



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE IOPAMIDOL Y  
ÁCIDO *p*-AMINO HIPÚRICO EN PLASMA DE RATA COMO  
INDICADORES DE FUNCIONAMIENTO RENAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

KARLA IVONNE GONZÁLEZ VILLALVA

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO

ASESOR DE TESIS  
DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2013



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.



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Antes que nada quiero agradecer a Dios por darme la dicha de alcanzar una de mis metas y el haber puesto a todas y a cada una de las personas que me ayudaron para poder lograr este sueño, pero sobre todo darle las gracias por haberme dado a unos maravillosos padres y la dicha de poder compartir con mi familia este momento tan especial.*

*A mis padres, Carlos González Sarmiento y Margarita Villalba Muñoz gracias por apoyarme a lo largo de mi carrera, este trabajo es resultado de su constante apoyo y confianza, ya que sin ustedes no lo hubiera podido lograr, gracias. Los amo y que Dios los bendiga siempre.*

*A mis hermanos Julio, Karina y Marlen les dedico mi tesis ya que directa e indirectamente me apoyaron en algún momento espero que les sirva de motivación y gracias por estar presentes mis momentos de desesperación y alegría, los quiero mucho.*

*A mis directores de tesis, Dra. Leticia Cruz Antonio y Dr. Gilberto Castañeda Hernández gracias por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, las enseñanzas profesionales y personales, la paciencia, la confianza, los sabios consejos que me proporcionaron y por el constante apoyo brindado.*

*A la Q.F.B. Ma. de Lourdes González Flores, gracias por tus enseñanzas y sobre todo por tu amistad.*

*A la M. en C. Violeta Rodríguez Romero, gracias por el constante apoyo, las enseñanzas y sobre todo por ser en una gran amiga. Dios te bendiga.*

*A mis amigos Elia, Marisol, Yesica, Gabriela, Etzrael, Fabiola, Diana, Alma, Alejandro, Daniel, Héctor, Ángel, David y demás compañeros, gracias por ser mi segunda familia y permitirme compartir con ustedes una extraordinaria etapa de mi vida.*

*A Felipe Rosas aunque estuviere en la culminación del presente trabajo, gracias por motivarme y apoyarme, te quiero.*

# ÍNDICE

<b>I. ANTECEDENTES</b>	1
<b>1. CROMATOGRAFÍA.</b>	1
1.1. Definición.	1
1.2. Clasificación.	1
1.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).	2
1.4. Tipos de Cromatografía Líquida.	3
a) Cromatografía de Adsorción.	3
b) Cromatografía de Intercambio Iónico.	3
c) Cromatografía de Exclusión.	3
d) Cromatografía de Reparto.	3
i. Cromatografía en Fase Normal.	3
ii. Cromatografía en Fase Reversa.	3
1.5. Técnicas de separación.	4
1.6. Componentes de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.	4
<b>2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>	5
2.1. Método Analítico.	5
2.2. Definición de Validación.	6
a) Linealidad.	6
b) Exactitud.	6
c) Precisión.	6
i. Repetibilidad.	7
ii. Reproducibilidad intralaboratorio.	7
d) Selectividad.	7
e) Recobro.	7
f) Estabilidad.	7
g) Limite de Cuantificación.	7
h) Limite de Detección.	7
i) Tolerancia.	7
<b>3. FUNCIÓN RENAL.</b>	8
3.1. El Riñón.	8
3.2. Consideraciones Anatómicas.	8
<b>4. DETERMINACIÓN DE FUNCIÓN RENAL.</b>	9
<b>5. IOPAMIDOL.</b>	9
<b>6. ÁCIDO <i>p</i>-AMINO HIPÚRICO.</b>	11
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	12
<b>III. OBJETIVOS.</b>	12
<b>IV. HIPÓTESIS.</b>	12
<b>V. METODOLOGÍA.</b>	12
A. Reactivos.	12
B. Material.	13

C. Equipo.	13
D. Condiciones cromatográficas.	14
E. Validación del Método Analítico.	14
F. Aplicabilidad del Método	16
VI. RESULTADOS.	16
a) Selectividad.	16
b) Linealidad del sistema.	17
c) Precisión del sistema.	19
d) Linealidad del método.	19
e) Precisión.	21
f) Exactitud.	23
g) Estabilidad muestra no procesada.	24
h) Estabilidad muestra procesada.	28
i) Límite de cuantificación.	32
j) Límite de detección.	33
k) Recobro.	33
l) Tolerancia.	35
m) Aplicabilidad del método analítico.	35
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	37
VIII. CONCLUSIONES.	40
IX. REFERENCIAS.	41

## INTRODUCCIÓN

Obtener datos analíticos seguros es un requisito para la correcta interpretación en estudios farmacocinéticos y bioequivalentes ya que se pueden sobreestimar o subestimar datos llegando a una conclusión errónea por parte del analista.

Para poder llegar a una conclusión definitiva las mediciones analíticas se deben realizar usando métodos y equipamiento que han sido probados para asegurar que se ajustan al propósito de la medición. La confianza de que los datos obtenidos en cierto estudio son seguros y fiables es demostrada a través de la validación del método analítico.

Conforme al contexto anterior esta tesis presenta la implementación y validación de un método analítico simple y sencillo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la determinación simultánea de lopamidol y PAH como marcadores de funcionamiento renal en plasma de rata evaluando los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación absoluta, estabilidad de muestra no procesada y procesada de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, empleando una cromatografía isocrática en fase reversa.

La separación cromatográfica fue llevada a cabo usando una columna C18 y una fase móvil de 0.1M CH<sub>3</sub>COOH: Acetonitrilo (90:10 v/v), trabajando a un flujo de 0.3mL/min. Con una detección ultravioleta a 270nm, empleando como estándar interno PABA y una extracción líquido-líquido.

Los resultados obtenidos demostraron que el método analítico para la cuantificación simultánea de lopamidol y PAH es válido para obtener datos que ayuden a la interpretación, razonamiento y conclusiones en un estudio de biodisponibilidad o farmacocinética.

El método implementado y validado se propone para ser utilizado en la evaluación de la filtración glomerular (lopamidol) y secreción tubular (PAH) en un modelo experimental por medio de la caracterización farmacocinética de los compuestos mencionados.

## I. ANTECEDENTES

### 1. CROMATOGRAFÍA

#### 1.1 Definición.

La cromatografía es un eficaz método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia.

La cromatografía fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego *chroma* que significa “color” y *graphein* que significa “escribir”).

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente<sup>1</sup>.

#### 1.2 Clasificación

Una clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. En la Cuadro 1 se da la relación de las tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

**Cuadro 1.** Clasificación general de los métodos cromatográficos en columna<sup>1</sup>.

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
<b>Cromatografía de líquidos</b>	Líquido-líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido.	Distribución entre líquidos inmiscibles.
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida.	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada.

	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
<b>Cromatografía de gases</b>	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
<b>Cromatografía de fluidos supercríticos</b>		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

### 1.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia.<sup>2</sup>

Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobretodo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.<sup>1</sup>

Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito científico y su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria.

Entre sus ventajas se encuentran:

**Eficacia:** Los detectores empleados son generalmente no destructivos, por lo que éste método puede ser empleado no solo para la cuantificación de los productos sin degradar y/o degradados, sino que puede servir para el aislamiento y la identificación de los mismos

**Economía:** Aunque el costo inicial del equipo y solventes son altos en comparación a un análisis espectrofotométrico clásico, la rapidez del análisis, la cantidad de

información obtenida, la pequeña cantidad de muestra y el número de análisis que se puede realizar por jornada laboral, hace del mismo un método analítico ideal.

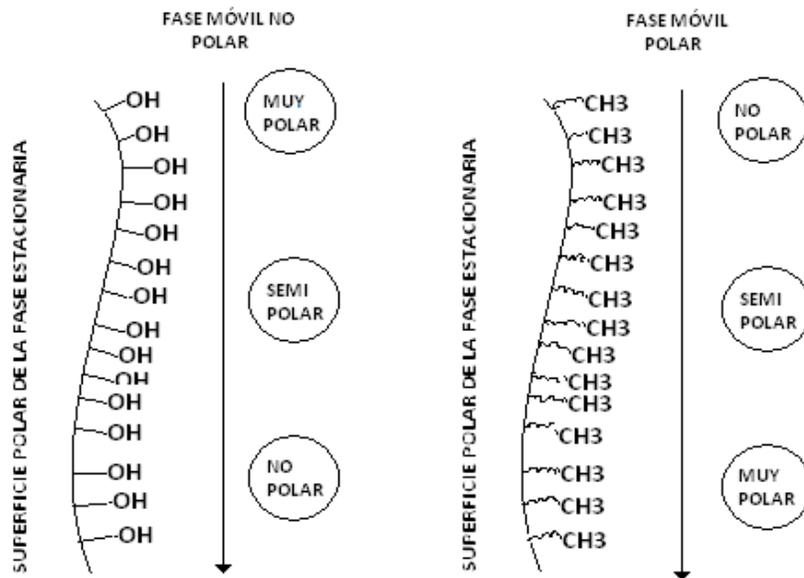
#### 1.4 Tipos de Cromatografía Líquida.

Existen cuatro tipos de sistemas utilizados en cromatografía líquida de alta resolución basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación: adsorción, partición, intercambio iónico y de exclusión.<sup>2</sup>

- a) **Cromatografía de adsorción.** Surge de las interacciones entre los solutos y la superficie de la fase estacionaria sólida, se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.<sup>2,3</sup>
- b) **Cromatografía de intercambio iónico.** Implica una fase sólida estacionaria con grupos aniónicos o catiónicos en la superficie a la que las moléculas de soluto de la muestra con carga opuesta se atraen.<sup>2,3</sup>
- c) **Cromatografía de exclusión.** Implica una fase estacionaria sólida con un tamaño de poro controlado; en ella, los solutos se separan de acuerdo al tamaño molecular.<sup>3</sup>
- d) **Cromatografía de reparto.** No se basa en la adsorción, implica una fase líquida estacionaria que es inmisible con el eluyente y revestido sobre un soporte inerte. La separación se fundamenta en el reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.<sup>3</sup>

Con base a las polaridades de la fase móvil y estacionaria se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto. (Figura. 1)

- i. **Cromatografía en fase normal.** Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina; y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente no polar como el hexano o el *iso*-propileter. A este tipo de cromatografía se le conoce como *cromatografía en fase normal*. En este tipo de cromatografía, el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución.
- ii. **Cromatografía en fase reversa.** En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol o el acetonitrilo). Los componentes más polares eluyen primero, y un aumento en la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.



**Figura. 1.** Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su orden de elución.<sup>2</sup>

### 1.5 Técnicas de separación.

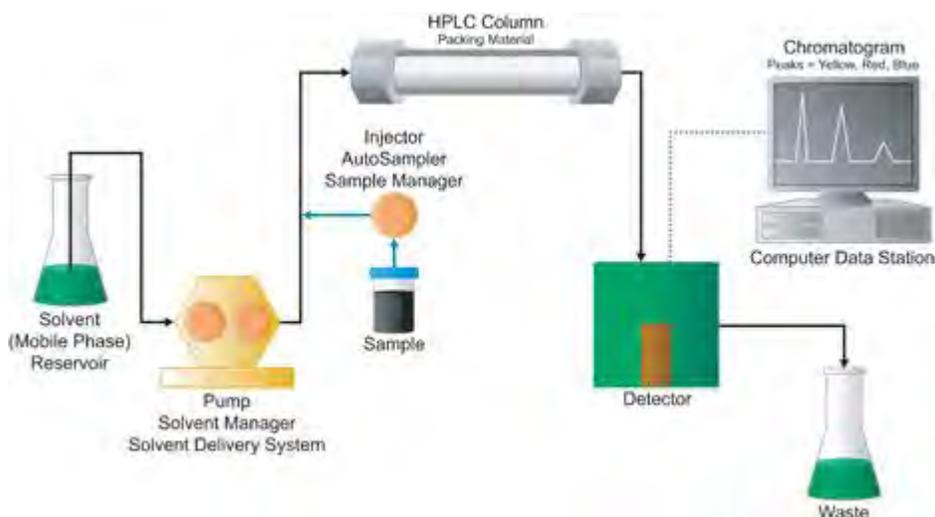
- **Isocrática:** Se habla de una separación isocrática cuando la composición de la fase móvil no cambia durante el curso de la corrida. Esta es la técnica más simple y debe ser el método de primera elección cuando se desarrolla una separación.<sup>3</sup>
- **Elución por gradiente:** Se puede realizar con cambios en la composición de la fase móvil a lo largo de la corrida cromatográfica. La fuerza de elución del eluyente se incrementa durante la corrida cambiando la polaridad, pH o fuerza iónica. La elución por gradientes puede ser de gran alcance para separar mezclas de compuestos con retención ampliamente diferente.<sup>3</sup>

### 1.6 Componentes de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La instrumentación general para un cromatógrafo de líquidos incorpora los siguientes componentes (Figura2):

- ❖ Un recipiente para la fase móvil, que puede ser de vidrio o acero inoxidable, y que puede contener de 200 a 1000 mL de un disolvente.<sup>1</sup>

- ❖ Un sistema de bombeo que impulsa a la fase móvil hacia el inyector, el sistema de bombeo es el módulo que entrega el solvente de manera exacta y precisa al resto del sistema cromatográfico.
- ❖ Un sistema de inyección, que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema, el sistema de inyección puede ser manual ó automatizado.
- ❖ Una columna de separación de acero inoxidable, que contiene el empaque necesario para efectuar la separación deseada.
- ❖ Un detector que permite observar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna.
- ❖ Un registrador que recibe y almacena la señal del detector e imprime el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos.



**Figura 2.** Componentes de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

## 2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.1 Método analítico.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.<sup>4</sup>

Para poder seleccionar correctamente un método analítico, es esencial definir la naturaleza del analito. Se necesita definir una serie de factores como son la exactitud que requiere el método, el saber de cuánta muestra se dispone y en qué intervalo de

concentraciones está el analito, si existen componentes presentes en la muestra que puedan interferir con el análisis, las propiedades físicas y químicas de la matriz biológica de la muestra y cuántas muestras hay que analizar. Teniendo en cuenta estos aspectos se puede escoger un método.

Una vez determinado el método analítico que se va a emplear, es necesario establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que el método analítico tiene las características de desempeño adecuados para cumplir los requisitos de su aplicación.<sup>1</sup>

## 2.2 Definición de Validación.

La validación implica documentar, mediante el uso de investigaciones en un laboratorio específico, que las características de funcionamiento del método son adecuadas y fiables para destinadas aplicaciones analíticas. La aceptabilidad de los datos analíticos corresponde directamente con los criterios de aceptación para validar el método.

Los métodos de análisis deben ser selectivos y sensibles para la evaluación cuantitativa de los fármacos y sus metabolitos para el buen desarrollo de estudios preclínicos, biofarmacéuticos y estudios clínicos de farmacología.

La validación del método incluye todos los procedimientos que demuestren que un método utilizado en particular para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, tales como sangre, plasma, suero u orina, es fiable y reproducible para el uso previsto y así proporcionar, a quien aplica la metodología, una seguridad sobre la técnica empleada y así poder tomar decisiones con certeza.

Los parámetros fundamentales para asegurar la aceptabilidad del desempeño de un método analítico son los siguientes: linealidad, exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra.<sup>5,6</sup>

- a) **Linealidad.** Capacidad que tiene un método analítico de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida.<sup>7</sup>
- b) **Exactitud.** Describe la proximidad o concordancia entre el resultado obtenido experimentalmente y el valor verdadero de referencia.<sup>7,8</sup>
- c) **Precisión.** La precisión de un método analítico describe la cercanía de las medidas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de un solo volumen homogéneo de la matriz biológica. La precisión se subdivide en:<sup>8</sup>

- i) **Repetibilidad:** Se denomina a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida mediante determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.<sup>7</sup>
- ii) **Reproducibilidad intralaboratorio:** Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, reactivos, analistas y laboratorios.<sup>7,8</sup>
- d) **Selectividad.** Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de otros componentes en la muestra. Por ejemplo, éstas podrían incluir metabolitos, impurezas, productos de degradación, los componentes de la matriz biológica, etc.<sup>5,7</sup>
- e) **Recobro.** La recuperación de un analito en un ensayo es la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad de analito añadido y el extraído a partir de la matriz biológica, en comparación con la respuesta obtenida de una concentración verdadera del estándar puro.<sup>8</sup>
- f) **Estabilidad de la muestra.** La estabilidad del fármaco en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz y del sistema de contención. Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que puedan darse durante la manipulación real de la muestra y el análisis.<sup>8</sup>
- g) **Límite de cuantificación.** La cantidad más baja de un analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>6</sup>
- h) **Límite de detección.** Es la menor concentración de una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>7,8</sup>
- i) **Tolerancia.** Es una medida de la capacidad del método analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal<sup>7,8,9</sup>  
Ejemplos de variaciones<sup>10</sup>
- Influencia de las variaciones de pH en una fase móvil
  - Influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil
  - Longitud de onda
  - Temperatura
  - Solventes

### 3. FUNCIÓN RENAL

#### 3.1 El Riñón

El riñón es uno de los principales órganos de eliminación de fármacos en el cuerpo, a pesar de que la eliminación del fármaco también puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo. El riñón es el órgano excretor principal para la eliminación de productos metabólicos de desecho y juega un papel importante en el mantenimiento del volumen normal de líquido y la composición de electrolitos del cuerpo. Para mantener el equilibrio de sales y agua, el riñón excreta el exceso de electrolitos, agua y productos de desecho, mientras que conserva los solutos necesarios para la función apropiada del cuerpo. Además, el riñón tiene dos funciones endocrinas: (1) la secreción de renina, que regula la presión sanguínea, y (2) la secreción de eritropoyetina, que estimula la producción de glóbulos rojos. Los procesos por los que se excreta un fármaco a través de los riñones pueden incluir cualquier combinación de los siguientes:<sup>11, 12, 13</sup>

- Filtración glomerular.
- Secreción tubular.
- Reabsorción tubular.

#### 3.2 Consideraciones anatómicas.

La anatomía del sistema renal se muestra en la Figura 3. Los riñones se encuentran en la cavidad peritoneal. Tres grandes regiones se distinguen dentro del riñón: la corteza que es la zona externa del riñón, la médula que es la parte interna y la pelvis. Las nefronas son las unidades básicas funcionales, colectivamente responsables de la eliminación de desechos metabólicos y el mantenimiento del equilibrio hídrico y electrolítico. Cada riñón contiene de 1 a 1.5 millones de nefronas. La corteza contiene los glomérulos y los túbulos proximales y distales, y la médula contiene las asas de Henle. Los glomérulos en las diferentes áreas tienen diferentes longitudes en la asa de Henle para permitir el control diferencial sobre la concentración de orina. Las asas de las nefronas yuxtamedulares (las más cercanas a la médula) se extienden casi hasta la pelvis, la zona en la que la orina formada drena a los conductos colectores.<sup>14</sup>

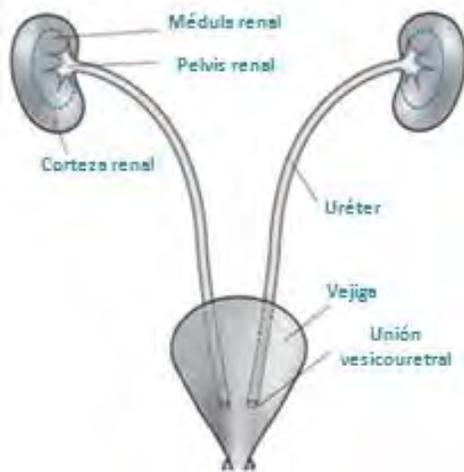


Figura. 3 Anatomía del sistema renal.

#### 4. DETERMINACIÓN DE FUNCIÓN RENAL

La medición precisa de la filtración glomerular (FG) y de la secreción tubular (ST) es valiosa para la evaluación de la función renal y nefrotoxicidad en una variedad de investigaciones clínicas y en el cuidado del paciente. La determinación precisa de GFR es recomendada para evaluar una adecuada intervención farmacocinética y monitorear el progreso de enfermedades renales.<sup>15</sup>

La FG se determina por la medición del aclaramiento del plasma de un marcador, el cual puede ser un producto endógeno del metabolismo como la creatinina o una sustancia exógena administrada; entre dicho marcadores se encuentran los compuestos yodados tales como el iopamidol; este tipo de marcadores debe poseer la característica de ser libremente filtrados en la membrana glomerular, además de no unirse a proteínas plasmáticas, no reabsorberse, secretarse o metabolizarse por los túbulos renales y no afectar la tasa de filtración glomerular.<sup>16</sup> Por su parte la ST se puede estimar usando el ácido *p*-Amino hipúrico (PAH). Para estimar la ST el PAH es un ideal marcador, ya que es libremente filtrado en el glomérulo y secretado por los túbulos renales con una reabsorción insignificante.<sup>15</sup>

#### 5. IOPAMIDOL

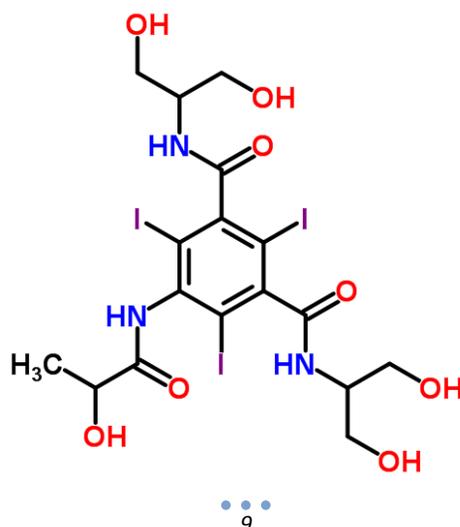
Monómero yodado como medio de contraste radiológico no iónico, el cual se presenta en solución inyectable en diferentes concentraciones, listas para su uso.

**Nomenclatura:** (S)-N, N'-Bis [2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil]-5-[(2-hidroxi-1-oxopropil) amino]-2, 4,6-triiodo-1,3-benzenodicarboxamida; (S)-N, N'-bis [2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil]-2, 4, 6-triiodo-5-lactamido-isoftalamida; Iopamidol.

**Nombre comercial:** Iopamiron®, Solucont®, Isovue, Iopamiro, Pamiray, Iopamidol, B-15000; Iopamiro; Jopamiro; Niopam; Solustrast.<sup>17, 18</sup> (The Merck Index, Martindale)

**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>I<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**Estructura:**



**Peso molecular:** 777.1 g/mol

**Contenido de Iodo:** 49%

**Propiedades Fisicoquímicas:**

- **Descripción:** Polvo blanco o casi blanco, prácticamente inodoro. Conservar a una temperatura de 25°C. Proteger de la luz.<sup>17, 18</sup>
- **Solubilidad:** Muy soluble en agua y metanol; prácticamente insoluble en etanol y cloroformo.<sup>17, 18</sup>
- **pKa:** 10.70 (25°C)<sup>17</sup>

**Farmacocinética:** El medio de contraste se distribuye en los compartimientos vascular e intersticial del organismo con un tiempo de vida media de unos 10 minutos. La eliminación renal tiene lugar casi exclusivamente por los glomérulos. A los 30-45 minutos tras la aplicación, el 50% del Iopamidol ha sido eliminado. No se une a las proteínas plasmáticas de forma significativa.<sup>18, 19, 20</sup>

**Efectos adversos:** Los efectos adversos relacionados con el uso intravascular de medios de contraste con yodo, son normalmente con los medios de contraste iónicos que con los no iónicos. Se han observado también reacciones graves de peligro mortal y se han reportado algunos casos de muerte en un porcentaje bajo de algunos pacientes.

Las reacciones que más frecuentemente se presentan con la administración IV son: náuseas, vómitos, rubor, sensación general de calor y dolor.

Además pueden aparecer los siguientes síntomas: Escalofríos, fiebre, sudor, cefalea, mareos, palidez, debilidad, disnea y asfixia, jadeo, ascenso o descenso de la presión sanguínea, prurito, urticaria, otras formas de exantema, edemas, calambres, temblor muscular, estornudos y lagrimeo.

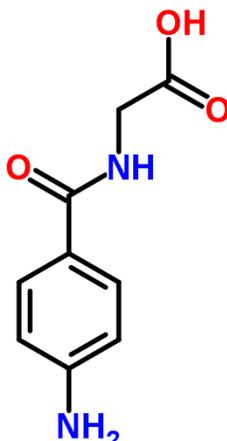
## 6. ÁCIDO *p*-AMINO HIPÚRICO

### Nomenclatura:

N-(4-Aminobenzoil) glicina; ácido N-(*p*-aminobenzoil) aminoacético; PAH.

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> **Sal sódica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> (PM=216.2 g/mol)

### Estructura



**Peso Molecular:** 194.2 g/mol.

### Propiedades fisicoquímicas:

- **Descripción:** Polvo cristalino blanco que se decolora al exponerse a la luz.
- **Solubilidad:** Soluble en 1:45 de H<sub>2</sub>O, 1:50 de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH y en 1:5 de HCl 3N; muy poco soluble en tetracloruro de carbono, en cloroformo, en éter y en benceno; fácilmente soluble, con descomposición en soluciones alcalinas con H<sub>2</sub>O y en HCl.
- **pKa:** 3.6

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el trabajo científico, la existencia de resultados analíticos poco fiables puede llevar a una sobreestimación o subestimación de los datos, obteniéndose falsas interpretaciones generando conclusiones injustificadas. Para la determinación cuantitativa de uno o varios fármacos en muestras biológicas requieren que el método analítico a utilizar sea sensible, exacto y reproducible. Ante la necesidad en nuestro laboratorio de evaluar la función renal vía la determinación cuantitativa de sustancias exógenas en plasma de rata, se pretende implementar y validar un método analítico por CLAR para la cuantificación de lopamidol y ácido *p*-Amino Hipúrico como marcadores de función renal en plasma de rata.

## III. OBJETIVO GENERAL

- Implementar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución que permita cuantificar lopamidol y Ácido *p*-Amino hipúrico en plasma de rata como marcadores para la evaluación de función renal.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Implementar bajo las condiciones experimentales del laboratorio la determinación cuantitativa simultanea de lopamidol y ácido *p*-Amino Hipúrico en micromuestras de plasma de rata por CLAR.
- Validar el método analítico implementado de acuerdo a la Norma oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
- Demostrar la aplicabilidad del método para la cuantificación de lopamidol y Ácido *p*-Ámino hipúrico.

## IV. HIPÓTESIS

El método implementado permitirá cuantificar con precisión y exactitud lopamidol y Ácido *p*-Amino hipúrico a través del uso de CLAR en micromuestras de plasma de rata.

## V. METODOLOGÍA

### A) Reactivos:

- lopamidol presentación comercial (Solucont 300, Bonaplast S. A. de C. V., lote : LA002-A)
- Ácido *p*-Amino hipúrico (Grado reactivo, Sigma-Aldrich)
- Ácido *p*-Aminobenzoico (Grado reactivo, Sigma-Aldrich)

- Acetonitrilo HPLC (J.T. Baker)
- Ácido tricloroacético (Grado reactivo, Reactivos Meyer)
- Ácido acético (J.T. Baker)

## **B) Material**

- Matraz volumétrico de 10, 25, 100 y 1000mL.
- Probeta graduada 25, 100, 500mL.
- Micropipeta multidosis eppendorf.
- Puntas para Micropipeta multidosis de 5, 2.5 y 1 mL.
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250mL.
- Matraz Erlenmeyer de 25, 50 y 250mL
- Tubos eppendorf de 1.5mL.
- Gradilla para tubos eppendorf.
- Espátulas.
- Papel glácil y papel parafilm.
- Pipetas graduadas de 5 y 10mL.

## **C) Equipo:**

- Vórtex-Genie 2 Scientific Industries.
- Agitador mecánico IKA MS 3 digital.
- Balanza analítica BEL engineering Modelo M.
- Bomba para vacío LIC modelo DDA-V152-AA.
- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore con tamaño de poro de 0.45µm.
- Parrilla de agitación Scientific Products Type 1000.
- Centrifuga Fisher Scientific Marathon 26KM.
- Sonicador Quantres L&R.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
  - Bomba Waters modelo 510.
  - Inyector manual con un asa de 20µL.
  - Detector Waters 486 Tunable Absorbance.
  - Integrador Beckman modelo 427.
  - Columna Analítica Symmetry®C18 5 µm (150mm x 4.6mm I. D.).
  - Pre-columna analítica Zorbax SB-C18 5 µm (12.5mm x 4.6mm).

#### D) Condiciones cromatográficas.

Para la extracción de los analitos de la muestra de interés se empleó una extracción líquido-líquido con  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , lográndose la separación y cuantificación de los analitos en un equipo cromatográfico trabajando con un detector UV a una longitud de onda de 270nm, utilizando una columna Symmetry C18  $5\mu\text{m}$  (15cm x 4.6mm I.D) acoplada a una pre-columna analítica Zorbax SB-C18  $5\mu\text{m}$  (12.5mm x 4.6mm), empleando una bomba Waters modelo 510 a un flujo de 0.3mL/min con una fase móvil de 0.1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : Acetonitrilo en una proporción de 90:10v/v y utilizando PABA como estándar interno, registrando las respuestas en un integrador Beckman modelo 427. Teniendo un intervalo de trabajo de concentraciones para lopamidol de 15, 30, 60, 90 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para el Ácido *p*-Amino Hipúrico de 2.5, 5, 15, 45, 80 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Una vez que se logró la resolución y sensibilidad adecuada entre los compuestos dentro del intervalo propuesto, se procedió a validar el método como se menciona a continuación.

#### E) Validación del método analítico.

- **SISTEMA**

- **Linealidad:** Se prepararon tres curvas de calibración con seis niveles de concentración para el PAH (2.5, 5, 15, 45, 80 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cinco para lopamidol (15, 30, 60, 90 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sin la matriz biológica como se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Curva de calibración para la determinación simultánea de PAH y lopamidol en sistema.

Conc. PAH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Solución PAH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Alícuota ( $\mu\text{L}$ )	Conc. lopamidol ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Solución lopamidol ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Alícuota ( $\mu\text{L}$ )	PABA 100( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	$\text{CCl}_3\text{COOH}$ 2.5% ( $\mu\text{L}$ )
2.5	50	50	----	----	----	50	900
5	50	100	15	200	75	50	775
15	200	75	30	200	150	50	725
45	1000	45	60	1000	60	50	845
80	1000	80	90	1000	90	50	780
120	1000	120	120	1000	120	50	710

- **Precisión del sistema:** Se analizaron por sextuplicado el nivel medio de la curva de calibración (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para lopamidol y para PAH 15 y 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

- **MÉTODO**

- **Linealidad:** Se realizaron seis curvas de calibración con seis niveles de concentración para el PAH (2.5, 5, 15, 45, 80 y 120 µg/mL) y cinco para Iopamidol (15, 30, 60, 90 y 120 µg/mL) con la matriz biológica de acuerdo al cuadro 3.

**Cuadro 3.** Curva de calibración para la determinación simultánea de PAH y Iopamidol en método.

Conc. PAH (µg/mL)	Solución PAH (µg/mL)	Alícuota (µL)	Conc. Iopamidol (µg/mL)	Solución Iopamidol (µg/mL)	Alícuota (µL)	PABA 100(µg/mL)	Plasma (µL)	CCl <sub>3</sub> COOH 2.5% (µL)
2.5	50	50	----	----	----	50	100	800
5	50	100	15	200	75	50	100	675
15	200	75	30	200	150	50	100	625
45	1000	45	60	1000	60	50	100	745
80	1000	80	90	1000	90	50	100	680
120	1000	120	120	1000	120	50	100	610

- **Precisión:**
  - **Repetibilidad:** Se analizaron en un mismo día por quintuplicado tres concentraciones de la curva de calibración (Iopamidol=17, 50 y 100 µg/mL y PAH= 3.75, 22 Y 90 µg/mL).
  - **Reproducibilidad intralaboratorio:** Se determinó analizando por duplicado en tres días diferentes tres concentraciones de la curva de calibración (Iopamidol=17, 50 y 100 µg/mL y PAH= 3.75, 22 Y 90 µg/mL).
- **Exactitud:** De los datos obtenidos de precisión se procedió a determinar la exactitud, calculando el por ciento referido al valor nominal de cada determinación.
- **Selectividad:** La selectividad del método se realizó al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis fuentes diferentes, verificando que no existiera interferencia entre los tiempos de retención de los compuestos endógenos de la matriz y las sustancias de interés.
- **Recobro:** Se evaluó por triplicado la curva de calibración para cada compuesto en la matriz biológica y se comparó las mismas concentraciones en solución obteniendo el por ciento de recobro.

- **Estabilidad de la muestra:** Se sometieron muestras con concentraciones conocidas por duplicado como estabilidad de muestra no procesada y como muestra procesada a diferentes temperaturas y periodos de almacenamiento.
- **Limite de cuantificación:** La concentración más baja de la curva de calibración de cada compuesto se analizó por quintuplicado.
- **Limite de detección:** Para determinar la concentración a la cual la señal de los compuestos de interés en la matriz biológica se pueden distinguir de los niveles de ruido se propusieron cuatro concentraciones por de bajo del limite de cuantificación (Iopamidol= 14, 12, 10 y 8 µg/mL y PAH= 2, 1.5, 1 Y 0.5 µg/mL).
- **Tolerancia:** Se evaluó la tolerancia del método analítico a pequeñas modificaciones como lo fue el cambio en la longitud de onda de 270nm a 254nm y para optimizar el tiempo de corrida se aumentó la velocidad de flujo de 0.3mL/min a 0.5mL/min.

**F) Aplicabilidad del método.** La utilidad del método validado se demostró al llevar a cabo un perfil farmacocinético para la cuantificación de Iopamidol y PAH en ratas de la cepa Sprague Dawley administradas con una dosis de Iopamidol de 200mg/Kg de peso y de PAH 100mg/Kg de peso, por vía intravenosa. Tomando muestras plasmáticas a diferentes tiempos.

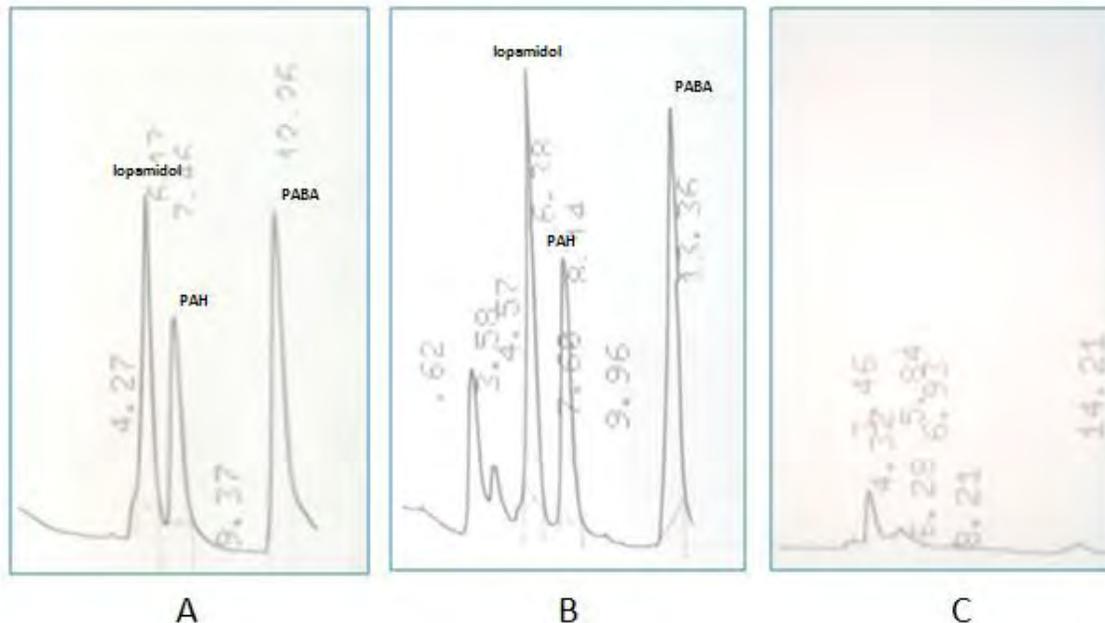
## VI. RESULTADOS

### a) Selectividad.

Se verificó que no se presentara interferencia alguna entre los tiempos de retención de las sustancias de interés a analizarse y/o los productos endógenos de la matriz biológica al ser comparados con sus respectivos blancos. Obteniendo los tiempos de retención reportados en el cuadro 4 en un tiempo total de corrida de 15 minutos. Los cromatogramas obtenidos se pueden observar en la figura 4.

**Cuadro 4.** Tiempos de retención obtenidos para el método analítico.

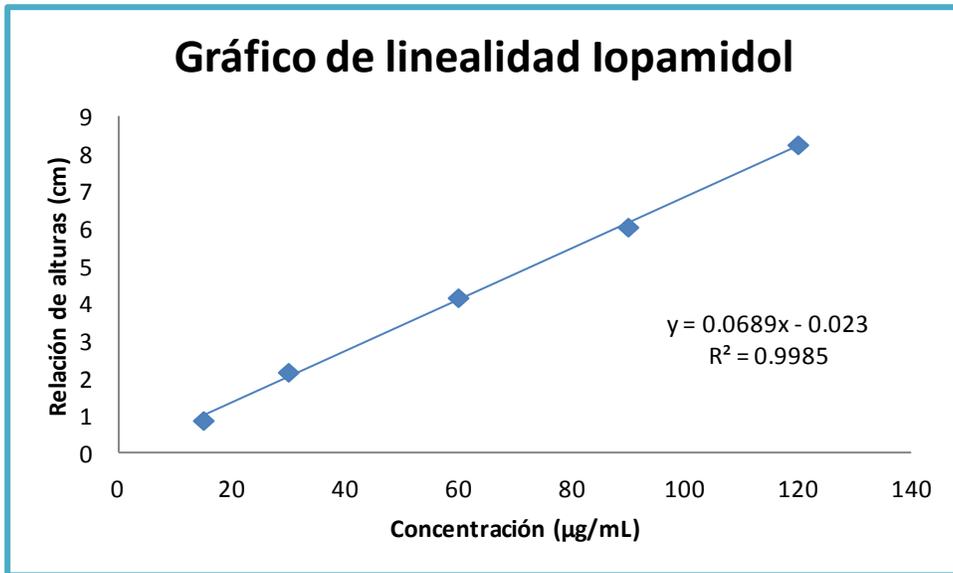
COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Iopamidol	6.23
Ácido <i>p</i> -Amino Hipúrico	7.99
Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	13.32



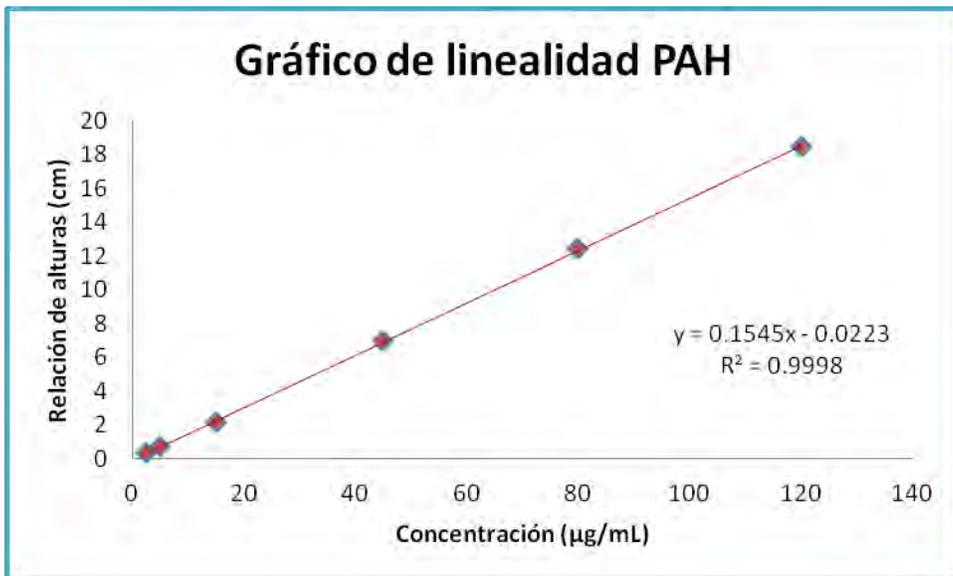
**Figura 4.** Espectros cromatográficos obtenidos: A) Cromatograma obtenido de una inyección a una concentración de lopamidol de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de Ácido *p*-amino hipúrico de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en sistema. B) Cromatograma obtenido de una inyección a una concentración de lopamidol de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de Ácido *p*-amino hipúrico de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en plasma de rata. C) Blanco de plasma de rata.

#### b) Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se evaluó preparando tres curvas de calibración con un rango de concentraciones para lopamidol de 15, 30, 60, 90 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 2.5, 5, 15, 45, 80 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el ácido *p*-amino hipúrico sin la matriz biológica (ver cuadro 2), obteniéndose un gráfico lineal con un coeficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0.99$  para ambos compuestos de interés (Figuras 5 y 6).



**Figura. 5** Promedio de tres determinaciones de linealidad en sistema para Iopamidol cumpliendo especificaciones con la NOM-177-SSA1-1998.



**Figura. 6** Promedio de tres determinaciones de linealidad en sistema de PAH cumpliendo especificaciones con la NOM-177-SSA1-1998.

### c) Precisión del sistema.

La precisión en sistema se evaluó preparando el punto medio de la curva de calibración para lopamidol y PAH por sextuplicado.

**Cuadro 5.** Datos obtenidos de seis determinaciones de lopamidol a una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$  sin la matriz biológica.

Concentración teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Promedio de relación de alturas (cm)	Desv. Est	%CV
60	6.5970	0.2588	3.9226

**Cuadro 6.** Datos obtenidos de seis determinaciones de PAH a una concentración de 15 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$  sin la matriz biológica.

Concentración teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Promedio de relación de alturas (cm)	Desv. Est	%CV
15	2.8834	0.0475	0.3738
45	9.3727	1.6479	3.9883

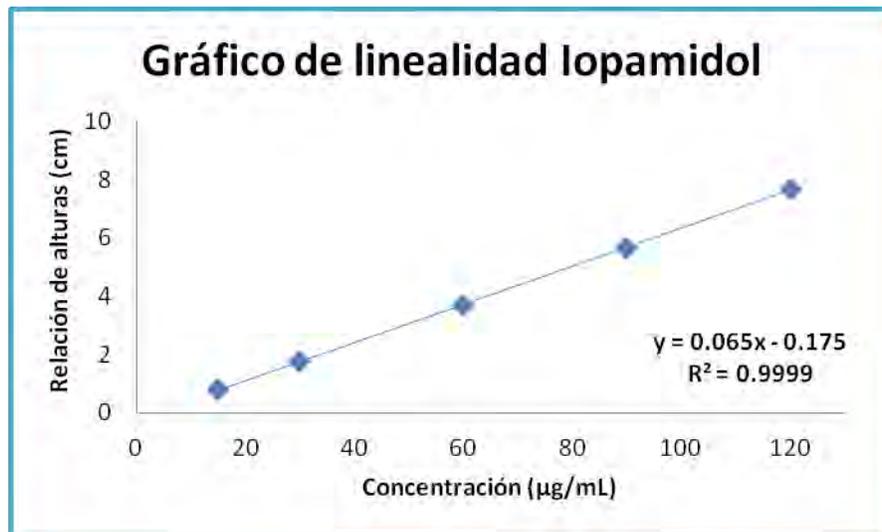
### d) Linealidad del método.

La linealidad del método es la proporcionalidad entre las concentraciones de lopamidol y PAH contenidos en la matriz biológica, la respuesta medida para el método estuvo definida como la relación de alturas entre la altura del problema y la altura del estándar interno.

En los cuadros 7 y 8 se presentan los coeficientes de determinación y el por ciento del coeficiente de variación para cada uno de los puntos en las curvas obtenidas. Las representaciones gráficas de lopamidol y PAH se observan en las figuras 6 y 7 respectivamente.

**Cuadro 7.** Curvas de Función-Respuesta para lopamidol.  $r^2$  = Coeficiente de determinación y %CV = por ciento de coeficiente de variación.

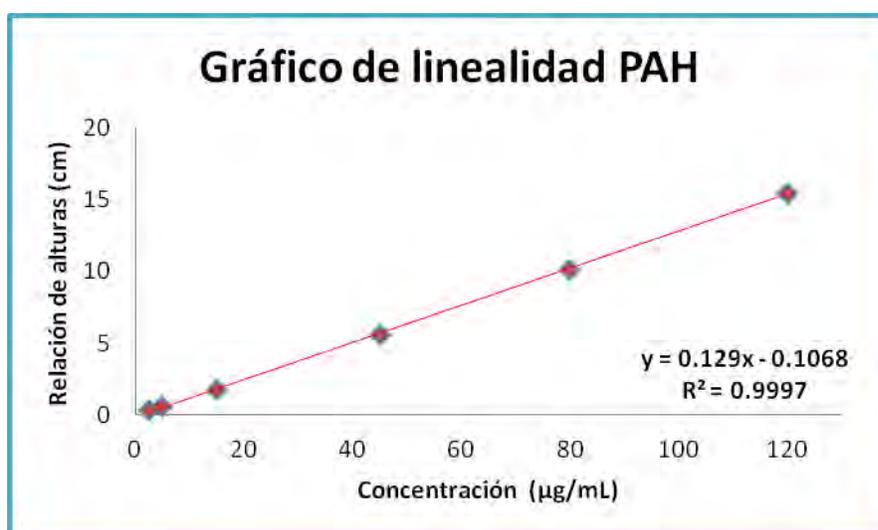
Concentración lopamidol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relación de alturas	Promedio de alturas	Desv. Est.	%CV					
15	0.6792	0.6525	0.6885	0.8736	0.9600	1.0192	0.8122	0.1593	19.6178
30	1.5593	1.6316	1.6786	1.9615	1.9423	1.9259	1.7832	0.1797	10.0801
60	4.0000	4.1667	3.2500	4.0000	3.1250	3.7143	3.7093	0.4314	11.6305
90	5.4286	6.0000	6.0000	6.0000	5.3571	5.1429	5.6548	0.3897	6.8916
120	8.0000	8.5455	8.5455	7.3846	6.6667	6.7857	7.6547	0.8379	10.9463
$r^2$	0.9931	0.9975	0.9892	0.9942	0.9911	0.9997	0.9999		



**Figura 7.** Representación gráfica de los promedios de la Función-Respuesta para lopamidol en plasma de rata, en un intervalo de concentración de 15-120 $\mu\text{g/mL}$ .

**Cuadro 8.** Curvas de Función-Respuesta para Ácido *p*-Amino Hipúrico.  $r^2$  = Coeficiente de determinación y %CV = por ciento de coeficiente de variación.

Concentración PAH ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relación de alturas	Promedio de alturas	Desv. Est.	%CV					
2.5	0.2623	0.3684	0.3793	0.3000	0.2833	0.3043	0.3163	0.0471	14.8962
5	0.6226	0.5763	0.5738	0.7356	0.6400	0.6154	0.6273	0.0592	9.4394
15	1.6780	0.1667	1.8036	1.7885	1.7500	1.7593	1.7410	0.0567	3.2574
45	6.0000	6.3330	4.7500	6.1667	4.6875	5.4286	5.5610	0.7203	12.9531
80	9.4286	10.8333	10.8333	10.8333	9.5714	9.4286	10.1548	0.7452	7.3381
120	16.1667	17.2727	17.2727	15.0769	13.2000	13.8571	15.4744	1.7259	11.1533
$r^2$	0.9935	0.9983	0.9905	0.9970	0.9960	0.9997	0.9997		



**Figura 8.** Representación gráfica de los promedios de la Función-Respuesta para Ácido *p*-Amino Hipúrico en plasma de rata, en un intervalo de concentración de 2.5-120 $\mu\text{g/mL}$ .

#### e) Precisión.

##### Repetibilidad:

La precisión del método valorada como repetibilidad se determinó por medio del por ciento del coeficiente de variación obtenido en 3 niveles de concentración (baja, media y alta del rango de concentraciones) para lopamidol y PAH, analizados por quintuplicado bajo las mismas condiciones experimentales el mismo día del análisis. Los resultados se pueden observar en el cuadro 9 para lopamidol y cuadro 10 para el Ácido *p*-Amino Hipúrico. Criterio de aceptación de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998:  $CV \leq 15\%$

**Cuadro 9.** Repetibilidad del método para lopamidol en plasma de rata.

Concentración (µg/mL)	Concentraciones obtenidas					Promedio (µg/mL)	Desv. Est.	%CV
	1	2	3	4	5			
<b>17</b>	17.1281	17.8824	17.7941	17.3454	17.3454	<b>17.4991</b>	0.3236	1.8492
<b>50</b>	49.8923	49.8923	49.8923	49.8923	47.7648	<b>49.4668</b>	0.9515	1.9234
<b>100</b>	98.8259	100.9534	103.0810	100.9534	103.0810	<b>101.3789</b>	1.7800	1.7558

**Cuadro 10.** Repetibilidad del método del Ácido *p*-Amino Hipúrico en plasma de rata.

Concentración (µg/mL)	Concentraciones obtenidas					Promedio (µg/mL)	Desv. Est.	%CV
	1	2	3	4	5			
<b>3.75</b>	3.7110	3.6502	3.4846	3.4071	3.4071	<b>3.5320</b>	0.3236	3.9904
<b>22</b>	23.2669	21.0144	21.4649	21.4649	23.2669	<b>22.0956</b>	1.0849	4.9101
<b>90</b>	89.9390	86.7856	88.1371	86.3351	88.1371	<b>87.8668</b>	1.4102	1.6050

**Reproducibilidad.**

La precisión del método evaluada en términos de reproducibilidad se evaluó en 3 niveles de concentración (baja, media y alta) y en tres días diferentes bajo las mismas condiciones de análisis. Demostrando en los cuadros 11 y 12 un coeficiente de variación menor al 15% para los diferentes niveles de concentración de lopamidol y Ácido *p*-Amino Hipúrico.

**Cuadro 11.** Resultados de precisión del método en términos de reproducibilidad para lopamidol.

Día del análisis	Concentración 17µg/mL	Concentración 50µg/mL	Concentración 100µg/mL
<b>1</b>	16.8410	54.1719	101.2638
	16.2614	54.1719	100.3918
<b>2</b>	17.7689	51.8690	98.7888
	19.1966	53.4869	98.7888
<b>3</b>	18.8735	53.0850	103.0980
	17.8207	51.2326	101.2456
<b>Promedio</b>	<b>17.7937</b>	<b>53.0029</b>	<b>100.5962</b>
<b>Desv. Est.</b>	1.1306	1.2160	1.6554
<b>%CV</b>	6.3538	2.2943	1.6456

**Cuadro 12.** Resultados de precisión del método en términos de reproducibilidad para Ácido *p*-Amino Hipúrico.

Día del análisis	Concentración 3.75µg/mL	Concentración 22µg/mL	Concentración 90µg/mL
<b>1</b>	3.8346	21.9865	88.6569
	3.8803	22.9670	88.6569
<b>2</b>	3.6829	20.8490	89.1832
	4.0243	21.8393	88.1929
<b>3</b>	4.0484	22.9199	91.0023
	3.9005	22.9199	89.9862
<b>Promedio</b>	<b>3.8952</b>	<b>22.2469</b>	<b>88.6725</b>
<b>Desv. Est.</b>	0.1335	0.8500	0.4047
<b>%CV</b>	3.4279	3.8207	0.4564

**f) Exactitud.**

La exactitud fue determinada como el por ciento del valor nominal del analito obtenido en cada uno de los niveles de concentración analizados (bajo, medio y alto). Los resultados obtenidos se muestran en los cuadros 13 y 14 para lopamidol y el Ácido *p*-Amino Hipúrico respectivamente. El criterio de aceptación para esta prueba establece que el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal (NOM-177-SSA1-1998).

**Cuadro 13.** Resultados de exactitud del método para lopamidol.

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)	% De valor nominal	Promedio del %
<b>17</b>	16.9153	99.5020	<b>102.6854</b>
	17.8824	105.1906	
	17.7941	104.6712	
	17.3454	102.0316	
	17.3454	102.0316	
<b>50</b>	49.8923	99.7846	<b>98.9336</b>
	49.8923	99.7846	
	49.8923	99.7846	
	49.8923	99.7846	
	47.7648	95.5295	
<b>100</b>	98.8259	98.8259	<b>101.3789</b>
	100.9534	100.9534	
	103.0810	103.0810	
	100.9534	100.9534	
	103.0810	103.0810	

**Cuadro 14.** Resultados de exactitud del Ácido p-Amino Hipúrico.

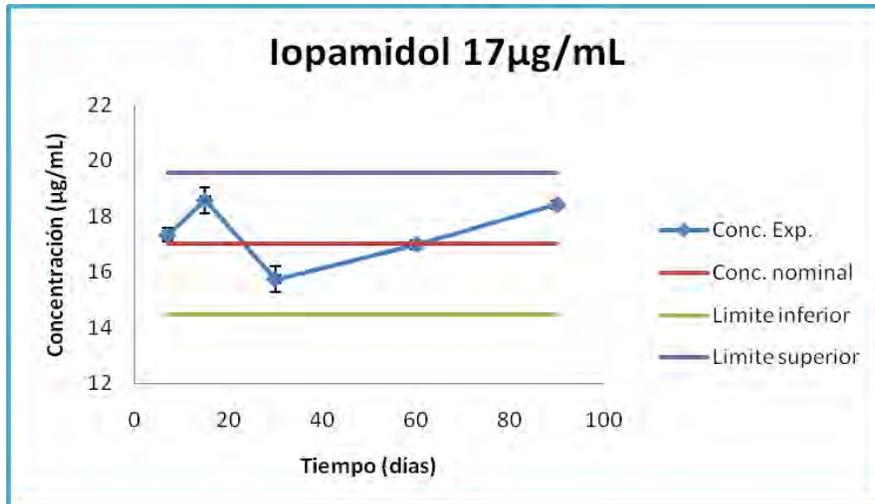
Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)	% De valor nominal	Promedio del %
<b>3.75</b>	3.6707	97.8847	<b>93.9716</b>
	3.6502	97.3387	
	3.4846	92.9229	
	3.4071	90.8559	
	3.4071	90.8559	
<b>22</b>	23.2669	105.7585	<b>100.4346</b>
	21.0144	95.5202	
	21.4649	97.5679	
	21.4649	97.5679	
	23.2669	105.7585	
<b>90</b>	89.9390	99.9322	<b>97.6297</b>
	86.7856	96.4284	
	88.1371	97.9301	
	86.3351	95.9279	
	88.1371	97.9301	

**g) Estabilidad muestra no procesada.**

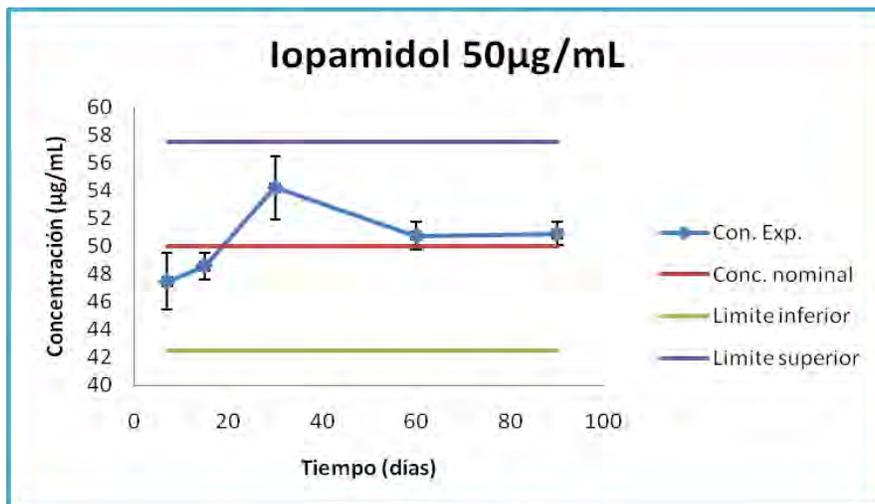
Se colocaron a -20°C por duplicado muestras plasmáticas conteniendo únicamente las sustancias de interés en tres niveles de concentración (Iopamidol= 17, 50 y 100µg/mL y PAH= 3.75, 22 y 90 µg/mL) a diferentes periodos de almacenamiento. En los cuadros 15 y 16 se pueden observar los resultados obtenidos para las diferentes etapas de análisis.

**Cuadro 15.** Concentración experimental obtenida en muestras no procesadas de Iopamidol almacenadas a -20 °C por 7, 15, 30, 60 y 90 días.

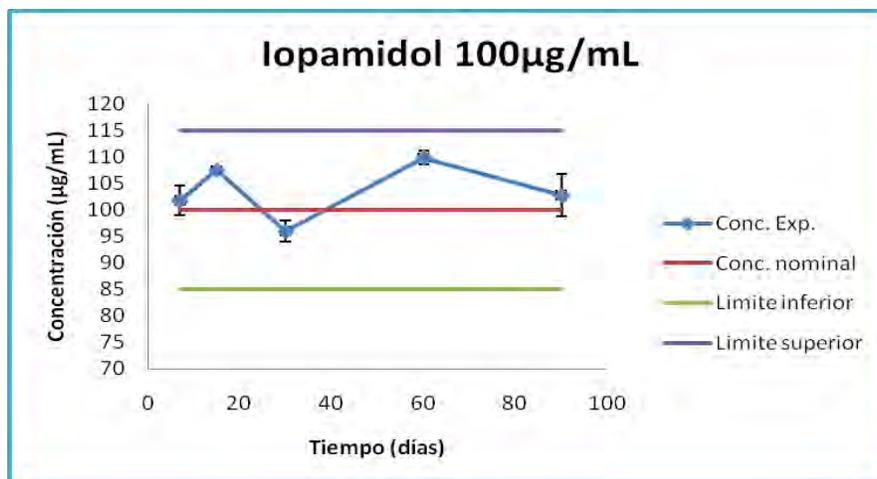
Concentración (µg/mL)	Día 7		Día 15		Día 30		Día 60		Día 90	
	Con. real (µg/mL)	%CV								
<b>17</b>	17.3234	2.7895	18.5767	5.0324	15.7301	5.8710	16.9736	1.4804	18.4090	0.3378
<b>50</b>	48.5703	8.4017	54.1979	3.5674	50.7378	9.0048	50.8803	3.8685	47.4452	3.5316
<b>100</b>	101.7552	5.4254	107.5169	0.0	95.9531	4.2528	109.8422	2.4436	102.7578	7.8957



**Figura 9.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de Iopamidol a una concentración de 17µg/mL.



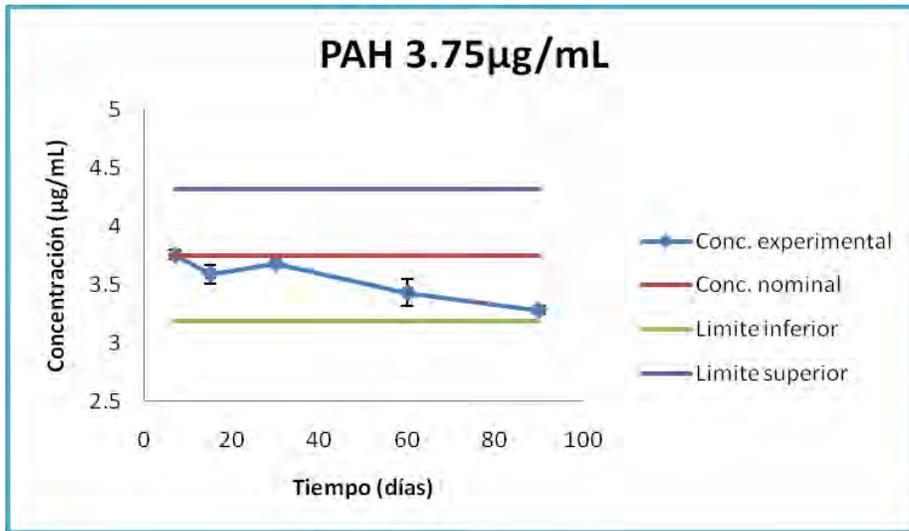
**Figura 10.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de Iopamidol a una concentración de 50µg/mL.



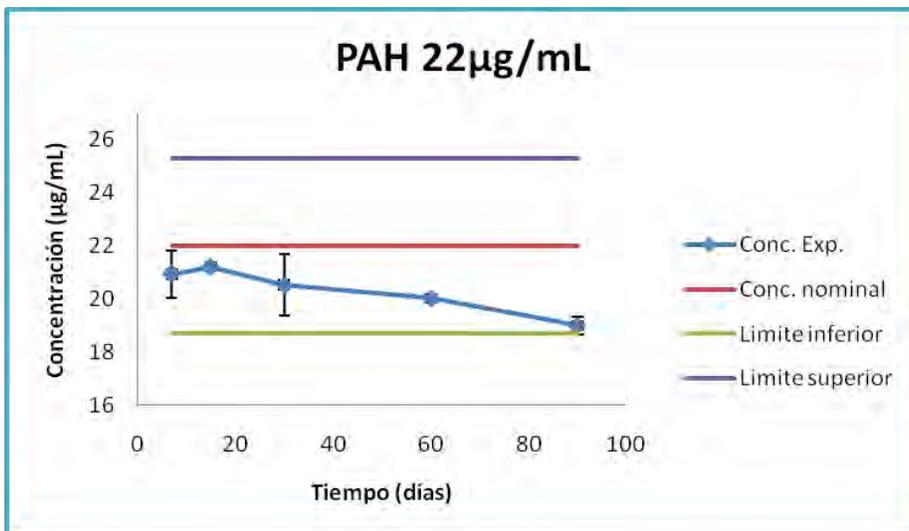
**Figura 11.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de Iopamidol a una concentración de 100µg/mL

**Cuadro 16.** Concentración experimental obtenida en muestras no procesadas de Ácido *p*-Amino Hipúrico almacenadas a -20 °C por 7, 15, 30, 60 y 90 días.

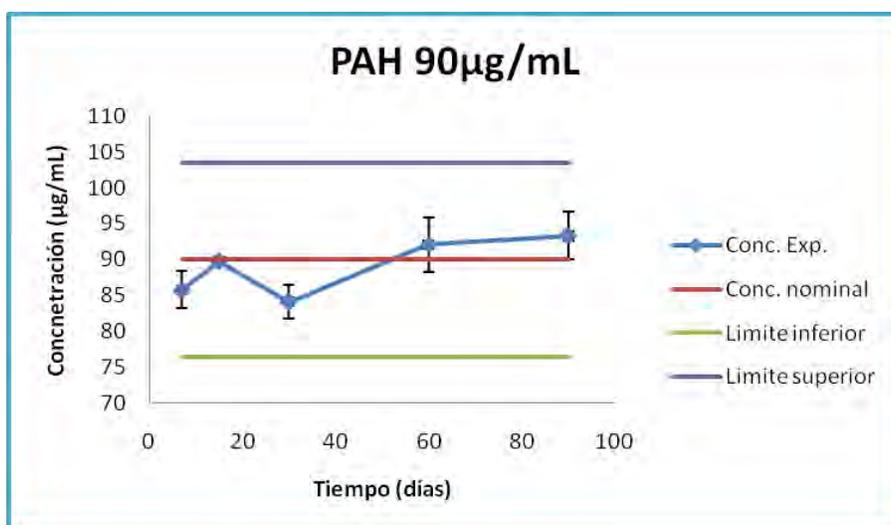
Concentración (µg/mL)	Día 7		Día 15		Día 30		Día 60		Día 90	
	Con.real (µg/mL)	%CV	Con.real (µg/mL)	%CV	Con.real (µg/mL)	%CV	Con. real (µg/mL)	%CV	Con. real (µg/mL)	%CV
<b>3.75</b>	3.7575	1.9416	3.5904	4.5646	3.6818	0.8611	3.4303	6.7512	3.2833	0.5810
<b>22</b>	20.9361	8.3632	21.2194	0.0	20.5234	11.3752	20.0241	0.0	19.0052	3.6298
<b>90</b>	85.7830	6.0976	89.7652	0.0	84.1134	5.6088	92.0913	8.2376	93.2945	7.1334



**Figura 12.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de PAH a una concentración de 3.75µg/mL



**Figura 13.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de PAH a una concentración de 22µg/mL



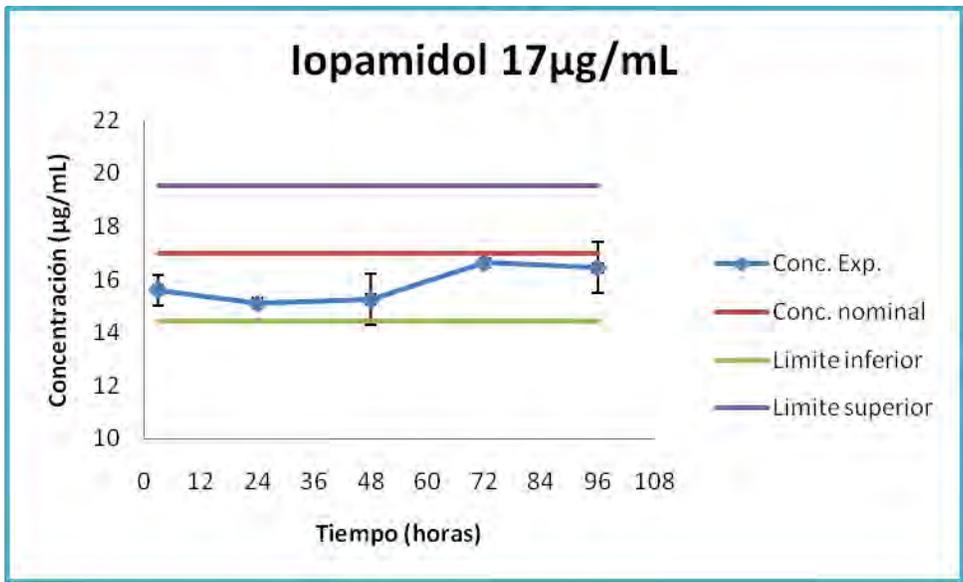
**Figura 14.** Representación gráfica de estabilidad de muestra no procesada de PAH a una concentración de 90µg/mL

#### h) Estabilidad muestra procesada.

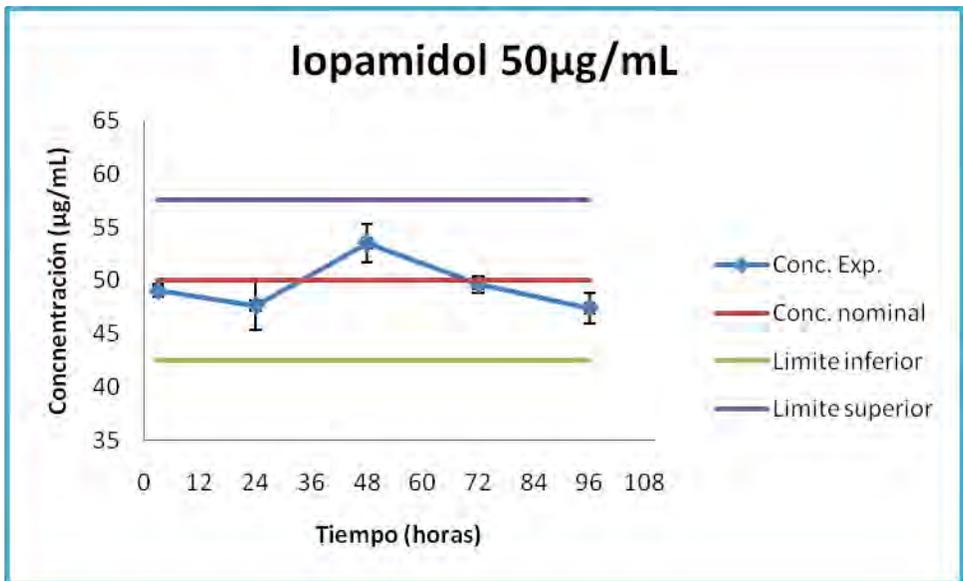
Se procesaron por duplicado las muestras control (nivel bajo, medio y alto del rango de concentraciones) y se almacenaron a -5°C para su posterior análisis a las 24, 48, 72 y 96 horas.

**Cuadro 17.** Concentración experimental obtenida en muestras procesadas de lopamidol almacenadas a -5 ° C a 24, 48, 72 y 96 horas.

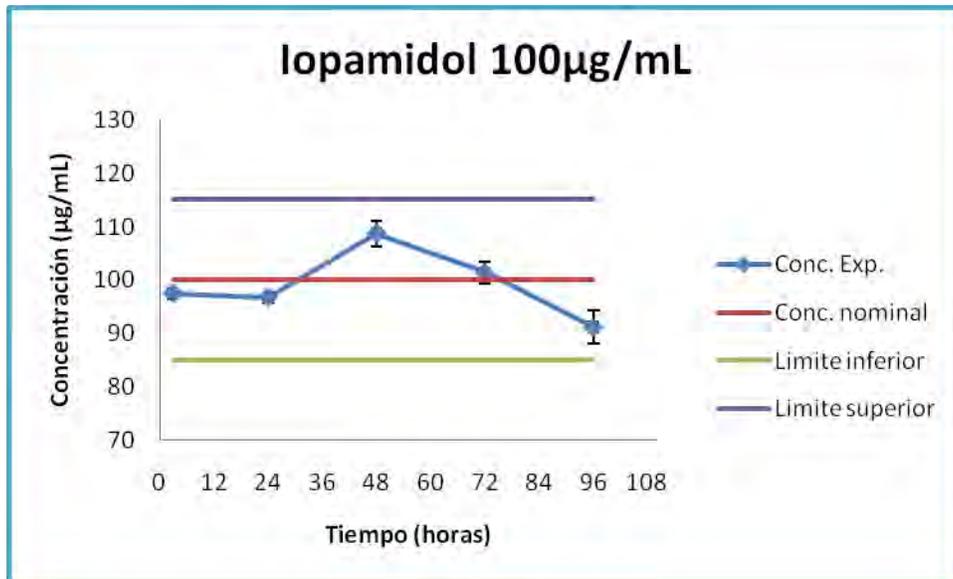
Conc. (µg/mL)	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas	
	Con. Real (µg/mL)	%CV	Con. Real (µg/mL)	%CV	Con. Real (µg/mL)	%CV	Con. Real (µg/mL)	%CV
17	15.1074	1.1587	15.2491	12.3692	16.6270	1.1329	16.4366	11.6721
50	47.6220	9.6768	53.4992	6.7103	49.6243	2.9678	47.4016	6.0760
100	96.7220	1.0826	108.7504	4.3556	101.3810	3.9222	91.2031	6.9474



**Figura 15.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de Iopamidol una concentración de 17µg/mL a diferentes días.



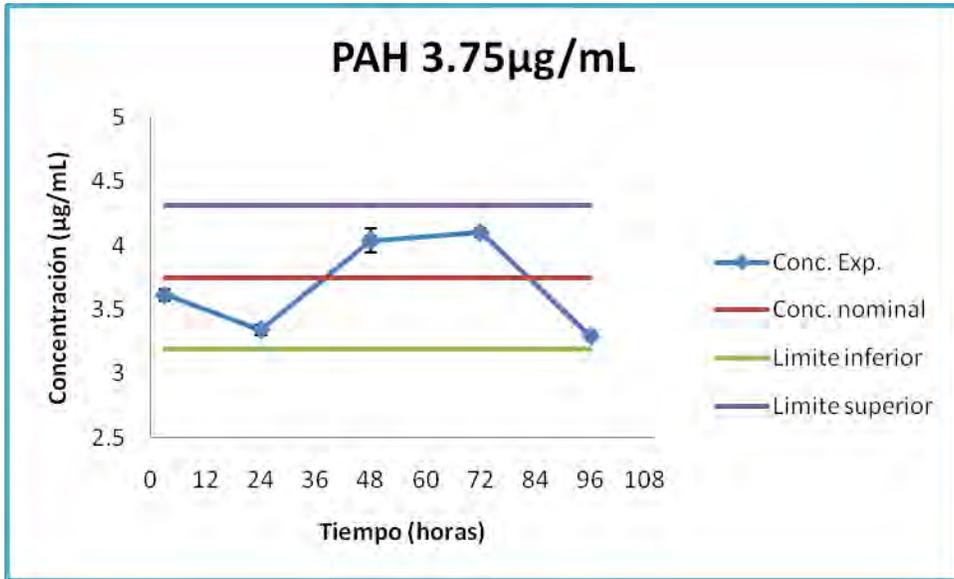
**Figura 16.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de Iopamidol una concentración de 50µg/mL a diferentes días.



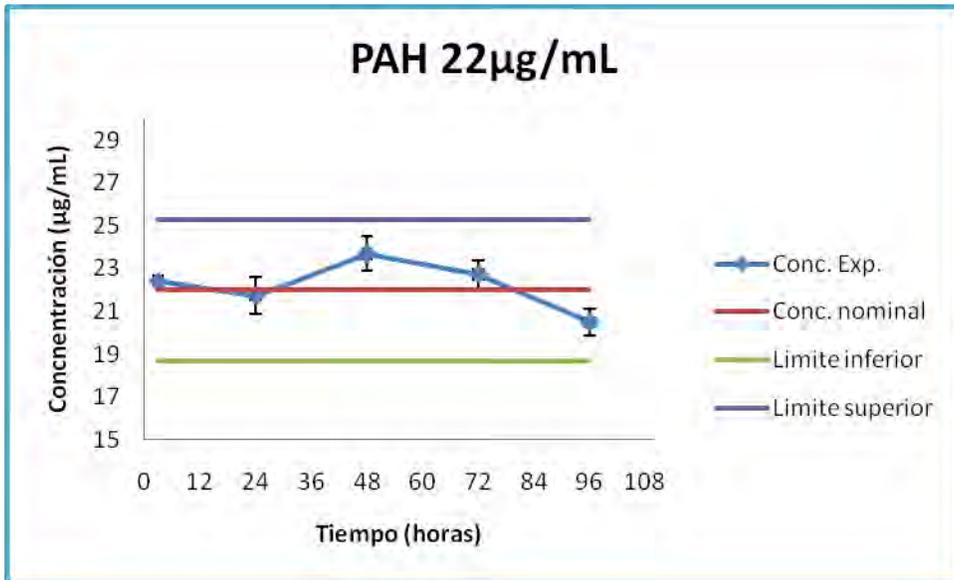
**Figura 17.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de Iopamidol una concentración de 100µg/mL a diferentes días.

**Cuadro 18.** Concentración experimental obtenida en muestras procesadas de PAH almacenadas a -5 °C a 24, 48, 72 y 96 horas.

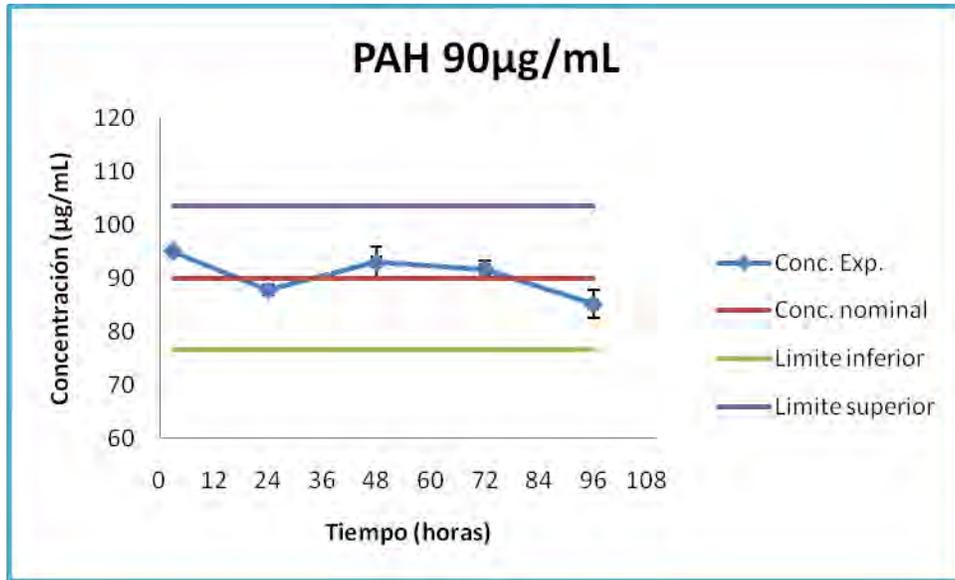
Conc. (µg/mL)	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas	
	Con. Real (µg/mL)	%CV						
<b>3.75</b>	3.3406	2.5314	4.0394	4.4399	4.1007	0	3.2928	0.5136
<b>22</b>	21.734	7.7581	23.68	6.7413	22.7233	5.7482	20.4992	6.1691
<b>90</b>	87.7694	1.5643	93.006	6.1504	91.6249	3.7065	85.0867	6.0724



**Figura 18.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de PAH una concentración de 3.75µg/mL a diferentes días.



**Figura 19.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de PAH una concentración de 22µg/mL a diferentes días.



**Figura 20.** Representación gráfica de estabilidad de muestra procesada de PAH una concentración de 90µg/mL a diferentes días.

**i) Límite de cuantificación.**

Los resultados reportados de éste parámetro (cuadros 19 y 20) demostraron que el límite de cuantificación para ambos analitos cumple con las especificaciones de la NOM-177-SSA1-1998.

**Cuadro 19.** Resultados de límite de cuantificación para Iopamidol en plasma de rata.

Concentración (µg/mL)	Relación de alturas (cm)	Concentración real (µg/mL)	% de valor nominal
<b>15</b>	0.8810	17.3032	115.3548
	0.7273	14.4089	96.0591
	0.6852	13.6162	90.7746
	0.7193	14.2587	95.0578
	0.7609	15.0416	100.2774
<b>Promedio</b>	0.7547	14.9257	<b>99.5047</b>
<b>Desv. Est.</b>	0.0755	1.4224	9.4827
<b>CV</b>	10.0085	9.5299	9.5298

**Cuadro 20.** Resultados de límite de cuantificación de la determinación del Ácido *p*-Amino Hipúrico en plasma de rata.

Concentración (µg/mL)	Relación de alturas (cm)	Concentración real (µg/mL)	% de valor nominal
<b>2.5</b>	0.3061	2.2436	89.7437
	0.2931	2.1503	86.0135
	0.2869	2.1058	84.2319
	0.3511	2.5655	102.6203
	0.2881	2.1148	84.5901
<b>Promedio</b>	0.3051	2.2360	<b>89.4399</b>
<b>Desv. Est.</b>	0.0268	0.1921	7.6844
<b>CV</b>	8.7978	8.5917	8.5917

**j) Límite de detección.**

En este parámetro se determinó la concentración mínima detectable de lopamidol y PAH diferenciable a la señal de ruido generado por el equipo.

Obteniéndose las siguientes concentraciones como límite de detección:

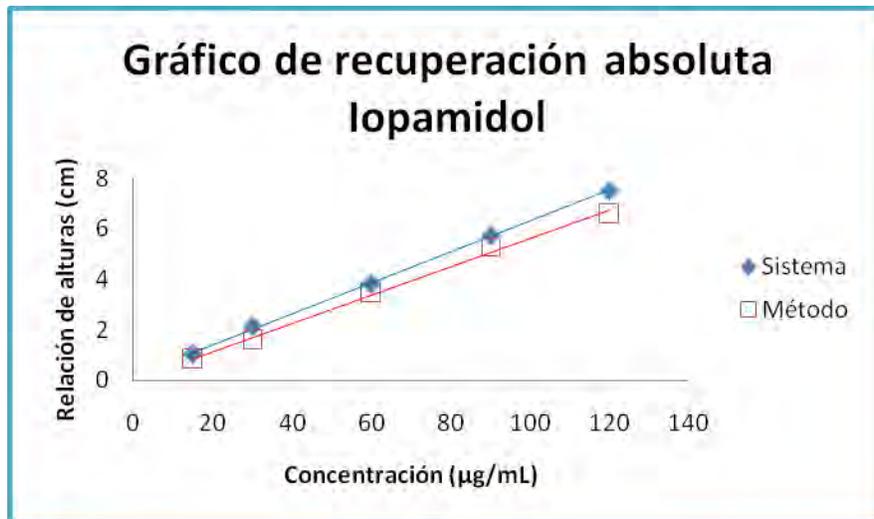
- **Iopamidol 10µg/mL**
- **Ácido *p*-Amino Hipúrico 1µg/mL**

**k) Recobro.**

Para poder evaluar el recobro del método se preparó por triplicado el rango de concentraciones en la matriz biológica y se comparó la misma en sistema.

**Cuadro 21.** Recuperación absoluta de Iopamidol en método.

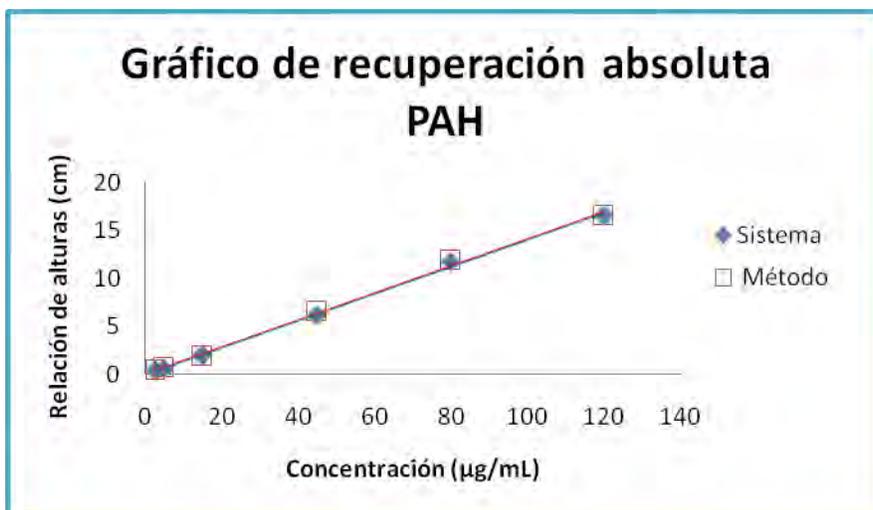
Concentración teórica (µg/mL)	Promedio de relación de alturas (cm)	Concentración obtenida (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	Desv. Est.	% CV
<b>15</b>	0.8288	14.5736	97.1571	0.5078	3.4841
<b>30</b>	1.5957	28.2020	94.0067	2.2998	8.1547
<b>60</b>	3.4667	61.4481	102.0067	7.3982	12.0397
<b>90</b>	5.2980	93.9903	104.4135	2.571	2.7526
<b>120</b>	6.5808	116.7860	97.3217	5.2646	4.5079



**Figura. 21** Comparación de la recuperación absoluta en el sistema contra la recuperación absoluta en el método.

**Cuadro 22.** Recuperación absoluta de Ácido *p*-Amino Hipúrico en método.

Concentración teórica (µg/mL)	Promedio de relación de alturas (cm)	Concentración obtenida (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)	Desv. Est.	% CV
2.5	0.4432	2.7154	108.6167	0.0701	2.5812
5	0.6909	4.4799	89.5981	0.1151	2.5696
15	1.8936	13.0455	86.9702	0.8018	6.1465
45	6.5444	46.1691	102.5979	4.8788	10.5672
80	11.8283	83.8010	104.7512	11.4127	13.6188
120	16.5303	117.2891	97.7409	3.5083	2.9912



**Figura. 22** Comparación de la recuperación absoluta en el sistema contra la recuperación absoluta en el método.

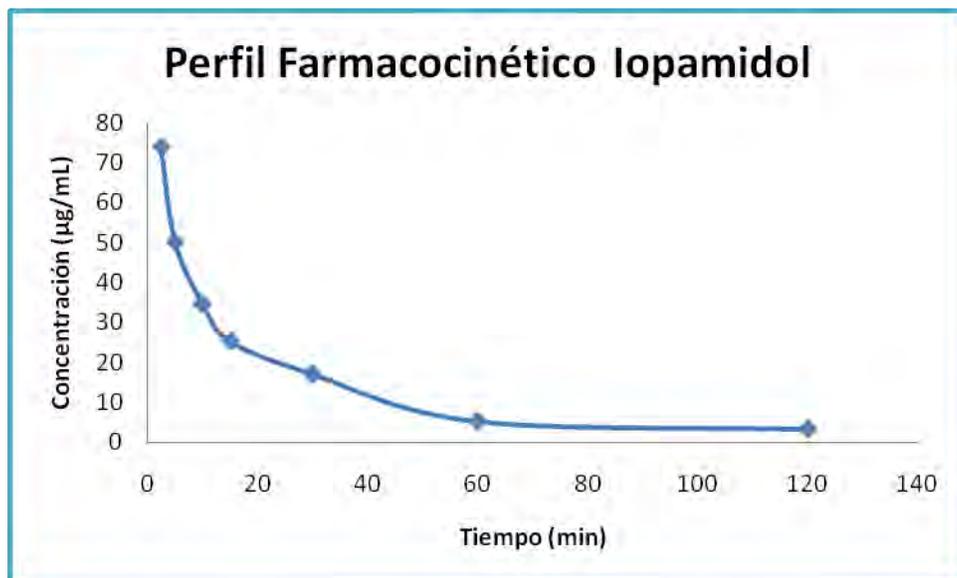
**l) Tolerancia.**

- a. **Cambiando longitud de onda:** Para demostrar qué tan tolerante es el método desarrollado se le realizó una prueba variando la longitud de onda a la que se leen las muestras (de 270nm a 245nm), sin embargo, la señal del lopamidol es muy alta a esta longitud de onda y se minimiza la señal del PABA (estándar interno), dificultando el registro y por consiguiente la medición de alturas de los compuestos de interés. Por lo tanto el método analítico no soporta cambios en la longitud de onda.
  
- b. **Aumento en la velocidad de flujo:** Con la finalidad de optimizar tiempos en la corrida analítica se decidió aumentar la velocidad de flujo a la que se trabaja (de 0.3 mL/min a 0.5mL/min), siendo tolerante en ese rango de flujo y obteniéndose una disminución en el tiempo de la corrida de 5 a 8 minutos por muestra con una buena separación y definición de los picos de las sustancias de interés.

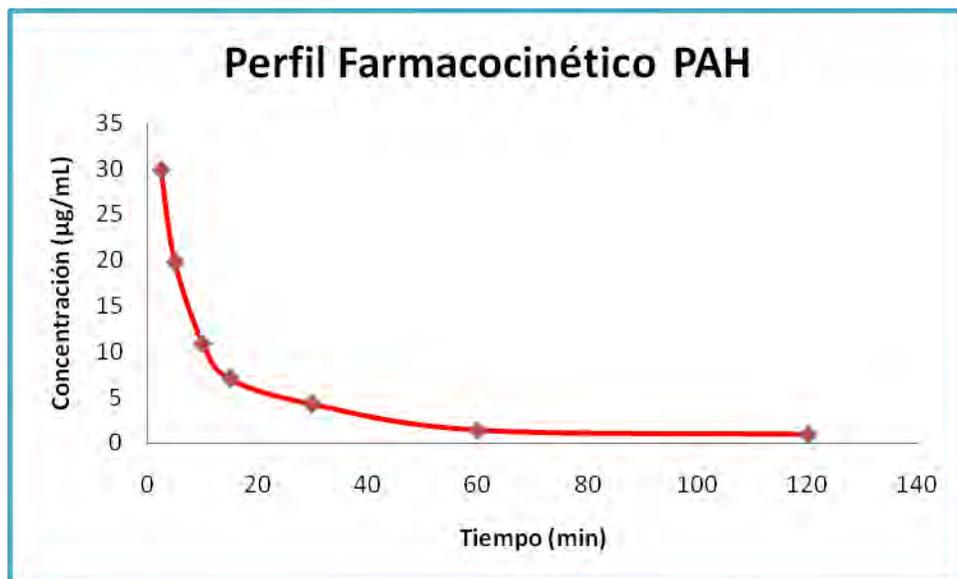
**m) Aplicación del método analítico.**

Para poder demostrar la aplicabilidad del método analítico desarrollado, se analizaron muestras plasmáticas de ratas por el método validado para lopamidol y PAH. Para llevar a cabo este análisis se emplearon ratas de la cepa Sprague Dawley a las cuales se les administró una dosis de 200mg/Kg de peso de lopamidol y 100mg/Kg de peso de PAH, ambas por vía intravenosa. Se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos, colocando las muestras obtenidas en tubos eppendorf conteniendo 10µL de heparina, posteriormente se centrifugaron las muestras a 9000rpm durante 5 minutos para obtener el plasma. Las muestras

fueron resguardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y procesadas para la determinación cuantitativa de las sustancias de interés de acuerdo al método analítico previamente validado. En las siguientes figuras 22 y 23 se pueden observar los perfiles farmacocinéticos.



**Figura. 23** Perfil plasmático de Iopamidol obtenido tras la administración intravenosa de 200mg/Kg de peso.



**Figura. 24** Perfil plasmático de Ácido *p*-Amino Hipúrico obtenido tras la administración intravenosa de 100mg/Kg de peso.

## VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El planteamiento del problema a resolver en este estudio, partió del hecho de establecer a través de una revisión bibliográfica exhaustiva, el poder descartar cualquier riesgo de interacción en la determinación simultánea de lopamidol y PAH, ya que si bien es muy limitado el número de referencias existentes sobre la cuantificación simultánea de lopamidol (como marcador de filtración glomerular) y PAH (marcador de secreción tubular) usando CLAR con detección ultravioleta, que pudieran ser el soporte teórico-práctico para la propuesta del método requerido, lo es más para la determinación del lopamidol como marcador de filtración glomerular y PAH como marcador de secreción tubular en micromuestras plasmáticas, que fue lo requerido en nuestro estudio experimental.<sup>15, 16, 22, 23</sup>

Una vez establecida la dosis del PAH a administrar para visualizar el efecto deseado: secreción tubular y no flujo plasmático, a través de estudios piloto realizados en el laboratorio (datos no presentados), una metodología analítica por CLAR fase reversa con detección UV fue propuesta y verificada su validez por medio de la validación.

En el cuadro 4 se presentan los tiempos de retención obtenidos para una muestra de plasma con la inclusión de lopamidol, otra muestra de plasma incluyendo el PAH y una más de plasma con el estándar interno (PABA), de acuerdo a éstos resultados se puede inferir que existe una buena resolución entre los tres compuestos de interés, las seis muestras de la matriz analizadas para la evaluación del parámetro de la selectividad, únicamente presentaron compuestos endógenos antes de los 4.58 minutos de la corrida; en tanto el tiempo de retención para el frente del solvente se presenta una respuesta (pico) a los 3.58 minutos, por lo que se considera selectivo el método para la cuantificación simultánea de lopamidol y PAH.

Con el fin de evaluar la linealidad del sistema se inyectó al cromatógrafo por triplicado cada nivel de concentración de la curva de calibración preparada de acuerdo al cuadro 2, observándose que la relación concentración-respuesta es lineal teniendo un comportamiento del tipo  $y=mx-b$  lo cual se puede observar en las graficas 5 y 6 para lopamidol y PAH respectivamente.

La linealidad del método se realizó empleando la matriz biológica, el promedio de las seis determinaciones, demostró una respuesta lineal a lo largo del rango de concentraciones para ambos compuestos de interés según se muestra en los gráficos 7 y 8. El promedio del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido para cada analito fue mayor a 0.98, cumpliendo con el criterio de aceptación de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, con un CV de variación menor al 15% en las relaciones de alturas a excepción del primer punto para el lopamidol que su coeficiente de variación fue del 19.6178 pero aún así es aceptable éste valor debido a que la NOM-177, para la concentración más baja acepta un coeficiente de variación menor al 20% para al primer punto, explicado por el hecho de que a menores

concentraciones la precisión y exactitud están más influenciadas por errores sistemáticos. Éste tipo de errores pueden ser atribuidos a la preparación de las soluciones empleadas y a la exactitud en la medición de la altura del pico cromatográfico.

El grado de concordancia de los resultados experimentales obtenidos bajo las mismas condiciones de análisis en tres concentraciones diferentes dentro del rango de concentraciones propuestas de PAH 3.75, 22 y 90  $\mu\text{g/mL}$  y de lopamidol 17, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  reflejan que el método es repetible, al obtenerse coeficientes de variación menores al 15% como se puede observar en los cuadros 9 y 10 para cada compuesto.

Así mismo la precisión evaluada en términos de reproducibilidad en el laboratorio expresa que la variación obtenida en tres diferentes días no altera la determinación de lopamidol y PAH, al demostrar que en los tres niveles de concentración estudiados se obtuvieron coeficientes de variación por debajo del valor que estipula la norma ( $\text{CV} < 15\%$ ). Lo que representa que el método analítico es reproducible bajo las mismas condiciones de análisis en días diferentes. (Cuadros 11 y 12)

Para ambas sustancias de interés el método cumple en términos de exactitud ya que para cada nivel de concentración de los datos (cuadros 13 y 14) están dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración, indicando que los resultados obtenidos están próximos al valor teórico para el nivel de concentración, por lo que el método para cuantificar lopamidol y PAH es exacto y preciso bajo las condiciones de análisis establecidas.

Para determinar la integridad de los analitos en la matriz biológica desde que se toma la muestra hasta su análisis, se prosiguió a evaluar la estabilidad de la misma a diferentes periodos de tiempo y condiciones de almacenamiento. Las muestras adicionadas con tres concentraciones conocidas de lopamidol y PAH consignadas como estabilidad muestra no procesada se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por un lapso de tiempo de 7, 15, 30, 60 y 90 días. En los gráficos 9, 10 y 11 el lopamidol se observa que es estable por un periodo de almacenamiento de hasta 90 días cumpliendo con la normativa de que cada nivel de concentración debe estar en el  $\pm 15\%$  del valor nominal y obteniéndose también un CV menor al 15% para cada nivel de concentración, en las graficas 12, 13 y 14 para el PAH se puede ver que es estable por el mismo periodo de almacenamiento, sin embargo, también se puede observar que el porcentaje con respecto al valor nominal se ve afectado en las concentraciones de 3.75 y 22  $\mu\text{g/mL}$  lo que nos indica que a más tiempo de almacenamiento la exactitud en la determinación es disminuida, como se puede observar en las graficas 12 y 13 ya que la concentración experimental obtenida a los 90 días está muy cerca del límite inferior de la concentración nominal, aunque cumple con un CV menor al 15% en cada determinación, no obstante para la concentración de 90  $\mu\text{g/mL}$  se observa que es estable (figura 14).

La estabilidad para muestra procesada (sometida a proceso de extracción lista para ser introducida al cromatógrafo) se decidió almacenar éstas a una temperatura de  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior lectura a las 24, 48, 72 y 96 horas. En los gráficos para lopamidol se puede

observar que las muestras una vez procesadas son estables durante un periodo de 72 horas siempre y cuando se estén almacenadas a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  (figuras 15, 16 y 17), en el caso del PAH las concentraciones de 22 y 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  son estables (figuras 19 y 20), pero a concentraciones bajas como la de 3.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figura 18) se ve afectada la exactitud a periodos prolongados, por lo tanto, como es una determinación simultánea se sugiere que las muestras procesadas se analicen a más tardar en un periodo de 72 horas.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998 las concentraciones de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para lopamidol y PAH respectivamente tienen validez para ser establecidos como límite de cuantificación ya que los promedios de las determinaciones están dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal y con un CV menor al 20%.

La eficiencia del método analítico para cuantificar todo el lopamidol y PAH presente en las muestras biológicas fue evaluada como recuperación absoluta, calculada como el porcentaje de la respuesta analítica en la matriz biológica comparada con los analitos contenidos en solución. En la cual se puede observar que hay un recobro mayor de 94% para lopamidol y una recuperación mayor de 86.97% para PAH.

Otro parámetro determinado en la validación fue qué tan tolerante era el método analítico a las modificaciones de longitud de onda y de velocidad de flujo, sin embargo, al evaluar el cambio en la longitud de onda no se logró concluir el análisis de éste parámetro ya que la señal del lopamidol a la longitud de onda de  $254\text{nm}^{21}$  se intensifica y la señal del PAH y del PABA (estándar interno) se ve disminuida dificultando el registro de las muestras y por consiguiente su medición, por lo que no se recomienda trabajar a ésta longitud de onda y conservar la establecida. Con el fin de disminuir el tiempo en la corrida analítica se decidió aumentar el flujo de trabajo de  $0.3\text{mL}/\text{min}$  a  $0.5\text{mL}/\text{min}$  en el cual el tiempo total de corrida se disminuye de 15 a 7 minutos por muestra y se hizo una prueba trabajando a un flujo de  $0.4\text{mL}/\text{min}$  y el tiempo total de corrida fue de 10 minutos. En cada una de las pruebas se logra una buena resolución de los compuestos de interés y no se observa que haya interferencia en sus tiempos de retención por lo que se dice que el método tolera cambios en la velocidad del flujo en un rango de  $0.3$  a  $0.5\text{ mL}/\text{min}$ .

La aplicabilidad del método se demostró al poder cuantificar lopamidol y PAH en muestras plasmáticas obtenidas de un estudio piloto en ratas Sprague Dawley caracterizando de éste modo el perfil farmacocinético de una administración intravenosa para ambos analitos (figuras 23 y 24).

Con la validación del método desarrollado se logrará reducir el tiempo invertido para la evaluación del funcionamiento renal en un modelo experimental de lesión medular, así como el número de animales involucrados en la experimentación y los reactivos necesarios para el análisis de modo que siempre se va a preferir un método que ayude a reducir gastos y optimizar tiempos. La ventaja que representa el presente proyecto es que se pueden cuantificar los dos compuestos de interés en una misma muestra, además de que se pueden cuantificar cantidades más pequeñas que las reportadas en otros artículos<sup>22, 23,</sup>

<sup>24, 25, 26, 27, 28, 29</sup> además de que se propone el uso de un compuesto iodado (Iopamidol) disponible comercialmente en el país y de costo menor a la inulina (marcador de filtración glomerular marcado para uso en clínica). Asimismo en el método propuesto y validado no es necesario el empleo de soluciones amortiguadoras con sales de fosfato ya que el empleo de éstos compuestos requiere de mayores precauciones de uso en el equipo, que de no contemplarse pueden llegar a causar problemas con la columna analítica. El procesamiento de las muestras es simple, sencillo y no es tedioso para la manipulación por parte del analista, no es necesario evaporar solventes y volver a reconstituir, sólo se emplea una técnica de extracción líquido-líquido un paso para centrifugar la muestra y se inyecta el sobrenadante que se obtiene. El método se puede optimizar aumentando el flujo de trabajo lo que permite optimar tiempos como ya se ha mencionado antes, esta es otra ventaja que representa el método con respecto a otros métodos ya que su corrida es de 15 minutos y de algunos métodos puede llegar hasta los 20 minutos por muestra<sup>21</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES

El problema planteado fue resuelto de forma satisfactoria ya que se logró implementar y validar un método analítico sencillo y rápido por CLAR fase reversa para la cuantificación de Iopamidol y PAH para ser empleado en estudios farmacocinéticos en modelo experimental como marcadores de función renal en micromuestras de plasma de rata.

## IX. REFERENCIAS

1. Skoog Douglas A., Holler James F., Nieman Timothy A. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España: Mc Graw Hill; 2001.
2. Yost R., Ettre L. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Estados Unidos:--; 1981.
3. Anthony C., Moffat M. Clarke's Analysis of Drug and Poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3ª ed. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2004.
4. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Edición 2002.
5. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Department of Health and Human Services: May 2001.
6. Shah Vinod P., Midha Kamal K., Findlay John W., Hill Howard M., Hulse James D., y col., Bioanalytical Method Validation, Workshop/Conference Report. Pharmaceutical Research Vol. 17, No. 12, 2000.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas: Diario Oficial de la Federación, 18 de Noviembre de 1998.
8. Peters Frank T., Drummer Olaf H., Musshoff Frank., Validation of new methods. Forensic Science International 165 (2007).
9. Food and Drug Administration: International Conference on Harmonization: Guideline for Industry. Text on validation of analytical Procedures. ICH-Q2A: March 1995.
10. Food and Drug Administration: International Conference on Harmonization: Guideline for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH-Q2B: November 1996.
11. Shargel Leon, Wu-Pong Susanna, B. C. Yu Andrew, Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 5ª ed., Mc. Graw Hill 2004.
12. Gibaldi Milo. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. 4ª ed., London: Lea and Febiger; 1991.
13. Guyton Arthur C., Hall John E., Tratado de Fisiología Médica. 11ª ed., México: Interamericana Mc. Graw Hill.
14. Russell Greene J., Norman Harris D., Pathology and Therapeutics for pharmacists. A basis for Clinical Pharmacy Practice. 3ª ed., Great Britain: Pharmaceutical Press; 2008.
15. Dowling Thomas C., Frye Reginald F., Zemaitis Michael A. Simultaneous determination of *p*-aminohippuric acid, acetyl-*p*-aminohippuric acid and iothalamatein human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 716 (1998).
16. Gunnar Sterner F. Contrast media as markers of GFR. Eur. Radiol, 12 (2002).

17. Merck and Col. The Merck Index an enciclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12<sup>a</sup> ed., USA: Published by Merck Research Laboratories; 1996.
18. Martindale. The Complete Drug Reference. 3<sup>a</sup> ed., London: Pharmaceuticals Press; 2007.
19. Uriarte Bonilla V., Trejo Flores S. Farmacología Clínica. México: Trillas; 2003.
20. Bonaplast, S. A. de C. V., Monografía Solucont<sup>®</sup> Medio de contraste No iónico.
21. Laroute Valérie., Lefebvre Hervé P., Costes Gisèle., Toutain Pierre-Louis. Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and *p*-aminohippuric acid. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 41 (1999).
22. Chang-Ching L., Chlen-Wen K., Li-Heng P. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of *p*-aminohippuric acid and inulin in rat plasma for renal function study. Anal Bioanal Chem, 398 (2010).
23. Marsillo R., Dall'Amico R., Montini G., et al. Rapid determination of *p*-aminohippuric acid in serum and urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 704 (1997).
24. Dall'Amico R., Montini G., et al. Determination of inulin in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 672 (1995).
25. Agarwall R., Vasavada N., Chase S., Liquid Chromatography for iothalamate in biological samples. Journal of Chromatography B, 785 (2003).
26. Lorusso V., Poggesi I., Dal Fime D., Tirone Piero. High-Performance liquid Chromatographic assay of lomeprol in plasma and urine. Journal of Chromatography B., 525 (1990).
27. Pastore A., Bernardini S., Dellos Strologo L., et al. Simultaneous determination of inulin and *p*-aminohippuric acid in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B., 751 (2001).
28. Arbughi T., Bertuni F., Celeste F., Tirone P. High-performance liquid chromatographic assay of the X-Ray contrast agent lopiperidol in plasma and urine of rats and humans. Journal Chromatographyc B., 729 (1999).
29. Prueksaritanont T., Chen M., Chiou W. Simple and micro High-Performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of *p*-aminohippuric acid and iothamalate in biological fluids. Journal Chromatography, 306 (1984).
30. Baccard Nathalie, Hoizey Guillaume, Frances Carole, Lamiable Denis, et al. Simultaneous determination of inulin and *p*-aminohippuric acid (PAH) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. The Analyst, 124(1999).
31. Agarwall R., Vasavada N., Chase S., Evaluation of Kidney Function in Patients with Acute Renal Failure Using High-Performance Liquid Chromatography: A case report. Pharmacotherapy, 24 (2004).
32. Thompson M., Ellison S., Wood R., International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized Guidelines for single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure and Applied Chemistry, 74 (2002).

33. International Union of Pure and Applied Chemistry. Thompson M., et al. Harmonized Guidelines for single-laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure Applied Chemistry, 74 (2002).