plasma

4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLAVULANATO EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Se validó el método analítico para demostrar la confiabilidad de los resultados, analizando tres series independientes de curvas patrón y cinco series independientes de los puntos de control de calidad (control bajo, medio y alto por serie) en el primer día de trabajo y series independientes de muestras de control de calidad (control bajo, medio y alto) por duplicado en el segundo y tercer día de trabajo.

4.2.1 Validación del método analítico.

4.2.1.1 Linealidad del método.

En la tabla 4, se presentan los valores de pendiente (m), intercepto (b) y coeficiente de correlación (r) obtenidos a partir del ajuste por mínimos cuadrados de las tres curvas de calibración de Clavulanato evaluadas en un mismo día de trabajo, mientras que la figura 4 ilustra la curva patrón promedio correspondiente de Clavulanato en el intervalo de 0.15-5.0 µg/mL.

Tabla 4: *Linealidad del método para cuantificar Clavulanato en plasma*

Concentración (µg/mL)	Curva 1 áreas	Curva 2 áreas	Curva 3 áreas	Promedio	D.E	C.V%
0.15	7822.85	8099.68	5362.77	7095.10	1506.613	21.23
0.20	8835.99	11223.41	8446.62	9502.01	1503.439	15.82
0.50	32181.03	31811.44	29283.18	31091.88	1577.246	5.07
1.00	56202.90	66964.41	58155.94	60441.08	5733.1744	9.49
1.50	85352.83	92699.76	80695.42	86249.34	6052.176	7.02
2.50	176501.07	166271.19	155682.44	166168.23	10434.696	6.28
3.00	198184.22	222029.54	188862.30	203025.30	17105.376	8.43
5.00	299180.87	303613.69	286281.18	296358.50	9004.330	3.04
m	63743.6600	67069.9500	61516.0600			
b	-2436.3900	-2014.9500	-3758.6600			
r	0.9934	0.9971	0.9978			

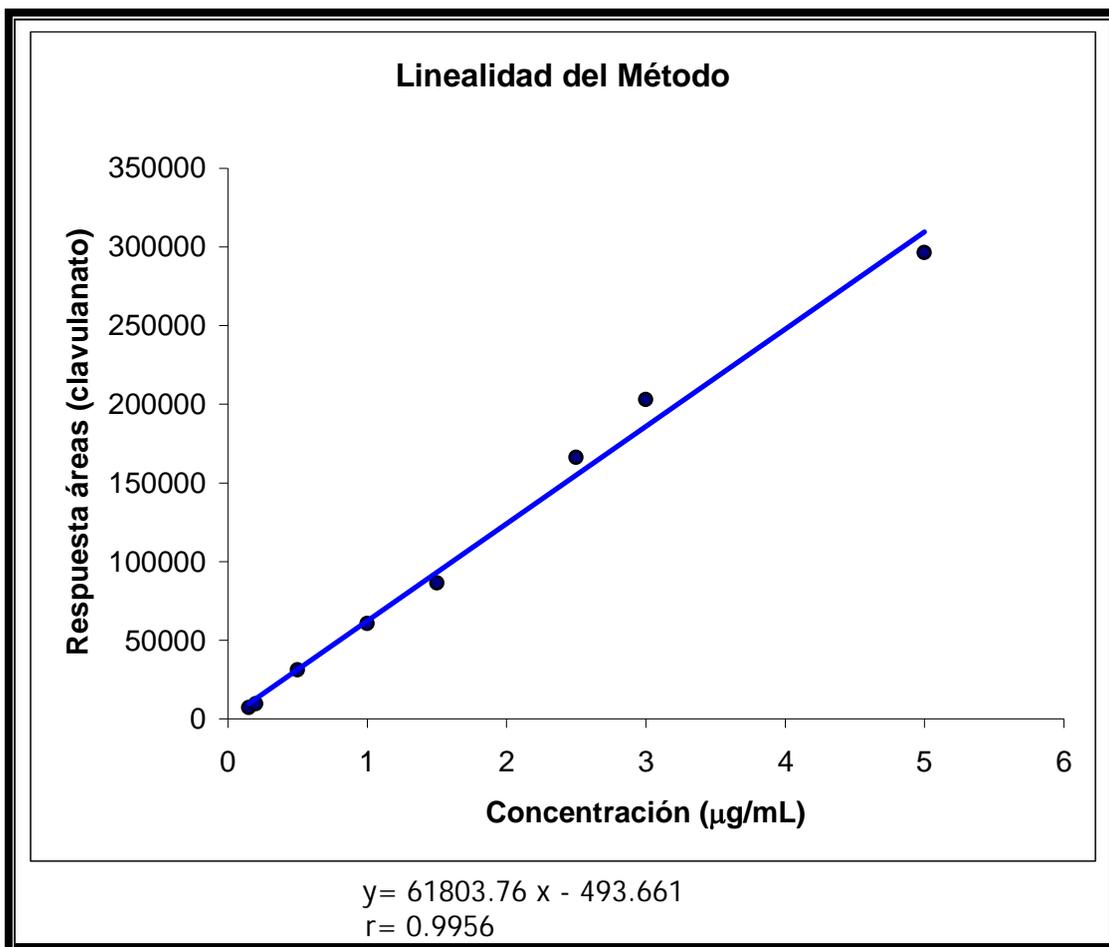


FIGURA 4: Linealidad del método para cuantificar CLAVULANATO en plasma.

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido para cada una de las curvas de calibración fue superior a 0.99 El valor promedio para la pendiente (m) fue de 64109.89 y para la ordenada al origen (b) fue de -2736.66.

De acuerdo a lo anterior, el método para cuantificar Clavulanato en plasma fue lineal en el rango de concentraciones de 0.15 a 5µg/mL

4.2.1.2 Precisión y exactitud del método

4.2.1.2.1 Repetibilidad

En la tabla 5 podemos observar los resultados correspondientes a la evaluación de repetibilidad y exactitud del método.

Tabla 5: Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar CLAVULANATO en plasma.

Muestra	Concentración recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
1	0.240	1.963	3.871
2	0.221	1.826	4.119
3	0.236	1.673	4.716
4	0.209	1.938	4.464
5	0.184	2.184	4.006
Promedio	0.218	1.917	4.235
D.E.	0.023	0.188	0.347
C.V.%	10.39	9.82	8.20
Concentración adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.25	2.00	4.00
Desv.abs %	12.80	4.16	5.88

En cuanto a repetibilidad, en la tabla 5 podemos observar que los valores de coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor que 10.39%, mientras que la desviación absoluta (Desv.abs%) en los niveles de concentración estudiados fue menor que 12.80%, encontrándose dentro del límite permitido.

4.2.1.2.2 Reproducibilidad

En la tabla 6 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método,

Tabla 6: Reproducibilidad de método analítico para la cuantificación de CLAVULANATO en plasma

Día	Réplica número	Concentración recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
1	1	0.247	2.106	3.929
	2	0.281	2.206	3.742
2	1	0.208	1.963	3.871
	2	0.207	1.826	4.119
3	1	0.237	1.851	3.916
	2	0.237	2.205	4.105
Promedio		0.236	2.026	3.947
D.E.		0.027	0.171	0.144
C.V.%		11.63	8.42	3.65
Concentración adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		0.25	2.00	4.00
Desviación absoluta	%	5.53	1.31	1.33

De acuerdo a los resultados, en la tabla 6 se observa que los tres niveles de concentración muestran en los diferentes días de trabajo una variación de 3.65 a 11.63%, valores que se encuentran dentro del límite permitido de $\pm 15\%$ el valor real. En cuanto a la exactitud, se encontraron valores que van de 1.33 a 5.53% de desviación absoluta en las diferentes concentraciones evaluadas mientras que la desviación absoluta % fue menor a 5.53 %, en las diferentes concentraciones evaluadas.

De acuerdo a lo anterior, el método para cuantificar Clavulanato es preciso y exacto.

4.2.1.2 Límite de cuantificación.

La sensibilidad del método se determinó como la concentración mínima cuantificable (CMC) ó límite de cuantificación (LC). El LC fue la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

En la tabla 7 se presentan los resultados de Límite de cuantificación del método.

Tabla 7: Límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de CLAVULANATO en plasma

Concentración nominal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Réplica	Concentración recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.15	A	0.150
0.15	B	0.150
0.15	C	0.150
0.15	D	0.150
0.15	E	0.124
Promedio		0.1458
D.E.		0.012
C.V.%		8.49
Desviación absoluta %		2.80

El límite de Cuantificación para Clavulanato fue de 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este nivel, la precisión inter día fue de 8.49% y la exactitud (desviación absoluta %) fue de 2.80.

4.2.1.4 Límite de detección

El límite de detección (LD) se estableció como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido y la precisión y la exactitud son mayores al 20%. El LD para CLAVULANATO fue de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2.1.5 Selectividad

En la figura 5 se presentan los cromatogramas correspondientes de la evaluación de la selectividad del método

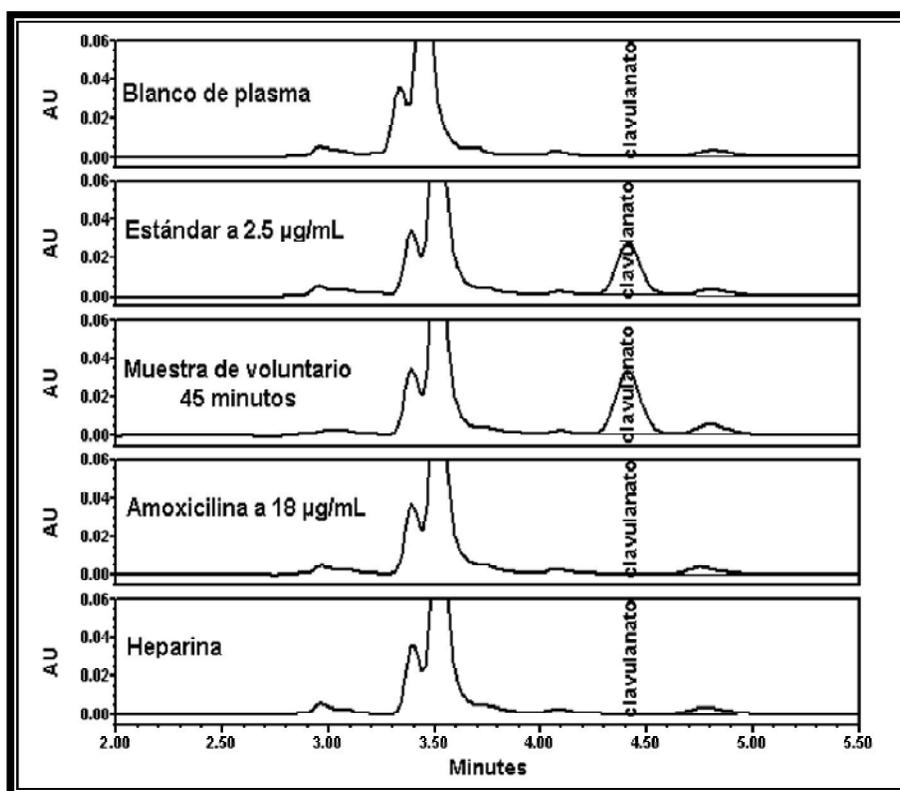


FIGURA 5: Selectividad del método analítico para la cuantificación de Clavulanato en plasma.

4.2.1.6 Recuperación absoluta

En la tabla 8 se presentan los porcentajes de recobro de clavulanato a partir de la muestras plasmáticas

Tabla 8: Recobro de CLAVULANATO de plasma humano

Estándar	Estándar en fase móvil (no extraído) Área de CLAVULANATO	Estándar en plasma (extraído) Área de CLAVULANATO	Recobro %
Alto 4 µg/mL	290260	245458	
	335123	261315	
	333495	299573	
	325980	283452	
	317181	254099	
Promedio	320407.8	268779.4	83.9
Medio 2 µg/mL	136724	123133	
	163886	114298	
	145131	104531	
	165516	121489	
	157894	137252	
Promedio	153830.2	120140.6	78.1
Bajo 0.25 µg/mL	16689	14510	
	18008	13240	
	17333	14270	
	19352	12462	
	17365	10840	
Promedio	17749.4	13064.4	73.6

Como se observar en la tabla anterior, el recobro estudiado, es constante a lo largo del rango de concentraciones plasmáticas evaluadas, resultando del 78.5% promedio.

4.2.1.7 Estabilidad

La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación.

Tabla 9: Estabilidad de CLAVULANATO en ciclos de congelación-descongelación

Día 0			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.246	1.988	3.728
	0.262	1.889	4.046
Promedio	0.254	1.939	3.887
1er. ciclo			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.221	1.982	4.029
	0.288	1.863	4.262
Promedio	0.255	1.923	4.146
Desv.abs%	0.20	0.83	6.65
2º. ciclo			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.204	1.984	3.703
	0.261	1.880	3.558
Promedio	0.233	1.932	3.631
Desv.abs%	8.46	0.34	6.60

Se puede observar que los valores obtenidos, cumplen con el límite de $\pm 15\%$ del valor original, por lo que se concluye que la CLAVULANATO es estable a -70°C bajo dos ciclos de congelación-descongelación.

En la tabla 10 se muestran los resultados de análisis de muestras almacenadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Tabla 10: Estabilidad de CLAVULANATO a temperatura ambiente

Tiempo 0			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.262	2.160	4.295
	0.269	1.909	4.055
Promedio	0.266	2.035	4.175
Tiempo 30 minutos			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.253	2.169	3.955
	0.258	2.040	4.277
Promedio	0.256	2.105	4.116
Desv.abs%	3.77	3.44	1.41

Los resultados del análisis de las muestras de plasma almacenadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que CLAVULANATO es estable bajo estas condiciones.

En la tabla 11 se presentan los resultados de muestras plasmáticas (correspondientes al punto bajo) procesadas y almacenadas bajo condiciones normales de laboratorio, y que se analizaron a los tiempos 15,30 y 45 minutos, después de haberlas procesado.

Tabla 11: Estabilidad de la muestra procesada (CLAVULANATO a los 15, 30 y 45 minutos)

TIEMPO (min)	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)	%Desv. Abs.
15	0.25	0.14	44
30	0.25	0.12	52
45	0.25	0.11	56

En la tabla 11 podemos apreciar que los resultados obtenidos fueron desfavorables a los tiempos 15, 30 y 45, pues a partir de los 15 minutos la desviación absoluta es mayor del 15% con respecto al valor original.

En la tabla 12 se presentan los resultados de muestras plasmáticas procesadas y almacenadas bajo condiciones normales de laboratorio, y que se analizaron a los tiempos 0 y 6 minutos, después de haberlas procesado.

Tabla 12: Estabilidad de la muestra procesada a los 0 y 6 minutos

Tiempo 0 minutos			
	Bajo 0.25 $\mu\text{g/mL}$	Medio 2 $\mu\text{g/mL}$	Alto 4 $\mu\text{g/mL}$
	0.246	1.988	3.728
	0.262	1.889	4.046
Promedio	0.254	1.939	3.887
Tiempo 6 minutos			
	Bajo 0.25 $\mu\text{g/mL}$	Medio 2 $\mu\text{g/mL}$	Alto 4 $\mu\text{g/mL}$
	0.236	1.863	3.563
	0.250	1.700	3.909
Promedio	0.243	1.782	3.736
Desv.abs%	4.33	8.10	3.89

En los resultados presentados en la tabla 12, se puede observar que CLAVULANATO fue estable en la solución de inyección únicamente durante 6 minutos después de su preparación ya que su desviación absoluta no fue mayor del 15% con respecto al valor original.

En la tabla 13 se presentan los resultados del análisis de las muestras de Clavulanato, almacenadas en congelación a -70°C , durante 30 y 44 días.

Tabla 13: Estabilidad de CLAVULANATO en congelación.

Tiempo 0			
	Bajo 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	0.246	1.988	3.728
	0.262	1.889	4.046
Promedio	0.254	1.939	3.887
Tiempo 30 días			
	Bajo 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	0.227	2.070	4.535
	0.228	2.091	4.193
Promedio	0.228	2.081	4.364
Desv.abs%	10.43	7.33	12.27
Tiempo 44 días			
	Bajo 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Medio 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alto 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	0.260	2.000	3.980
	0.270	2.040	4.150
Promedio	0.265	2.020	4.065
Desv.abs%	4.33	4.20	4.58

Los resultados del análisis presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que CLAVULANATO es estable bajo estas condiciones.

4.2.1.8 Tolerancia

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporcionan una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. Para ello se prepararon por duplicado y a partir de soluciones patrón independientes, muestras de concentraciones 0.25, 2 y 4 µg/mL, las cuales se inyectaron cambiando la temperatura de la columna de 29°C a 35°C.

Los resultados obtenidos después de realizar éstos cambios se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Evaluación de la tolerancia del método

Condiciones originales: Temperatura de la columna: 29°C			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.209	2.212	4.069
	0.289	2.046	3.942
Promedio	0.249	2.129	4.006
Cambio de temperatura de la columna: 35°C.			
	Bajo 0.25 µg/mL	Medio 2 µg/mL	Alto 4 µg/mL
	0.206	2.040	3.423
	0.255	1.634	3.597
Promedio	0.231	1.837	3.510
Desv.abs%	7.43	13.72	12.37

El método se considera tolerante a éstos cambios si no se presenta una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales, mayor al 15%, por lo que se permitiría en momento determinado cambiar la temperatura de la columna a 35°C sin comprometer los resultados.

4.2.1.9 Aplicación de la metodología analítica optimizada y validada para cuantificar clavulanato en plasma.

En las figuras 6 y 7 se muestran las gráficas de las concentraciones plasmáticas promedio obtenidas con la metodología analítica para cuantificar clavulanato en plasma, optimizada y validada.

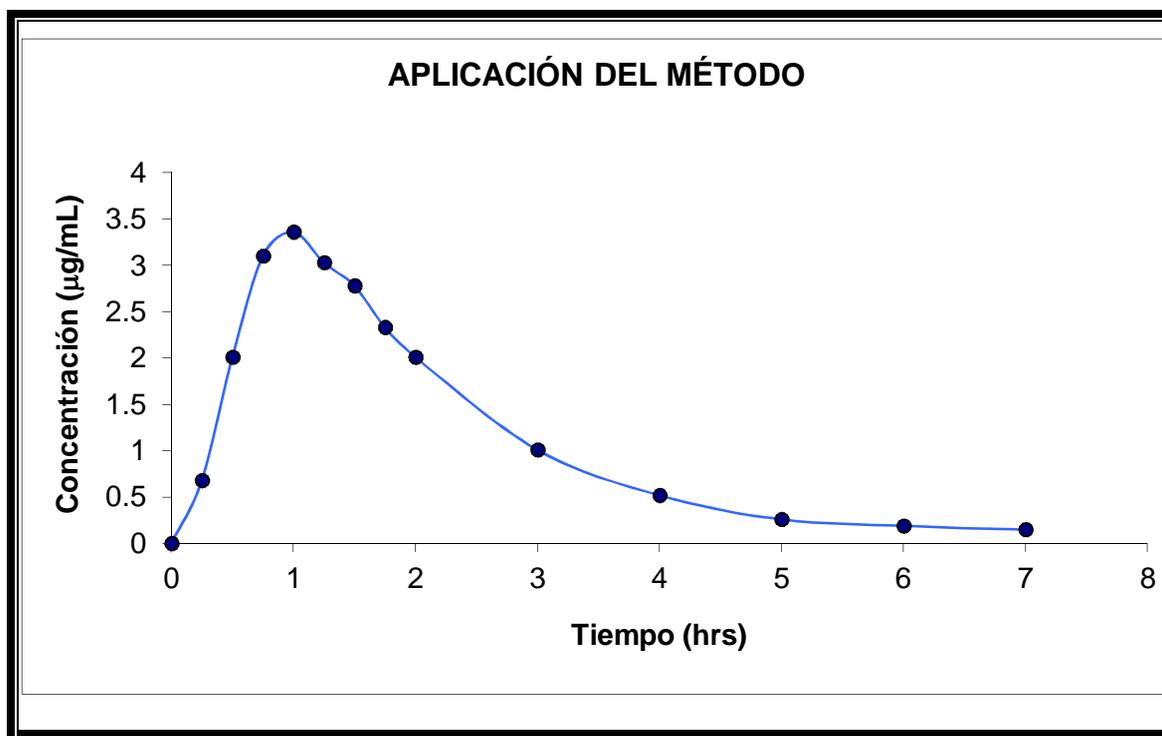


FIGURA 6: Gráfica de la concentración plasmática promedio de CLAVULANATO versus tiempo, después de la administración de una dosis oral única de 125 mg de CLAVULANATO.

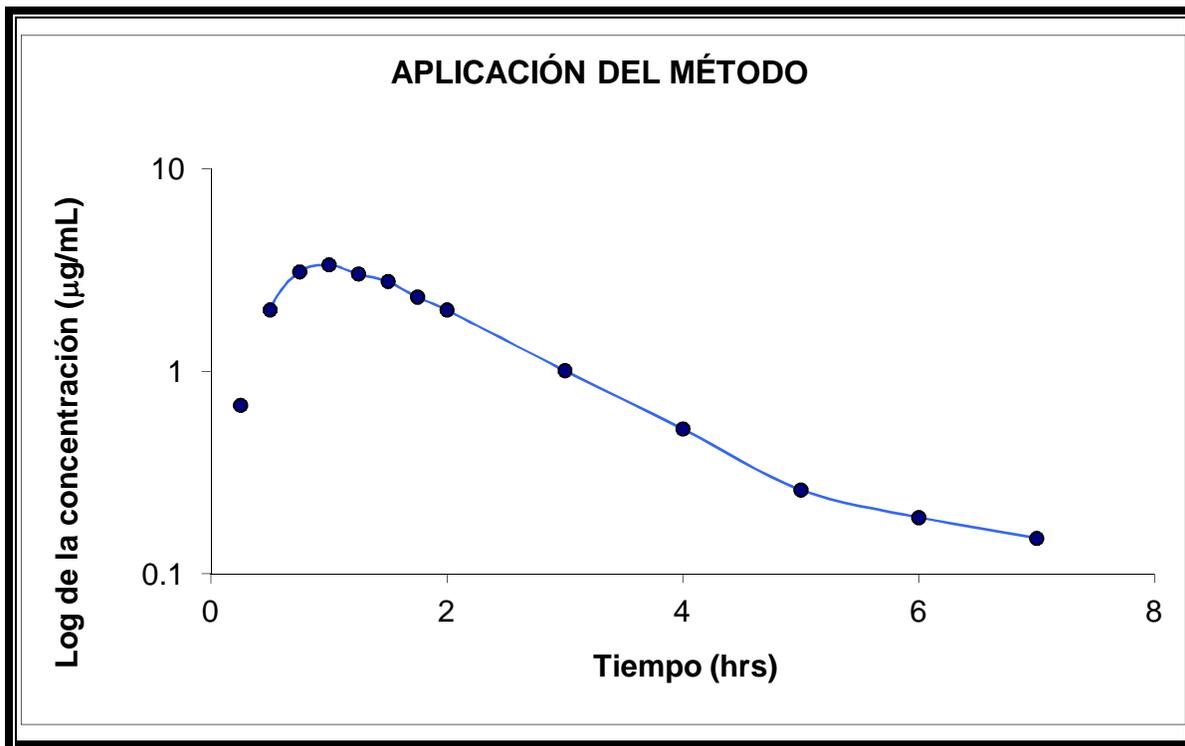


FIGURA 7: Gráfica del logaritmo de la concentración plasmática promedio de CLAVULANATO versus tiempo, después de la administración de una dosis oral única de 125 mg de CLAVULANATO

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se concluye que el método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) optimizado y validado para la cuantificación de Clavulanato en plasma fue:

- LINEAL en el intervalo de concentraciones entre 0.15 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$.
- PRECISO (Repetible y Reproducible) tanto en un día como en varios días, cuando el análisis fue realizado por el mismo analista, en el mismo laboratorio y bajo las mismas condiciones de trabajo y equipo.
- EXACTO en el intervalo de concentraciones entre 0.15 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$.
- ESTABLE bajo condiciones experimentales solo hasta los 6 minutos después de procesadas las muestras, a los treinta minutos a temperatura ambiente, a los ciclos congelación descongelación a las 24 y 48 hrs, y en congelación hasta los 44 días.
- SELECTIVO ya que no se presentaron interferencias ni del blanco de plasma, ni de la amoxicilina, ni de anticoagulantes como la heparina.
- TOLERANTE a las pequeñas variaciones de temperatura que puedan presentarse en las condiciones de trabajo experimental.

- Con base a lo anterior se considera que el método analítico es confiable para el análisis de Clavulanato en plasma y para su aplicación en un estudio de farmacocinética.

BIBLIOGRAFIA

6 BIBLIOGRAFIA

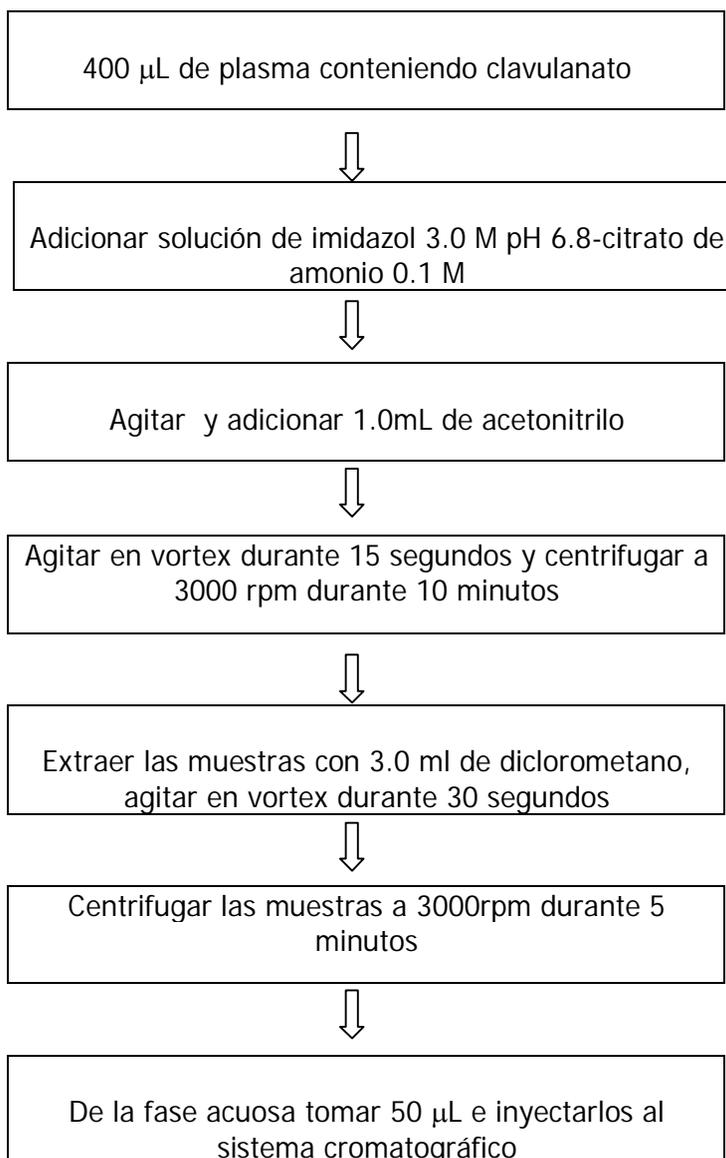
1. Arancibia, A. Biodisponibilidad de Medicamentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 1° edición. Chile 1992. pp 15, 25-26.
2. Mutschler E, Derendorf H. Drug Actions: Basic principles and Therapeutic Aspects. Edit. MEDPHARM Scientific Publisher. Germany 1995. pp 519-529.
3. Hardman JG, Limbird LR, Molinof PB, Ruddon RW, Goodman GA. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Vol. I. 9ª. Ed; Mc Graw Hill Iteramericana. 1997, pp 1667-1668.
4. HPLC on Drugs Analysis; Edit. Springer-Verleg. 1996, pp 115-117.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Vol. II, 7ª edición, México, 2000, pp 917-919.
- 6.- U.S Pharmacopeia 23 National, Formulary 18. 1995. pp 384-385.
- 7.- The Merck Index. 12° Edición, 1996. pp 2404.
- 8.- <http://www.cvm.uiuc.edu/mbichen/secondyear/pharm2>.
- 9.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas DEF, PLM Versión electrónica, Edición 47, México 2001.
- 10.- F.Mc. Van Barbara. Indice de Medicamentos. Ed. Manual Moderno, 1ª edición, México, D.F 1995. pp 96-98.
- 11.- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Diario Oficial de la Federación. Primera Sección. México, D.F. Viernes 7 de mayo de 1999.
- 12.- Pérez CG, Martín IG. Polarographic determination of clavulanic acid. J.Pharm. Biomed. Anal. 9 (5) (1991) pp 383-386.
- 13.- Bird AE, Gasson DC. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. Analyst. 107(1982) pp 1241-1245.

- 14.- Aghazade A, Kazemifard. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical dosage form by LC with amperometric detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) pp 325-329.
- 15.- Hoizey G, Lamiable D, Frances C. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 000 (2002) pp 000-000.
- 16.- Tsou T, Wu J. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical products by HPLC with β -cyclodextrin stationary phase. J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) pp 1197-1205.
- 17.- Foulstone M, Reading C. Assay of Amoxicillin and Clavulanic Acid, the components of Augmentin, in Biological Fluids with High Performance Liquid Chromatography. Antimicrob. Agents Chemother. 22 (1984) 452-456.
- 18.- Kenneth E, et al. Pharmacokinetics and urinary excretions of clavulanic acid after oral administration of amoxicillin and potassium clavulanate. J. Clin. Pharmacol. 24 (1984) pp 452-456.
- 19.- Martin C, Mallet M. Comparación of Concentrations of Two Doses of clavulanic Acid (200 and 400 milligrams) Administered with amoxicillin (2,000 milligrams) in tissues of patients undergoing colorectal surgery. J. Antimicrob. Agents and Chemother. 39 (Jan 1995) pp 94-98.
- 20.- H. Ellis, H.K.L. Hundt. A fast and simple method for the determination of clavulanic acid in human plasma using derivatisation reaction kinetics. J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) pp 933-937.

APÉNDICE

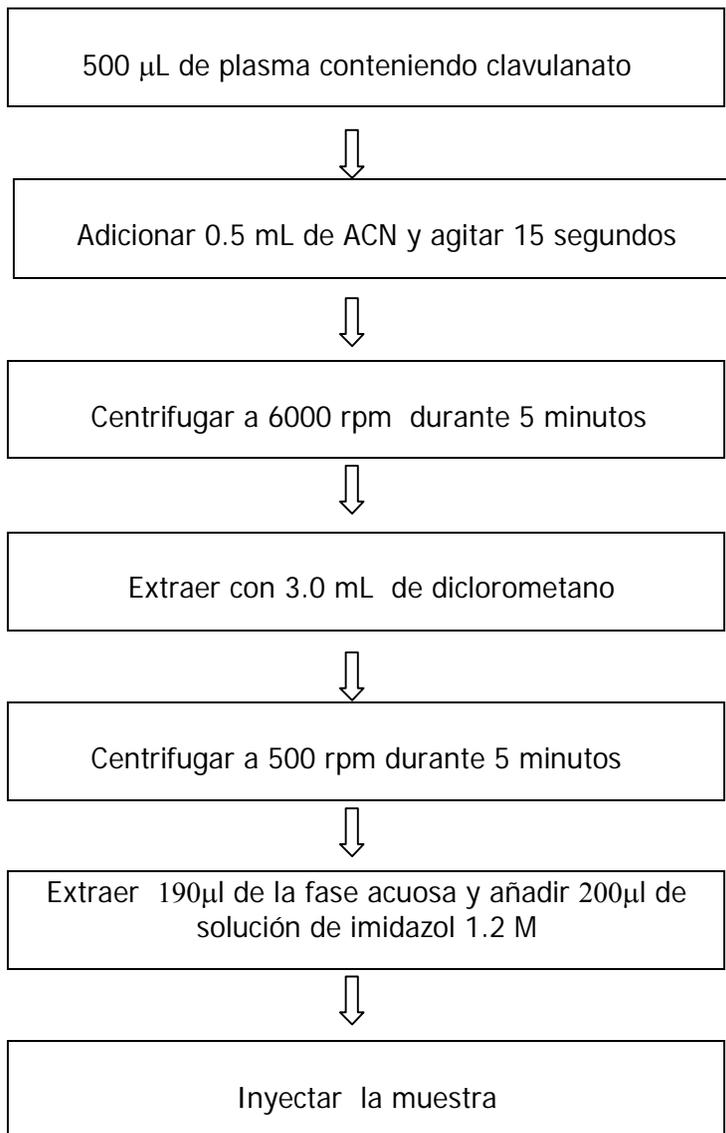
7 APÉNDICE I.

ESQUEMA DE EXTRACCIÓN PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA,
PROPUESTO POR MARTÍN C. Y COLS. (18)



*Esquema de extracción para cuantificar Clavulanato en plasma .
propuesto por Martín C. y cols. (18)*

ESQUEMA DE EXTRACCIÓN PARA CUANTIFICAR CLAVULANATO EN PLASMA
PROPUESTO POR H. ELLIS, H.K.L HUNDT Y COLS. (19)



*Esquema de extracción para cuantificar Clavulanato en plasma .
propuesto por H. Ellis, H.J.L Hundt y cols.*