



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO,
SOLUCIÓN INYECTABLE, EN PLASMA O SUERO
POR CLAR DE ACUERDO CON LA GUÍA ICH Q14.**

**PRESENTA
MIRIAM TOLENTINO OJEDA**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

**DIRECTOR
Dr. Vicente Jesús Hernández Abad.**

**ASESORES
Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González.
QFB. Humberto Daniel Rodríguez Gaspar.**



Ciudad de México, Noviembre 2023



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.

Trabajo de tesis financiado en su totalidad con recursos del proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, con clave IT200320 Efectividad antihiper glucemiante de las matrices monolíticas de silicio que contienen glibenclamida preparadas por el método sol-gel, por lo que se agradece su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Propiedades físicas y químicas del metotrexato	6
2.2 Indicaciones terapéuticas.....	8
2.3 Mecanismo de acción	8
2.4 Farmacocinética.....	9
2.4.1 Absorción.....	9
2.4.2 Distribución	10
2.4.3 Metabolismo	10
2.4.4 Excreción	10
2.5 Componentes de la sangre	10
2.6. Componentes del plasma	10
2.7 Desproteinización de plasma	11
2.8 Cromatografía de líquidos.....	12
2.9 Tipos de cromatografía	12
2.9.1 Cromatografía en fase reversa	12
2.9.2 Cromatografía en fase normal	12
2.9.3 Cromatografía Líquido-Sólido (LSC) o de adsorción	13
2.9.4 Cromatografía de intercambio iónico (IEC).....	13
2.9.5 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	14
2.10 Interpretación del cromatograma	15
2.10.1 Línea base.....	16
2.10.2 Tiempo muerto (t_m)	16
2.10.3 Tiempo de retención (t_R)	16
2.10.4 Factor de capacidad (K')	16
2.10.5 Resolución.....	16
2.10.6 Número de platos teóricos (NTP)	17
2.10.7 Asimetría.....	17
2.11 Componentes del HPLC	17
2.12 Desarrollo de métodos analíticos.....	19

2.12.1 Enfoque mínimo.....	19
2.12.2 Enfoque mejorado	20
2.12.3 Ciclo de vida del método analítico	20
2.12.4 Perfil Analítico Objetivo (PAO).....	21
2.12.5 Gestión del conocimiento.....	21
2.12.6 Gestión de riesgos	21
2.12.7 Establecimiento de parámetros de métodos analíticos.....	21
2.12.7.1 Robustez.....	21
2.12.7.2 Rangos de parámetros de métodos analíticos.....	21
2.12.8 Estrategia de control de un método analítico.....	22
2.12.9 Desarrollo de métodos analíticos multivariantes.....	22
2.12.10 Presentación de información relacionada con el método analítico	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7. MÉTODO.....	24
7.1 Muestra	24
7.2 Técnica, materiales e instrumentos	24
7.3 Variables.....	25
7.4 Hipótesis	26
7.5 Diseño de estudio	26
7.6 Procedimiento	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1 Determinación de la longitud de onda.....	27
8.2 Determinación de la fase móvil	27
8.3 Determinación del estándar interno	31
8.4 Solución de extracción de proteínas	33
8.5 Solución stock de metotrexato en plasma.....	34
8.6 Purificación de plasma con metotrexato	34
8.7 Adecuabilidad del del sistema.....	35
8.8 %CV de Horwitz.....	36
8.9 Purificación de plasma con metotrexato y metronidazol.....	37
8.10 Curva de calibración del método analítico	38

8.11 Limite de detección	45
8.12 Limite de cuantificación.....	45
8.13 Condiciones de lavado de la columna del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	46
8.14 Perfil Analítico Objetivo	46
8.15 Gestión de riesgos	47
8.16 Diseño se experimentos.....	49
8.17 Análisis de muestras reales	57
8.18 Conclusiones	60
9. REFERENCIAS	61

1. INTRODUCCIÓN

En el año de 1948, el metotrexato (MTX) se empleó por primera vez en un grupo de niños con leucemia, demostrando su eficacia en esta enfermedad, después, en 1988 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó su uso en la artritis reumatoide (AR) en adultos por lo que ha sido usado durante más de 25 años en el tratamiento de esta enfermedad, es considerado hoy en día el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FAME) de primera elección en el tratamiento de la AR, y de gran utilidad en el control de otras enfermedades reumáticas ¹.

En los últimos cinco años, la COFEPRIS ha emitido seis registros sanitarios para fabricar metotrexato a farmacéuticas nacionales. En total, cinco farmacéuticas tienen permisos de importación de MTX vigentes hasta el año.²

Debido a esto, surge la necesidad de contar con procedimientos que permitan determinar la presencia de MTX en cada presentación farmacéutica, para así evaluar la calidad de dichos productos farmacéuticos. Por lo que este proyecto de investigación plantea el desarrollo de un método analítico para la cuantificación de metotrexato, solución inyectable, en plasma, por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de acuerdo con la guía ICH Q14 Desarrollo de procedimientos analíticos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Propiedades físicas y químicas del metotrexato

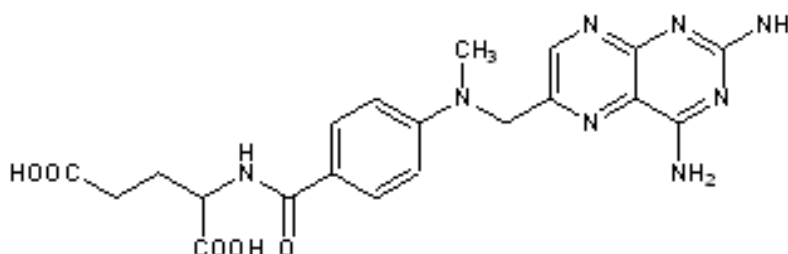
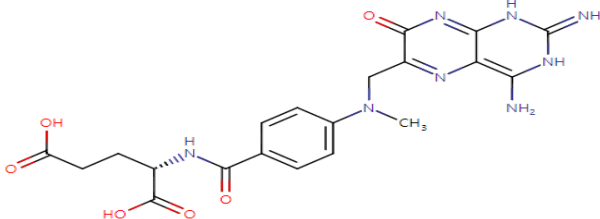
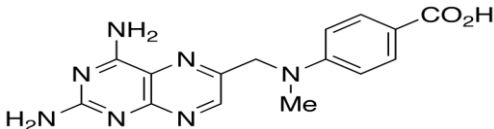


Figura 1. Fórmula estructural del metotrexato.³

TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL METOTREXATO^{3, 4, 5, 6}

Nombre CAS	<i>N</i> - [4-[[[(2,4-Diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]- L -ácido glutámico.
Nombres adicionales	Ácido 4-amino- <i>N</i> 10 -metilpteroilglutámico; ácido 4-amino-10-metilfólico; metilaminopterina; ametopterina; MTX.
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅
Peso molecular	454.44
Composición porcentual	C: 52,86 %, H: 4,88 %, N: 24,66 %, O:17,60 %
Tipo de derivado	Monohidratado.
Apariencia	Cristales amarillos o anaranjados de HCl diluido, higroscópico. Proteger de la luz.
pka	4.7
Log p	-1.85
Punto de fusión	190°C
Punto de fusión (descomposición)	365°C – 369°C
Solubilidad	Insoluble en agua , alcohol, cloroformo , éter. Ligeramente soluble en ácido clorhídrico diluido ; soluble en soluciones diluidas de hidróxidos y carbonatos alcalinos.
Absorción máxima	UV máx HCl 0.1 N: 244, 307 nm. UV máx NaOH 0.1 N: 357, 302, 370 nm.
Productos de degradación	 <p><i>Figura 2. 7-hidroxi metotrexato, producto de degradación del metotrexato^{4, 5}.</i></p>  <p><i>Figura 3. Ácido 2,4-diamino-N-metilpteroico (DAMPA)</i></p>

2.2 Indicaciones terapéuticas

El metotrexato (MTX) es un antimetabolito de folato. Se usa para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y en el tratamiento para diversas neoplasias malignas como son leucemia meníngea, el linfoma no Hodgkin, el osteosarcoma, el cáncer de mama y el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, y neoplasia trofoblástica gestacional. También es útil en el tratamiento de artritis reumatoide. ^{7,8,9}

2.3 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción por el cual el MTX actúa como fármaco antitumoral es mediante el dihidrofolato reductasa que es la enzima que convierte el ácido dihidrofolico en tetrahidrofolico. Además, el MTX intracelular, en forma de poliglutamatos, impide la síntesis de purinas al bloquear la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC), la enzima terminal de esa ruta metabólica. Igualmente modifica la síntesis de pirimidinas al obstruir el timidilato sintetasa. ^{7, 8, 9, 10,11}

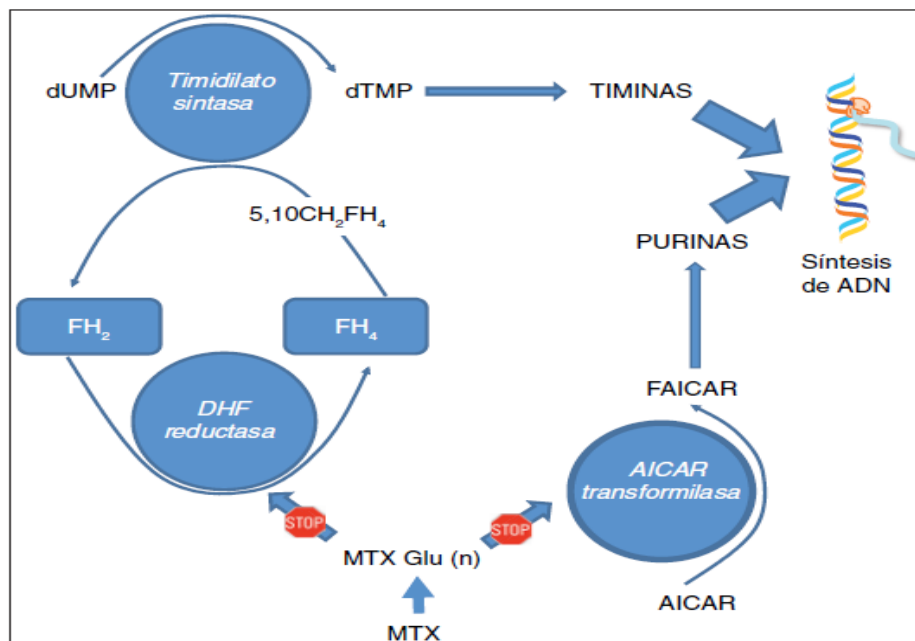


Figura 4. Mecanismo antitumoral del metotrexato.¹

El mecanismo de acción del MTX puede variar según la dosis. A dosis bajas, que son las utilizadas en los reumatismos inflamatorios, tiene una acción dual, inmunosupresora y antiinflamatoria, ya que bloquea la proliferación y aumenta la apoptosis de los linfocitos T activados, también puede elevar los niveles intracelulares de adenosina y bloquear la conversión de homocisteína a metionina, con lo que se promueve la reducción de síntesis de poliamidas que son las responsables de intervenir en el origen de muchos reumatismos inflamatorios. ^{7, 8, 9, 10,11}

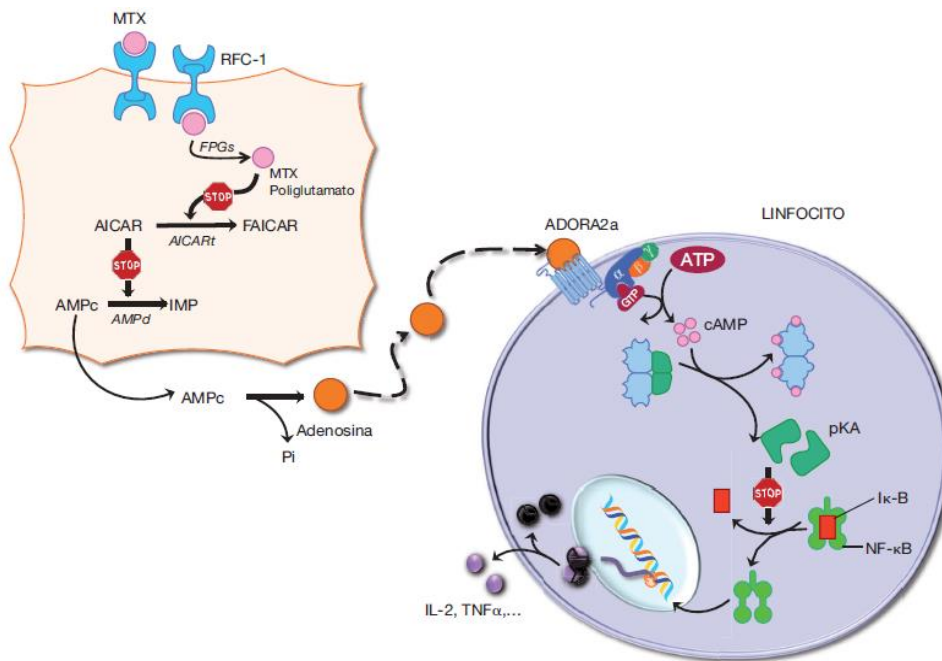


Figura 5. Mecanismo de acción antiinflamatoria del metotrexato.¹

2.4 Farmacocinética

La administración oral e intravenosa de metotrexato proporciona una buena distribución tisular, excepto en el Sistema Nervioso Central. El metotrexato no se metaboliza y su depuración depende de la función renal. Se necesita una hidratación adecuada para prevenir la cristalización en los túbulos renales.^{1,10,11,12,14}

2.4.1 Absorción

Tras la administración oral, MTX se absorbe en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente en el yeyuno proximal. El sistema de absorción se lleva a cabo por medio de un transporte activo, por lo que necesita gastar proteínas transportadoras y es, por lo tanto, un sistema saturable, lo que indica que el aumento de la dosis es capaz de reducir la cantidad de que se pueda absorber. Ello afecta a la biodisponibilidad por vía oral (esto es, la cantidad de fármaco que llega inalterado a la circulación sistémica tras emplear esta vía de administración), que es muy variable, con cifras que van desde el 30 al 90% dependiendo de la dosis administrada.^{12,14}

- Administración oral

Se ha demostrado que la absorción gastrointestinal del MTX depende de la dosis. Las dosis inferiores a 30 mg/m² de superficie corporal se absorben bien, con niveles séricos máximos que aparecen en un plazo de 1 a 2 h, por lo contrario, se observó una absorción lenta en dosis pequeñas.

- Administración intramuscular

La absorción tras la inyección intramuscular es rápida y completa, La absorción gradual del fármaco desde el sitio intramuscular compensa la rápida caída de los niveles séricos observada durante la fase de distribución inicial. ^{1,10,11,12,13}

2.4.2 Distribución

Aproximadamente, el 50% de MTX está unido a proteínas plasmáticas. La unión a proteínas plasmáticas va a establecer su distribución por el organismo del paciente. El volumen de distribución del MTX (que relaciona la dosis administrada con la concentración plasmática del fármaco y, con ello, da una idea de la distribución del fármaco en el organismo del paciente) varía entre 0.7 y 1.4 L/kg. ^{1,10,11,12,13,15}

2.4.3 Metabolismo

El MTX se metaboliza en el hígado en un 10%, dando como principal metabolito el 7-hidroximetotrexato, una molécula activa que contribuye a prolongar el efecto terapéutico del MTX. Además de este metabolito principal, hasta un 5% de la dosis administrada de MTX se metaboliza en el intestino en Ácido 2,4-diamino-N-metilpteroico por acción de la flora intestinal. ^{1,10,11,12,13}

2.4.4 Excreción

La eliminación del MTX, se lleva a cabo por vía renal mediante filtración glomerular y secreción activa en el túbulo proximal. Aproximadamente el 5-20% de MTX y el 1-5% de 7-hidroximetotrexato se eliminan por vía biliar. Existe un importante flujo sanguíneo enterohepático. En caso de insuficiencia renal, la eliminación se retrasa de forma significativa. ^{1,10,11,12,13,15}

2.5 Componentes de la sangre

La dosis promedio de administración de MTX es de 25 mg alcanzando niveles séricos de 0.1 mg/mL La sangre está compuesta por dos fracciones bien diferenciadas que son las células y el plasma sanguíneos. Las células conforman del 40 al 50 % del volumen total de la sangre; el resto corresponde al plasma, en el que está presente una gran variedad de compuestos químicos. Las células sanguíneas pueden ser clasificadas de la siguiente manera: eritrocitos o glóbulos rojos, que son los especializados en la transportación de oxígeno y dióxido de carbono; leucocitos o glóbulos blancos, son los encargados sistema inmune ya que llevan a cabo la defensa contra infecciones; y las plaquetas, que son las responsables del proceso de coagulación de la sangre. ^{16,17}

2.6. Componentes del plasma

El plasma sanguíneo está compuesto por un 90 % de agua y un 10 % de solutos, de los cuales el 10 % son sales iónicas, 20 % moléculas orgánicas pequeñas, y el 70 % proteínas. Se pueden encontrar diversas sales inorgánicas como son el cloruro de

sodio, bicarbonato, fosfato, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y sulfato de sodio. También, se encuentran diversas moléculas orgánicas y algunos remanentes, como pueden ser, la glucosa, los aminoácidos, el lactato, el piruvato, algunos cuerpos cetónicos, el citrato, la urea y el ácido úrico. Dentro de las proteínas que pueden estar presentes en el plasma son: las inmunoglobulinas, la albúmina sérica, las apolipoproteínas involucradas en el transporte de lípidos, la transferrina para el transporte de hierro, y aquellas que se encargan de la coagulación como el fibrinógeno y la protrombina. ^{17,18,19}

2.7 Desproteinización de plasma

Al utilizar métodos espectrofotométricos, una de las principales dificultades que se presentan en el análisis de los fármacos que se encuentran presentes en muestras plasmáticas es la interferencia espectral de las señales del fármaco y las proteínas presentes. La presencia de proteínas en el plasma puede intervenir en las determinaciones realizadas por métodos espectroscópicos y cromatográficos como el HPLC. Las proteínas tienen un $UV_{máx}$ a una de onda 235 nm ya que tienen enlaces peptídicos que les permite absorber en esta región. A una longitud de onda de 280 nm se puede observar la presencia de los residuos aromáticos de la tirosina y el triptófano, por tanto, estas propiedades espectrales pueden ser un impedimento en el estudio analítico de fármacos en muestras de plasma y suero. Por ello, es necesario precipitar las muestras para poder llevar a cabo los estudios analíticos de cualquier fármaco donde se utilice la espectrofotometría UV.

Para poder precipitar las proteínas de las muestras biológicas se utilizan disolventes orgánicos miscibles en agua, ácidos orgánicos y sales iónicas. Algunos disolventes orgánicos que se utilizan pueden ser el metanol, la acetona, el acetonitrilo y el etanol, estos son los que comúnmente se utilizan debido a son compatibles con las fases móviles que se utilizan en la cromatografía de Líquidos de Alta resolución. Estos disolventes ayudan a reducir la solubilidad de las proteínas. Por otra parte, también se pueden utilizar ácidos ya que las proteínas que están presentes en forma catiónica a pH bajos son capaces de formar sales insolubles con los ácidos. Para la desproteinización en medio ácido, soluciones de 5-20 % de los mismos generalmente son suficientes y los mejores resultados pueden obtenerse utilizando los reactivos fríos. Suelen ser muy eficientes el ácido tricloroacético (TCA) y ácido perclórico.

También se puede llevar a cabo la precipitación de proteínas por medio de sales pues la mayoría de estas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal. La concentración de sal a la cual una proteína precipita es diferente de una proteína a la otra. Por ejemplo, el sulfato de amonio 0,8 mol/L precipita el fibrinógeno, mientras que para precipitar la albúmina sérica se requiere una concentración de 2,4 mol/L. ^{20,21,22,23}

2.8 Cromatografía de líquidos

De acuerdo con la IUPAC, la cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es la estacionaria, mientras la otra se mueve.

La técnica cromatográfica más utilizada es la cromatografía líquida de alto rendimiento ya que es la más eficiente para separar diversos analitos que se encuentren en una mezcla. Esta técnica cuenta de una fase móvil la cual debe de ser líquida y tener la capacidad de trasladar la muestra a través de la fase estacionaria, la cual puede ser sólida. La retención y separación de cada uno de los componentes que estén presentes en una muestra depende de las interacciones químicas y físicas de la mezcla a analizar. Aquellos componentes que tengan una mayor afinidad con la fase estacionaria se trasladaran a una menor velocidad que aquellos que presenten una menor afinidad. Esta desigualdad de velocidades son las responsables de la separación de los componentes de la mezcla.

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier alteración o modificación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido. ^{24,25,26}

2.9 Tipos de cromatografía

2.9.1 Cromatografía en fase reversa

Es el tipo de cromatografía más utilizada para el análisis de las muestras, especialmente, aquellas que contienen sustancias neutras o no ionizadas, solubles, en mezclas de compuestos orgánicos y agua. La fase estacionaria debe ser hidrofóbica mientras que la fase móvil debe ser un líquido polar. Se utilizan mezclas de agua-metanol o agua-acetonitrilo. ^{24,25,26}

2.9.2 Cromatografía en fase normal

Este método divide los analitos con base en su polaridad. La fase estacionaria debe ser polar, por lo que la fase móvil debe ser no polar. Se utiliza comúnmente para el análisis de muestras lipofílicas que no se pueden disolver bien en mezclas de agua y compuestos orgánicos o en mezclas de isómeros. Las sustancias más utilizadas para la fase móvil en este método son: cloruro de metileno, hexano, éter dietílico, cloroformo y las mezclas de estos. ^{124,25,26,27}

2.9.3 Cromatografía Líquido-Sólido (LSC) o de adsorción

Es la más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares, y que por tanto tienen una solubilidad limitada en los disolventes acuosos que son los que se utilizan en los procedimientos de reparto en fase inversa. Se fundamenta en la competencia por los analitos neutros entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los compuestos de la muestra interactúan con la fase móvil a través de enlaces dipolo-dipolo reversibles. Los tiempos de retención de las moléculas dependen de la fase estacionaria. Este método utiliza una fase estacionaria polar, comúnmente gel de sílice, y una fase móvil no polar, como hexano y el agregado de algún aditivo que provea selectividad.^{24,28,29}

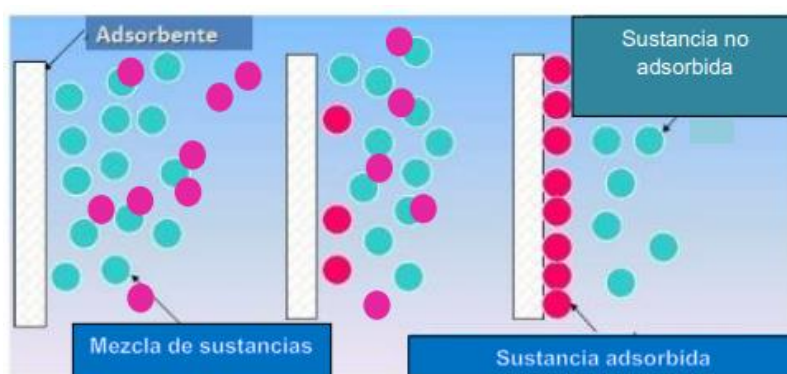


Figura 6. Principio de la cromatografía de adsorción (LSC).²⁸

2.9.4 Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

La cromatografía iónica se desarrolló cuando se demostró que mediante las columnas de HPLC que contenían resinas de intercambio catiónico o aniónico, se podían analizar con sencillez mezclas de cationes o aniones. La fase estacionaria debe tener carga opuesta a la de los iones que existan en la muestra. El tiempo de retención de las moléculas es directamente proporcional con la carga de la muestra, lo que significa que entre más fuerte sea la carga, la molécula tardará más tiempo en eluir. Este método utiliza soluciones buffer como fase móvil, y con ayuda del pH y la fuerza iónica estos controlan el tiempo de elución.^{24,28,29,30}

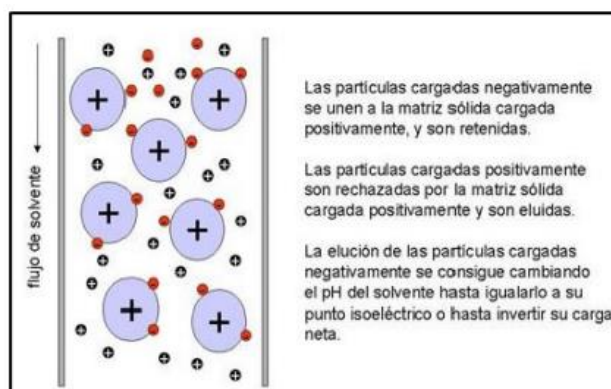


Figura 7. Principio de la cromatografía de intercambio iónico (IEC).²⁹

Este tipo de cromatografía se basa en añadir a la fase móvil reactivos de par iónico para promover la formación de pares iónicos con los analitos de la muestra para así mejorar la retención de los analitos y su separación. El par iónico mejorará la afinidad por la fase reversa estacionaria y permitirá aumentar la resolución de la muestra. Los reactivos de par iónico no deben presentar absorción ultravioleta para tener una alta sensibilidad a la muestra. ^{24,28,29,30}



Figura 8. Interacción entre el reactivo de par iónico y la cadena carbonatada C-18.³⁰

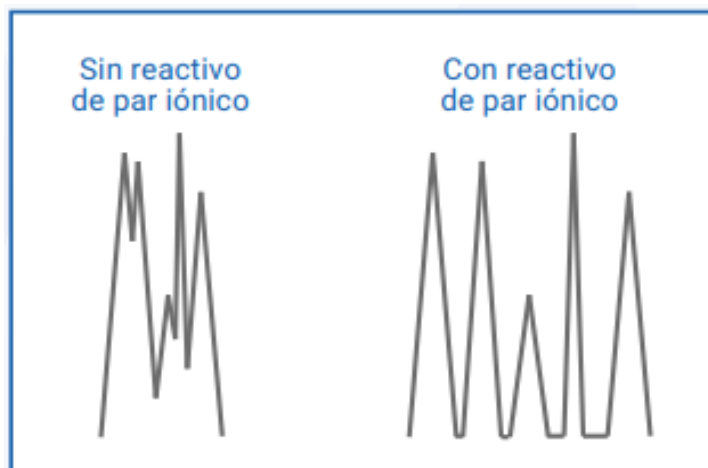


Figura 9. Cromatograma usando reactivo de par iónico (derecha) y sin utilizar el reactivo (izquierda).³⁰

2.9.5 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se utiliza para la separación de analitos con una diferencia en su tamaño molecular mayor al 10 % para moléculas pequeñas y al 20 % para macromoléculas y también para calcular los pesos de los compuestos de una muestra. La columna funciona como un tamiz molecular, en la que las moléculas más grandes son las primeras en salir. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas (de unas 10 μm) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que las moléculas son detenidas y eliminadas del flujo de la fase móvil. ^{17,18,19,20,21}

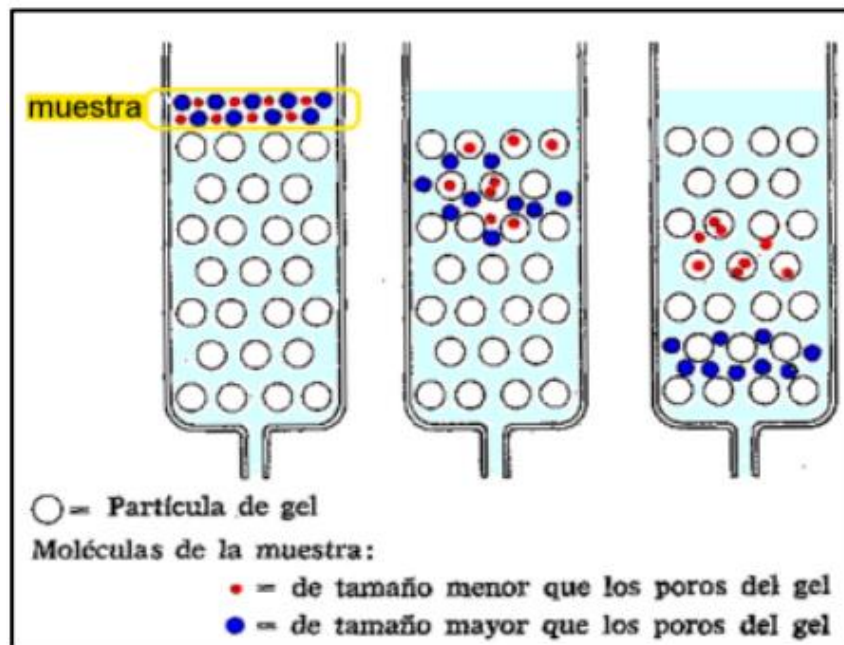


Figura 10. Principio de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).²⁹

2.10 Interpretación del cromatograma

De acuerdo con la IUPAC, un cromatograma es un gráfico que representa la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo. El eje horizontal del cromatograma corresponde al tiempo durante el cual se efectúa la medición. El eje vertical, corresponden a la señal analítica proveniente del detector y su significado dependerá del tipo de medición efectuada (área bajo la curva o altura del pico).²⁴

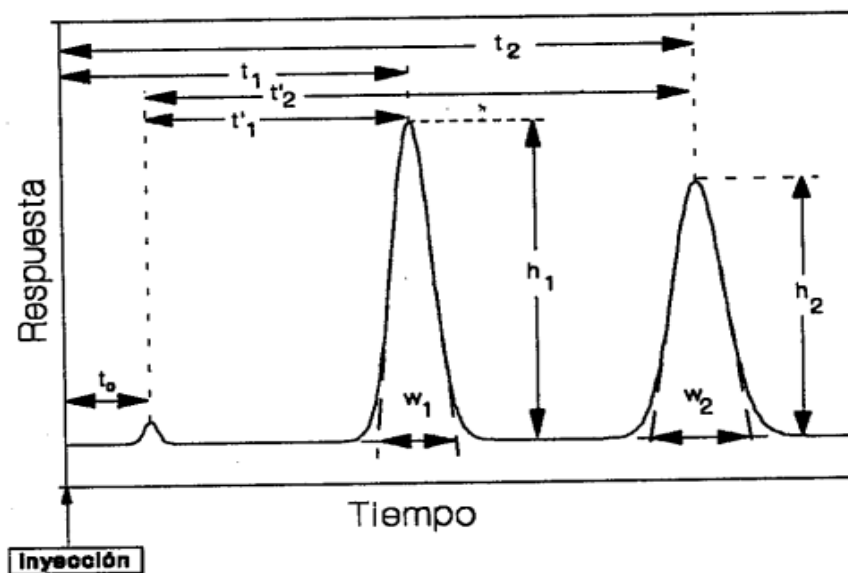


Figura 11. Cromatograma tipo con algunos parámetros de medición frecuente.¹⁸

El cromatograma empieza en el momento en que la solución de ensayo es inyectada, a partir de ese punto, los parámetros de descripción son:

2.10.1 Línea base

Es la proporción del cromatograma donde solo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto. ^{24,25}

2.10.2 Tiempo muerto (t_M)

Es el tiempo en el que un constituyente no retenido sale de la columna. ^{24,25}

$$t_M = \frac{(\pi)(r^2)(L)(0.6)}{\text{Velocidad de flujo}}$$

Donde:

t_M = tiempo muerto.

π = Pi (3.1416).

r^2 = radio de la columna en centímetros elevado al cuadrado.

L = Longitud de la columna en centímetros

0.6 = factor constante.

2.10.3 Tiempo de retención (t_R)

Es el tiempo (en minutos) medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico. ^{24,25}

2.10.4 Factor de capacidad (K')

Es el grado de retención de un determinado compuesto dentro de la columna. Cociente del tiempo que el compuesto persiste en la fase estacionaria con respecto al tiempo que permanece en la fase móvil. ^{24,25}

$$K' = \frac{t_R}{t_M}$$

Donde:

K' = factor de capacidad.

t_R = tiempo de retención.

T_M = tiempo muerto.

2.10.5 Resolución

Se refiere al grado de separación de dos analitos adyacentes. Se define como la diferencia en los tiempos de retención de los dos picos dividido por el promedio de las anchuras de los picos. ^{24,25}

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

Donde:

R = resolución.

t₂= tiempo de retención del segundo pico que aparece en el cromatograma.

t₁= tiempo de retención del primer pico que aparece en el cromatograma.

w₂= ancho del segundo pico que aparece en el cromatograma medido en su base.

w₁=ancho del primer pico que aparece en el cromatograma medido en su base.

2.10.6 Número de platos teóricos (NTP)

Nos ayuda a medir la eficiencia de una columna cromatográfica y su poder separativo.

El número de platos teóricos puede calcularse en función del ancho del pico. ^{24,25}

$$N = 16\left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

Donde:

t_r = tiempo de retención de la muestra.

w = ancho del pico medido desde la línea base.

2.10.7 Asimetría

Es una forma de alejamiento de la curva gaussiana de un pico, de acuerdo con la magnitud de la asimetría se pueden determinar errores considerables de cuantificación. ^{24,25}

2.11 Componentes del HPLC

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento se compone de cinco instrumentos, los cuales son: el reservorio, la bomba, el inyector, el horno, la columna, el detector y la computadora. ^{24,25,26,27}

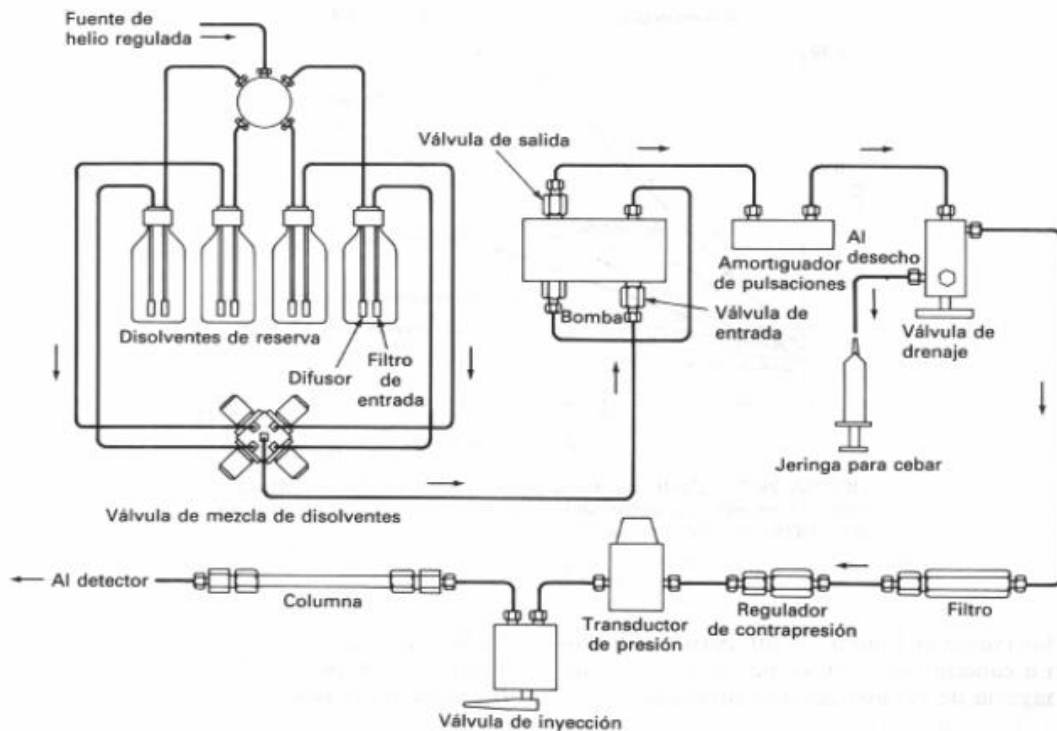


Figura 12. Diagrama de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.²⁷

El reservorio es aquel que contiene la fase móvil, se puede ubicar dentro de la caja de un equipo integrado o si es un equipo modular puede estar en la parte externa. Generalmente se encuentra algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad envíe el solvente hacia esta. Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad, de vidrio o polímero resistente, con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema. Al extremo de la tubería de salida del solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impiden el ingreso de partículas a la bomba.^{24,25,26,27}

La bomba promueve el flujo de la fase móvil proveniente del reservorio hacia el inyector, y desde ahí hacia la columna. Regularmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas recíprocas) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringas).^{24,25,26,27}

El inyector es el responsable de introducir la muestra al equipo para ser analizada por el detector. Este debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- No debe reaccionar con ninguno de los componentes y debe de ser capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema no debe provocar diluciones importantes en la solución inyectada.
- En casos especiales puede requerirse que opere a altas temperaturas.

Los inyectores son válvulas que orientan el flujo hacia la columna, estas válvulas están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra. ^{24,25,26,27}

El horno mantiene la temperatura de la columna, y es de vital importancia ya que esta influye directamente en la retención y selectividad del analito.

La columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, también son hechas plástico (PEEK) y de vidrio, aunque son menos tolerantes a la presión. Tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μm . La variación de estas dimensiones y materiales determinará la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna. ^{24,25,26,27}

El detector, es el encargado de analizar las señales recibidas en la columna para convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por la computadora. Los detectores se clasifican en dos grupos: selectivos, que son aquellos que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla, y los generales, que miden una propiedad física específica de la fase móvil.

Finalmente, la computadora recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y las plasma en un cromatograma para su posterior revisión e interpretación. ^{24,25,26,27}

2.12 Desarrollo de métodos analíticos

La guía ICH Q14 desarrollo de métodos analíticos describe los enfoques necesarios para desarrollar y mantener métodos analíticos para la evaluación de la calidad de sustancias y productos farmacéuticos. Estos enfoques pueden ser mínimos o mejorados y se pueden aplicar en la gestión del ciclo de vida de los métodos analíticos. Esta guía indica que es necesario realizar una gestión de riesgos antes de desarrollar el método analítico y que posteriormente éste pueda ser validado.

Aplica para métodos analíticos nuevos o revisados que se utilizan para pruebas de liberación y estabilidad de sustancias y productos farmacéuticos, así como también como parte de la estrategia de control para seguir un enfoque basado en el riesgo. ³¹

2.12.1 Enfoque mínimo

El desarrollo de métodos analíticos debe contener los siguientes elementos, según corresponda:

- Identificar los atributos de la sustancia que deben probarse mediante el método analítico.
- Seleccionar una tecnología, aparatos e instrumentos apropiados para el método analítico.
- Realizar estudios de desarrollo apropiados para evaluar las características del rendimiento del método analítico como la especificidad, exactitud, precisión y robustez.
- Definición de una descripción adecuada del método analítico.

2.12.2 Enfoque mejorado

El enfoque mejorado ofrece una forma de desarrollar y refinar el conocimiento de un método analítico y debe incluir uno o más de los siguientes elementos

- Evaluación de las propiedades de la muestra y la variabilidad esperada.
- Definición del Perfil Objetivo Analítico (ATP)
- Llevar a cabo una evaluación de riesgos e identificar los parámetros del método analítico que puedan afectar el rendimiento de este.
- Realizar experimentos de una o varias variables.
- Definir una estrategia de control del método analítico que asegure el cumplimiento del rendimiento.
- Definir un plan de gestión de cambios de ciclo de vida con definiciones claras y categorías de informes de condiciones establecidas, rangos aceptables probados o regiones de diseño operativo.

La aplicación de elementos del enfoque mejorado para el desarrollo puede conducir a métodos analíticos más sólidos, una mejor comprensión del impacto de los parámetros y una mayor flexibilidad para la gestión del ciclo de vida, como rangos operativos más amplios, un conjunto más apropiado de las condiciones establecidas y categorías de informes asociadas para cambios.³¹

2.12.3 Ciclo de vida del método analítico

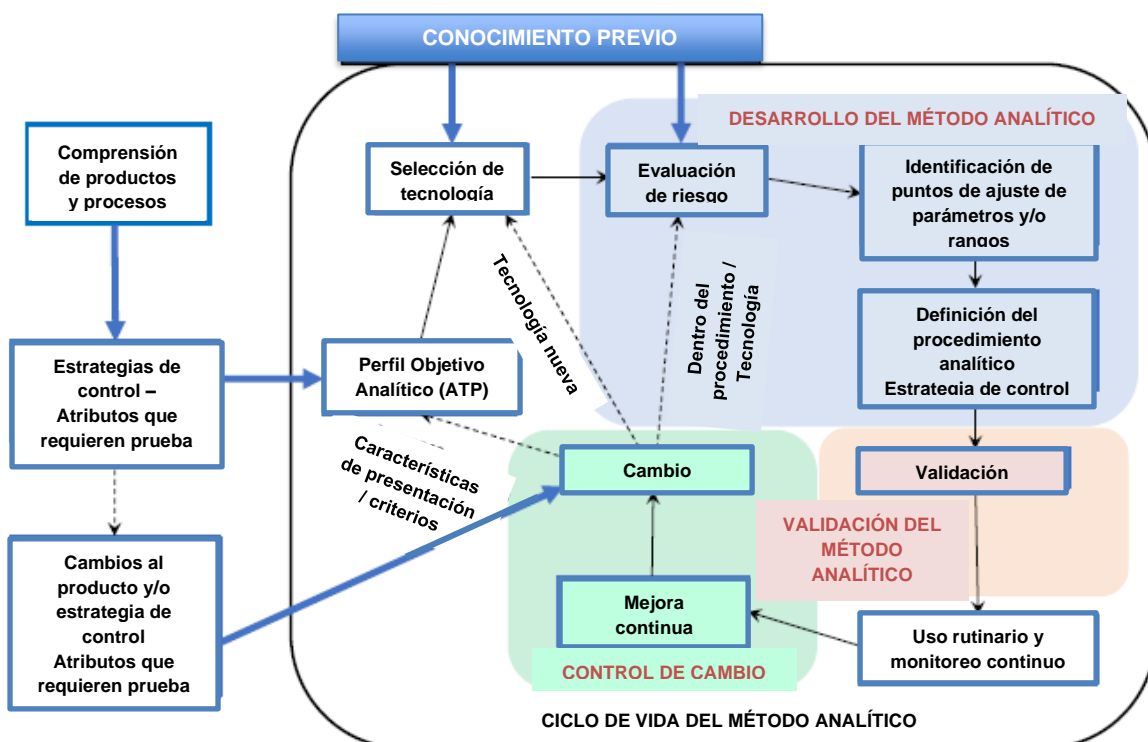


Figura 13. Elementos del ciclo de vida del método analítico.³¹

2.12.4 Perfil Analítico Objetivo (PAO)

Consiste en una descripción del propósito y detalles sobre los atributos del producto. Incluye los requisitos de desempeño para un solo atributo o un conjunto de atributos de calidad. Una vez seleccionada la tecnología, el PAO sirve como base para derivar las variables del método analítico y los criterios de aceptación apropiados para su validación. ³¹

2.12.5 Gestión del conocimiento

Se usa para informar decisiones durante el desarrollo del método analítico y la gestión del ciclo de vida. Contribuye a la selección de la tecnología más adecuada. ³¹

2.12.6 Gestión de riesgos

Ayuda en el desarrollo del método analítico. Reduce el riesgo de un desempeño deficiente y de informar resultados incorrectos. La gestión de riesgos debe incluir uno o más de los siguientes elementos:

- Identifica parámetros del método analítico con un impacto potencial en su desempeño.
- Evalúa el impacto potencial de los parámetros en el rendimiento del método analítico.
- Identifica y prioriza parámetros analíticos para ser investigados experimentalmente.
- Se utiliza para respaldar la mejora continua a lo largo del ciclo de vida del método analítico.
- Se debe documentar dentro del sistema de calidad farmacéutica (PQS).

2.12.7 Establecimiento de parámetros de métodos analíticos

2.12.7.1 Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para cumplir con los requisitos de desempeño esperados durante el uso normal. Se prueba mediante variaciones deliberadas de los parámetros del método y se lleva a cabo durante el desarrollo de este. ³¹

2.12.7.2 Rangos de parámetros de métodos analíticos

Los experimentos para investigar rangos de parámetros pueden proporcionar conocimientos adicionales sobre el rendimiento del método analítico. En un enfoque mejorado, los rangos de los parámetros relevantes y sus interacciones se pueden investigar en experimentos de variables múltiples (DoE). La evaluación de riesgos y el conocimiento previo deben usarse para identificar parámetros, atributos y rangos asociados que sean apropiados para ser investigados experimentalmente. Variables categóricas (instrumentos, temperatura, pH) también pueden ser considerados como parte del diseño experimental. ³¹

2.12.8 Estrategia de control de un método analítico

Una estrategia de control de método analíticos debe garantizar que funcione como se espera durante el uso de rutina a lo largo de su ciclo de vida. analítico. La estrategia de control debe establecerse antes de la validación (ICH Q2) y confirmarse una vez finalizada la validación.

La estrategia de control incluye los parámetros del método analítico que necesitan control y la prueba de idoneidad del sistema, que forma parte de la descripción del método analítico. La descripción debe incluir las acciones necesarias para realizar cada prueba analítica. Esto puede incluir (pero no se limita a) la muestra, los materiales de referencia y los reactivos, las preparaciones de muestras y controles, el uso del aparato, la generación de la curva de calibración, el uso de fórmulas para el cálculo de los resultados reportables y otros pasos necesarios. El nivel de detalle con el que se debe redactar la descripción de cada prueba analítica debe permitir que un analista experto realice el análisis y que pueda interpretar los resultados.³¹

2.12.9 Desarrollo de métodos analíticos multivariantes

Los procedimientos analíticos multivariantes son aquellos en los que se determina un resultado a través de un modelo de calibración multivariante que utiliza más de una variable de entrada. Los modelos multivariados vinculan las variables medidas del modelo con los valores obtenidos de un modelo validado, por lo tanto, las muestras en el análisis multivariante consisten en mediciones de entrada y sus correspondientes valores de referencia, que son valores numéricos para mediciones cuantitativas y categorías de clasificación para métodos cualitativos. Los rangos de los modelos multivariados se construyen típicamente con datos de muestras. Según el método y el principio de medición, la población de la muestra debe abarcar las fuentes de variabilidad que probablemente se produzcan durante la fabricación y el análisis, como la calidad de la materia prima, la variabilidad del proceso de fabricación, las condiciones de almacenamiento, la preparación de muestras y las pruebas. El uso de herramientas de evaluación de riesgos puede ayudar a identificar fuentes de variabilidad con el potencial de influir en las mediciones y los resultados del modelo resultante.

La selección de variables se realiza durante el desarrollo del modelo. Por ejemplo, la selección del rango de longitud de onda se aplica con frecuencia en aplicaciones espectroscópicas para seleccionar una región de un espectro que proporcione la mejor estimación de la propiedad química o física seleccionada que se va a evaluar (modelar). La selección de variables depende del principio de medición, la aplicación y otros factores, y debe justificarse.³¹

2.12.10 Presentación de información relacionada con el método analítico

El procedimiento analítico debe describir los pasos con suficiente detalle para que un analista experto realice el análisis. La presentación de los datos de validación debe seguir las recomendaciones de ICH Q2. Los criterios utilizados en el estudio de

validación deben incluirse en la presentación. Características de rendimiento, criterios de aceptación y otros elementos del enfoque mejorado, deben describirse en las secciones del expediente para la descripción del método analítico. La información de desarrollo relacionada con los procedimientos analíticos multivariados debe proporcionarse de acuerdo con el nivel de impacto del modelo³¹

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año de 1948, el metotrexato (MTX) se empleó por primera vez en un grupo de niños con leucemia, demostrando su eficacia en esta enfermedad, después, en 1988 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó su uso en la artritis reumatoide (AR) en adultos por lo que ha sido usado durante más de 25 años en el tratamiento de esta enfermedad, es considerado hoy en día el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FAME) de primera elección en el tratamiento de la AR, y de gran utilidad en el control de otras enfermedades reumáticas¹.

En los últimos cinco años, la COFEPRIS ha emitido seis registros sanitarios para fabricar metotrexato a farmacéuticas nacionales. En total, cinco farmacéuticas tienen permisos de importación de MTX vigentes hasta el año.²

Debido a esto, surge la necesidad de contar con procedimientos que permitan determinar la presencia de MTX en cada presentación farmacéutica, para así evaluar la calidad de dichos productos farmacéuticos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿El método analítico desarrollado con los enfoques y parámetros sugeridos en la guía ICH Q14 puede cuantificar el metotrexato presente en una solución inyectable por HPLC?

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método analítico para la cuantificación de metotrexato, solución inyectable, en plasma por HPLC, que incluya los enfoques y parámetros indicados en la guía ICH Q14.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar condiciones cromatográficas de trabajo en muestras de plasma o suero de rata que contengan metotrexato para demostrar que se cuantifica correctamente el fármaco.
- Demostrar mediante pruebas de prevalidación como especificidad del método, precisión del sistema, exactitud y repetibilidad del método y reproducibilidad, que cumplan con los criterios de aceptación, que el método analítico tiene un buen rendimiento. .

- Plantear un Diseño de Experimentos (DoE) para definir puntos de ajuste fijos para algunas variables y crear un espacio de diseño adecuado para el método analítico.

7. MÉTODO

7.1 Muestra

Solución inyectable de metotrexato.

7.2 Técnica, materiales e instrumentos

Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Reactivos químicos	Marca
Ácido cítrico anhidro RA	Tecsiquim
Fosfato de potasio monobásico, cristal	J.T Baker
SV Hidróxido de sodio 1N	HICEL
Acetonitrilo grado HPLC	Tecsiquim
Metanol grado HPLC	Tecsiquim
Ácido tricloroacético, cristal	J.T Baker
Agua desionizada	Theissier
Solución inyectable de metotrexato	ACCORD
Estándar de referencia Metronidazol	USP

Reactivo biológico	Plasma de rata
---------------------------	----------------

Material	Capacidad
Espátula	-
Charola de plástico	-
Agitador magnético	-
Vaso de precipitados	5, 10, 100, 500 y 1000 mL
Probeta	50, 100 y 500 mL
Reservorio	500 y 1000 mL
Matraz volumétrico	5, 10 y 25 mL
Jeringa	1, y 5 mL
Acrodisco	PDVS/P
Membranas de filtración	45 µm

Viales de vidrio con tapa para HPLC	2 mL
Tubos de ensayo con tapa rosca	13 x 100
Puntas para Micropipeta	1 mL

Instrumento	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	PA244
Microbalanza analítica	Mettler - Toledo	Mettler MTS
Potenciómetro	Hanna	HI2210
Equipo de filtración de Agua	Milipore	MilliQ
Micropipeta		

Equipo	Marca	Modelo
Espectro UV/VIS	Varian	Cary 50 BIO
Auto muestreador	Varian ProStar	50321
Detector	Varian ProStar	325
Bomba	Varian ProStar	240
Organizador	HITACHI Primaide	1637-001
Detector de diodos	HITACHI Primaide	1430
Horno	HITACHI Primaide	1310
Auto muestreador	HITACHI Primaide	1210
Bomba	HITACHI Primaide	1110
Parilla de agitación	Cimarec	SP131015
Bomba para vacío	Felisa	FE-1500L
Sonicador	Branson	3800
Vortex	Genie	2
Centrifuga	Hamilton Bell	VanGuard V6500
Columna	Phenomenex	Luna C8 (2) 100 Å 150 x 4.6 mm 5µm

7.3 Variables

Independiente

- Temperatura.
- Longitud de onda.
- Proporción de la fase móvil.
- pH de la fase móvil.

- Velocidad de flujo.
- Volumen de inyección.
- Columna.

Dependiente

- Tiempo de retención

7.4 Hipótesis

H0: El método analítico diseñado permitirá cuantificar metotrexato, solución inyectable y cumplirá con los enfoques y parámetros establecidos en la guía ICH Q14.

H1: El método analítico diseñado no permitirá cuantificar metotrexato, solución inyectable y no cumplirá con los enfoques y parámetros establecidos en la guía ICH Q14.

7.5 Diseño de estudio

Se realizarán pruebas con el fármaco solo y con el fármaco en plasma, a diferentes longitudes de onda y proporciones de fase móvil para establecer las condiciones en las que trabajara el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Posteriormente, se cuantificará el metotrexato y se realizaran pruebas estadísticas para evaluar el rendimiento del procedimiento analítico. Finalmente se realizará la documentación requerida en la guía ICH Q14.

7.6 Procedimiento

Para la parte experimental, se llevó a cabo una consulta bibliográfica acerca de los métodos realizados anteriormente para la cuantificación de metotrexato, también se revisaron las propiedades físicas y químicas del analito. Partiendo de la información obtenida se llevaron a cabo diferentes pruebas. Primero se realizó un barrido en espectro UV/VIS para conocer la longitud de onda del analito, posteriormente se propuso una fase móvil compuesta por ácido cítrico / fosfato de potasio: acetonitrilo y se ejecutaron pruebas en el equipo HPLC para determinar la proporción de la fase móvil. Para poder analizar muestras en plasma de rata se sugirieron diferentes métodos de extracción de proteínas y posterior a eso se corrieron muestras con el analito.

Con el fin de incluir un estándar interno también fue necesario efectuar una consulta bibliográfica de compuestos con propiedades físicas y químicas similares a las del analito. Se selecciono el metronidazol y también se le realizo un barrido en espectro UV/VIS. Se ajusto la longitud de onda y la fase móvil. Nuevamente se desarrollaron muestras en plasma de rata y se analizaron en el HPLC. Finalmente se propuso una curva de calibración con 6 niveles

Para la parte documental, se consultó la guía ICH Q14, se elaboró una gestión de riesgos y posteriormente se planteó un espacio de diseño, se realizaron pruebas de prevalidación y se concretó la documentación que dio trazabilidad al método analítico.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Determinación de la longitud de onda

Para iniciar con el desarrollo de este método analítico, lo primero que fue necesario establecer fue la longitud de onda a la cual se podría observar el analito. Para esto, se preparó una solución de metotrexato con una concentración de 0.01 mg/mL de la siguiente manera; con una jeringa limpia de 1 mL se tomó 1 mL de solución inyectable de metotrexato y vertió en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua y posteriormente se sónico durante 1 minuto, de esa disolución se tomó 1 mL y se vertió en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con agua y posteriormente se sónico durante 1 minuto.

De esta última disolución se tomó una muestra y se realizó un barrido en el espectro UV/VIS, con lo que se determinó que el UV máx del metotrexato es de 302 nm.

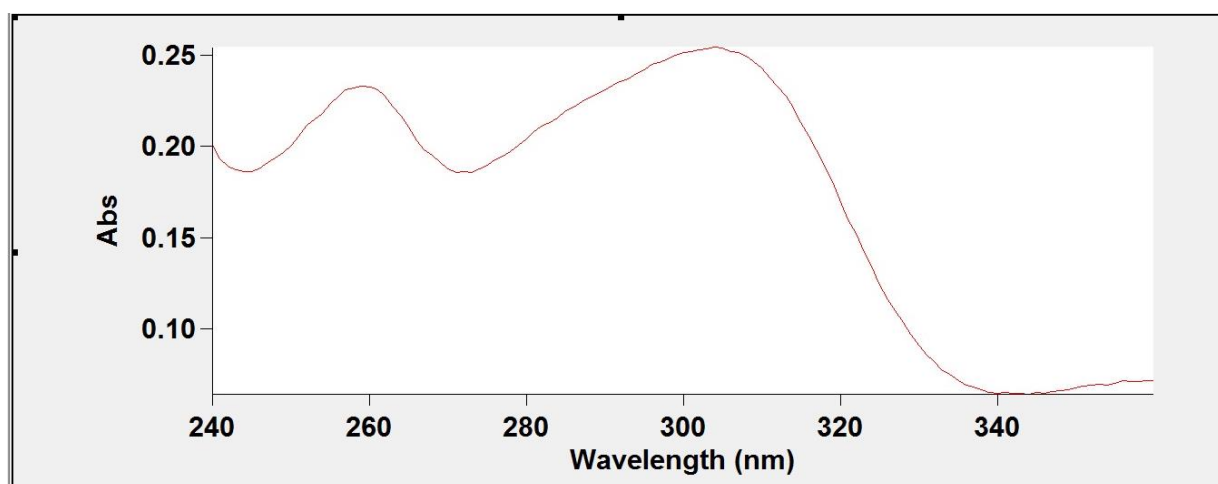


Figura 14. Barrido de metotrexato a una concentración 0.01 mg/mL.

8.2 Determinación de la fase móvil

Una vez definida la longitud de onda y de acuerdo con las propiedades físicas y químicas del analito se propuso una fase móvil que permitiera obtener un pico definido y cuantificar correctamente el mismo. Se planteó utilizar ácido cítrico y fosfato de potasio para la fase acuosa e intentar con acetonitrilo y metanol para escoger el disolvente orgánico de la fase móvil. Las proporciones que se probaron se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 2. PROPORCIONES EXPERIMENTADAS CON ACETONITRILLO	
Fase acuosa [%]	Acetonitrilo [%]
89	11
90	10

TABLA 3. PROPORCIONES EXPERIMENTADAS CON METANOL	
Fase acuosa [%]	Metanol [%]
89	11
90	10

Para preparar 500 mL de la fase acuosa fue necesario pesar en una balanza analítica 0.48035 g de ácido cítrico y 0.068045 g de fosfato de potasio y vaciar en un vaso de precipitados. Con una probeta se tomaron 500 mL de agua desionizada y se añadió al vaso, posteriormente se sónico por 10 minutos, luego se midió el pH y se ajustó con una disolución de hidróxido de sodio 1N hasta llegar a pH 6.0.

Con ayuda del equipo de filtración y una membrana de poro 0.45 μm se filtró la fase acuosa y después se vertió en un reservorio previamente purgado con la misma. Se identificó y se llevó a ultrasonido por 5 minutos. Se colocó el reservorio en la línea correspondiente del cromatógrafo.

Para el disolvente acuso, se tomaron 500 mL de agua desionizada y se filtró en el equipo de filtración con un filtro de poro 0.45 μm y posteriormente se vertió en un reservorio previamente purgado con la misma. Se identificó y llevó a ultrasonido por 5 minutos. Se colocó el reservorio en la línea correspondiente del cromatógrafo.

Para el disolvente orgánico, se tomaron 500 mL de acetonitrilo grado HPLC y 500 mL de metanol HPLC y se filtraron por separado en el equipo de filtración con una membrana de poro 0.45 μm y después se vertieron en un reservorio previamente purgado con el respectivo disolvente. Se identificaron y se llevaron a ultrasonido por 5 minutos.

Con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 μL se realizaron pruebas en el cromatógrafo cambiando la proporción de la fase acuosa.

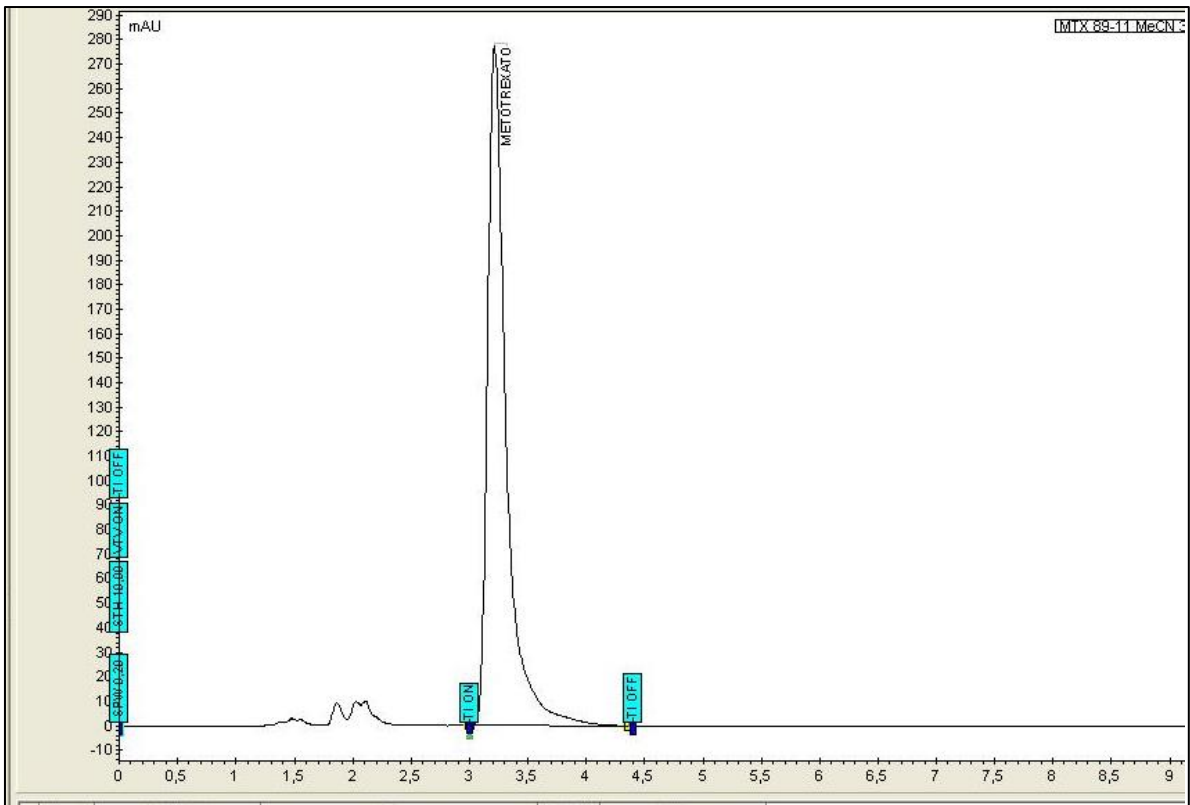


Figura 15. Cromatograma de metotrexato en una concentración de 0.1 mg/mL a 302 nm corrido con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 89:11 acetonitrilo pH 6.0.

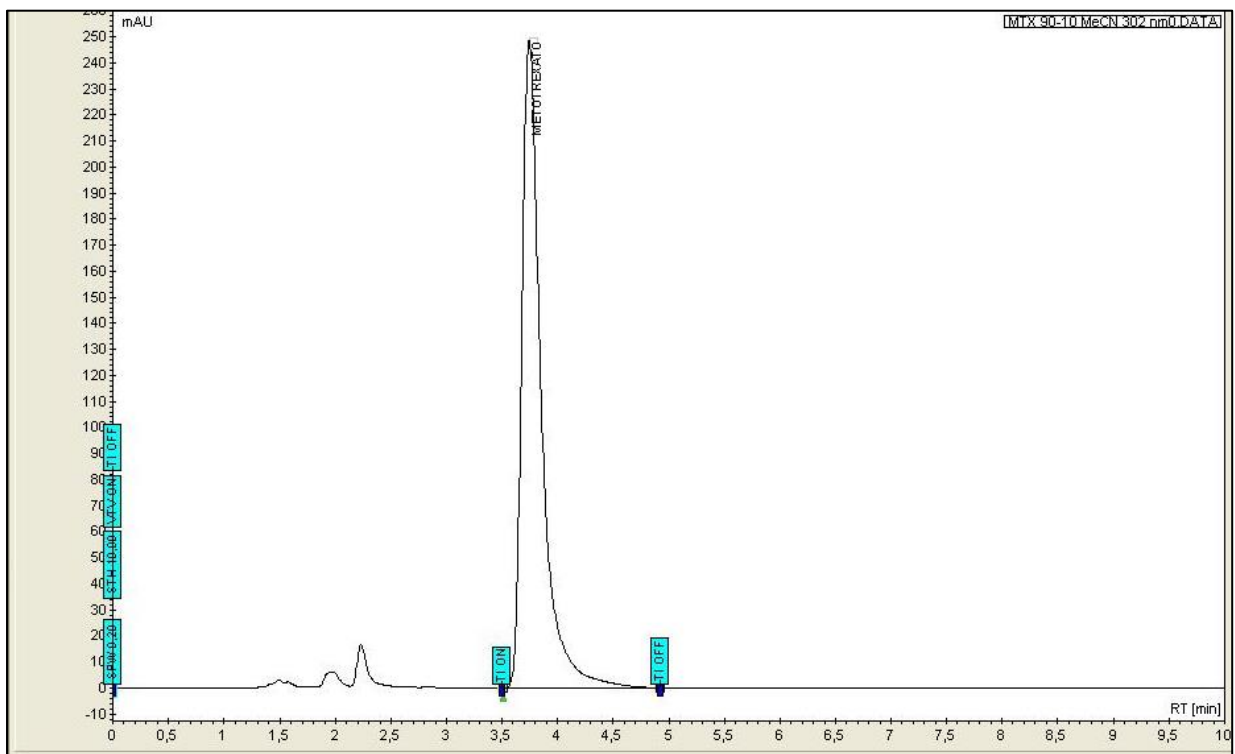


Figura 16. Cromatograma de metotrexato en una concentración de 0.1 mg/mL a 302 nm corrido con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo pH 6.0.

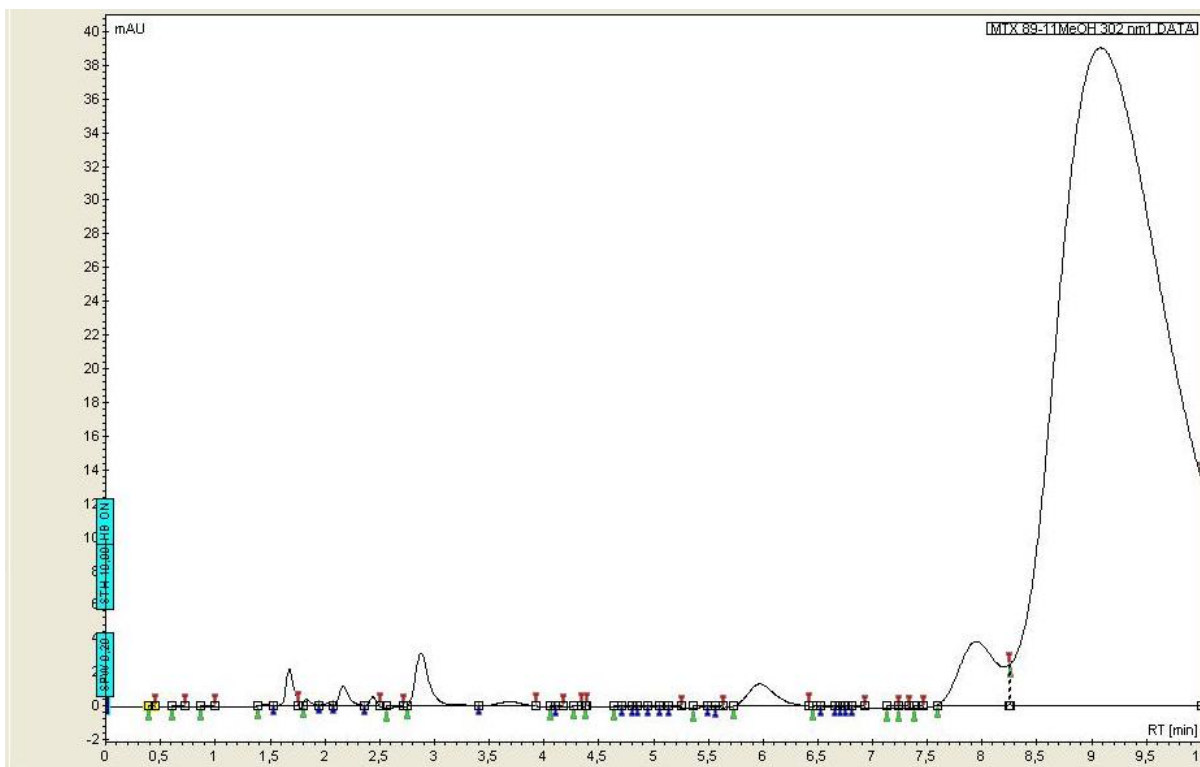


Figura 17. Cromatograma de metotrexato en una concentración de 0.1 mg/mL a 302 nm corrido con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 89:11 metanol pH 6.0.

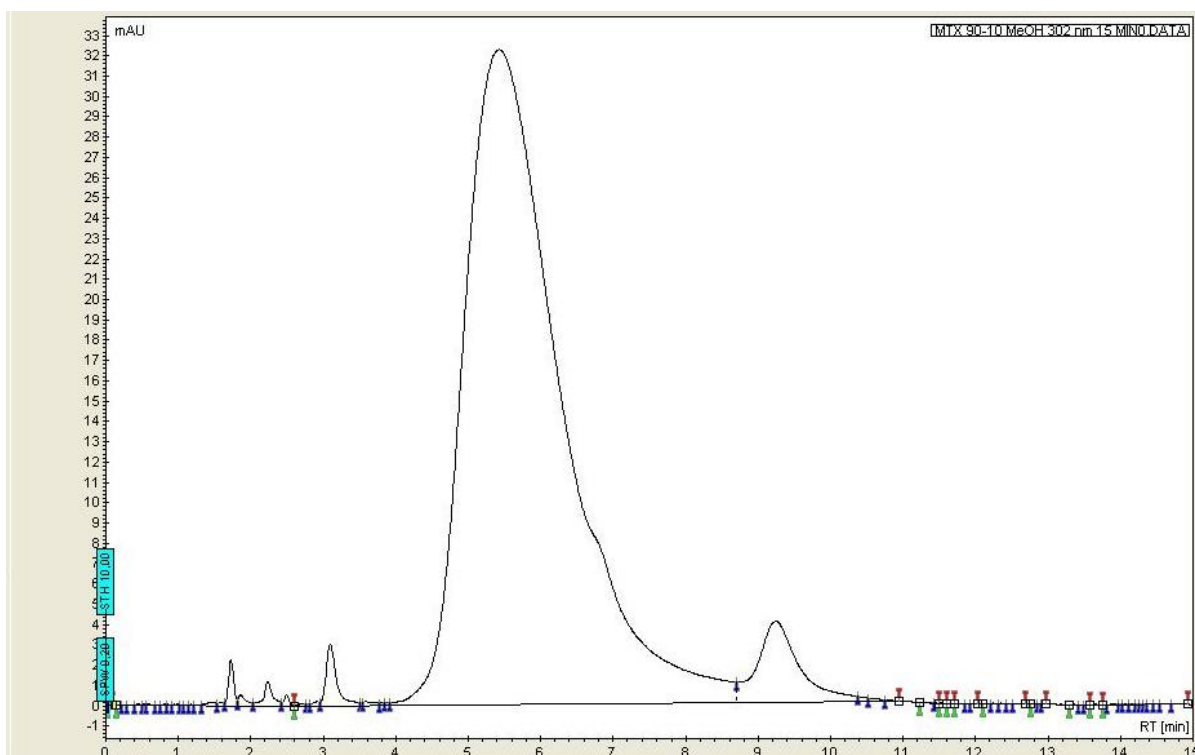


Figura 18. Cromatograma de metotrexato en una concentración de 0.1 mg/mL a 302 nm corrido con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 metanol pH 6.0.

De acuerdo con la literatura, la fase móvil debe ser líquida y cumplir con la función de llevar la muestra a través de la fase estacionaria. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la muestra, la fase estacionaria y la fase móvil establece la retención y la separación de los componentes de la mezcla. Aquellos que tengan mayor afinidad con la fase estacionaria se trasladaran con menor velocidad que aquellos que presentan una menor afinidad.

Debido a que el metanol tiene menor fuerza de elución con el metotrexato, a causa de su polaridad, y a su baja afinidad con la fase estacionaria, en los cromatogramas de ambas proporciones con metanol se puede observar una línea base inestable, el pico del analito es ancho, tiene interferencia y no termina de eluir en los 10 minutos que duró el análisis

En el caso del acetonitrilo se puede determinar que es más a fin al metotrexato y a la fase estacionaria, pues en ambas proporciones se observan picos definidos y una línea base muy estable. Debido a esto se estableció que la proporción ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo era la más adecuada ya que permitía obtener un pico más definido y sin interferencia con los disolventes.

8.3 Determinación del estándar interno

Después de realizar un análisis de adecuabilidad, se observó que en cada inyección de la misma muestra de metotrexato se obtenían áreas bajo la curva con variaciones, por lo que se vio pertinente agregar un estándar interno a la muestra para corregir la pérdida de analito durante la preparación de la muestra. Este nuevo analito debía tener propiedades físicas y químicas similares a las del analito de interés. Para poder escoger un estándar interno se realizó una investigación bibliográfica en su búsqueda. Finalmente se propuso el metronidazol. Para saber si el metronidazol tenía una longitud de onda similar a la del metotrexato fue necesario realizar un barrido en el espectro UV/VIS.

Para realizar el barrido se preparó una solución de SR metronidazol con una concentración de 0.01 mg/mL de la siguiente manera; en la micro balanza se pesaron 25 mg de SR metronidazol y se vertió en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua y posteriormente se sónico durante 5 minutos, de esa disolución se tomó 1mL y se vertió en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con agua y posteriormente se sónico durante 1 minuto.

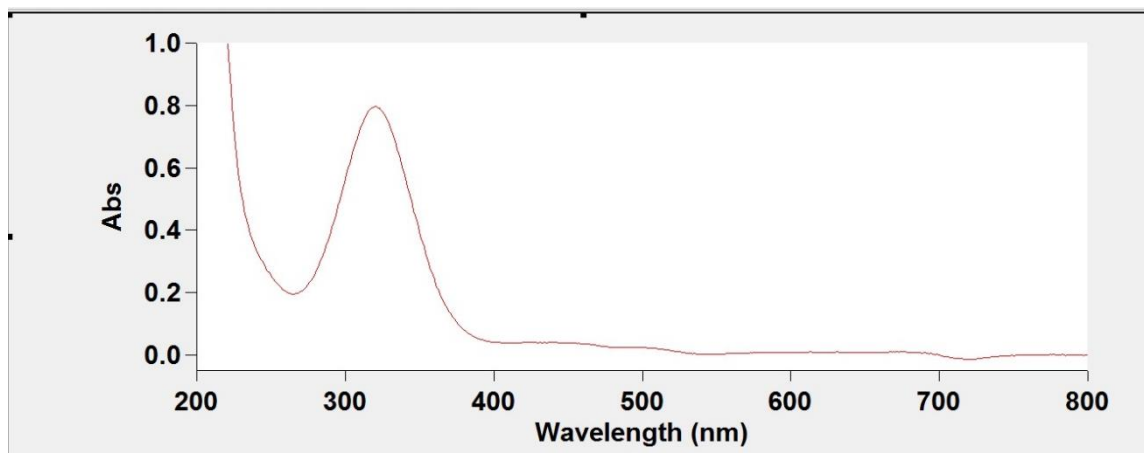


Figura 19. Barrido de metronidazol a una concentración 0.01 mg/mL.

En el espectro del barrido se observa que el UV máx del metronidazol es de 320 nm, sin embargo, metotrexato presentaba UV máx a 302 nm. Se concluyó que al agregar metronidazol como estándar interno y analizarlo a 302 nm no comprometería su correcta cuantificación.

Para continuar con las pruebas para el desarrollo del método analítico primero se realizaron muestras en fase móvil, para lo que fue necesario realizar una solución stock pesando 25 mg de SR metronidazol y vertiendo en un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó un poco del volumen con fase móvil y se sónico durante 5 minutos para su completa disolución, se aforó y se sónico durante 1 minuto. Para obtener una concentración de 0.1 mg/mL se tomó 1 mL de la solución stock y se agregó en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforar con fase móvil y posteriormente se sónico durante un minuto.

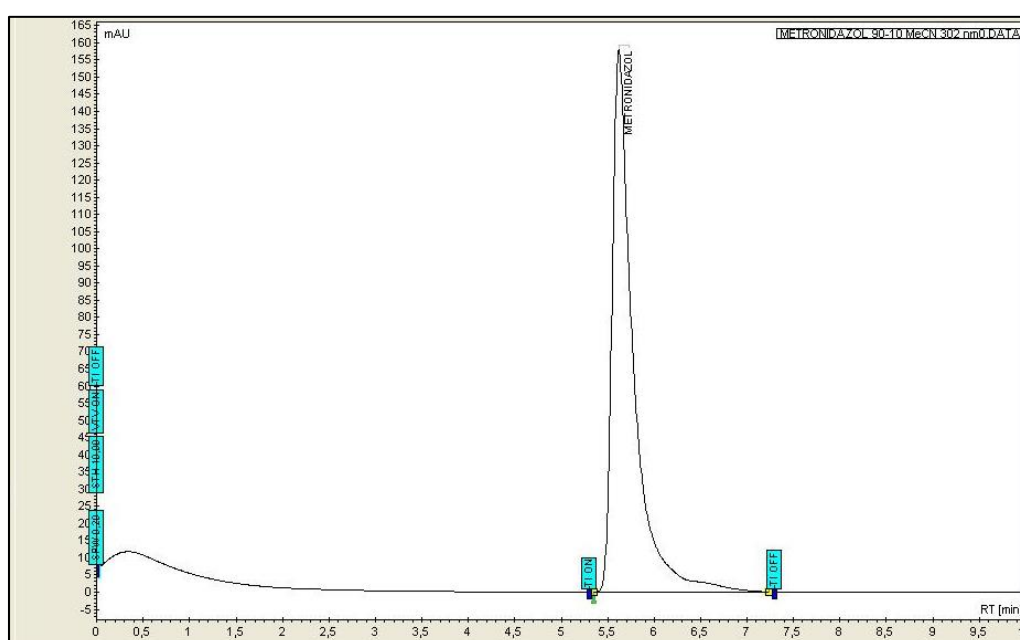


Figura 20. Cromatograma de metronidazol en una concentración de 0.1 mg/mL a 302 nm corrido con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo pH 6.0.

En vista de que el tiempo de retención del metronidazol fue de 5.53 minutos y que el de metotrexato era de 3.58 por separado, se planteó realizar una muestra con el analito y el estándar interno para observar su resolución.

Para la solución stock de metotrexato en fase móvil se tomó con una jeringa limpia 1 mL de solución inyectable de metotrexato y se agregó en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con fase móvil y posteriormente se sónico durante un minuto.

Para obtener una solución de metotrexato con metronidazol en fase móvil con una concentración de 0.1 se tomó 1 mL de cada una de las soluciones stock y se agregaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforo con fase móvil y se sónico durante 1 minuto. Esta muestra se inyectó en el cromatógrafo y se observó que el tiempo de retención de los picos cambiaba, sin embargo, esto no comprometía su cuantificación pues se percibían picos definidos, sin interferencia y con una buena resolución.

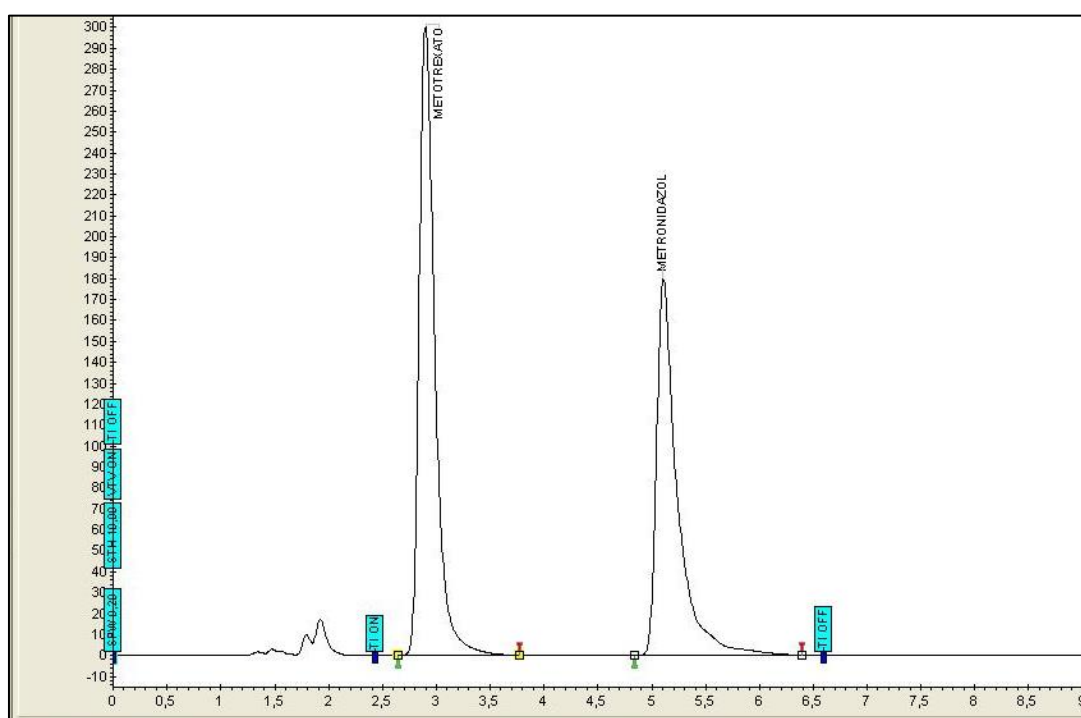


Figura 21. Cromatograma de metotrexato y metronidazol concentración de 0.1 mg/mL corrido a 302 nm con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo pH 6.0.

8.4 Solución de extracción de proteínas

La sangre está compuesta por dos factores diferenciables que son las células y el plasma sanguíneos. En una muestra de sangre real se necesitaría obtener el plasma para poder cuantificar el metotrexato presente en él y posteriormente extraer el analito de las proteínas presentes en este. Para lograr esto se propuso separar las proteínas con metanol, sin embargo, se logró de manera deficiente, ya que al filtrar el sobrenadante con un acrodisco este se tapaba y no se lograba filtrar nada. Después se intentó extraer con acetonitrilo, pero se obtuvo el mismo resultado que con el

metanol. Finalmente se planteó realizar una solución de metanol 99:1 ácido tricloroacético.

Para realizar mezcla se preparó una solución 1N de ácido tricloroacético pesando 1.6339g de este y se vertió en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con agua desionizada previamente filtrada y se sónico durante 1 minuto. Con una probeta de 100 mL, se tomaron 99 mL de metanol grado HPLC y se le agregó 1 mL de la solución 1N de ácido tricloroacético. Esta solución se guardó en un recipiente previamente identificado y se mantuvo en refrigeración.

La extracción del analito fue más eficiente y limpia ya que el disolvente y la refrigeración actuaron disminuyendo la solubilidad de las proteínas y estas en conjunto con el ácido formaron sales insolubles que precipitaron de manera eficiente y se obtuvo un sobrenadante traslucido.

Una vez que se tenía una solución de extracción eficaz, se empezaron a ejecutar pruebas en plasma de rata, para lo que fue necesario realizar una solución stock de metotrexato en plasma y darle el tratamiento necesario a la muestra llevando a cabo los siguientes procedimientos:

8.5 Solución stock de metotrexato en plasma.

Con una jeringa limpia de 1 mL se tomó 1 mL de solución inyectable de metotrexato y se vertió en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con plasma de rata y posteriormente se sónico durante 1 minuto.

8.6 Purificación de plasma con metotrexato

En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la solución stock de metotrexato en plasma, 1 mL de fase móvil y 1 mL de la solución metanol 99:1 ácido tricloroacético. Se colocó en el vortex por 2 minutos y después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 1.5 mL del sobrenadante y se agregó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se sónico durante 1 minuto.

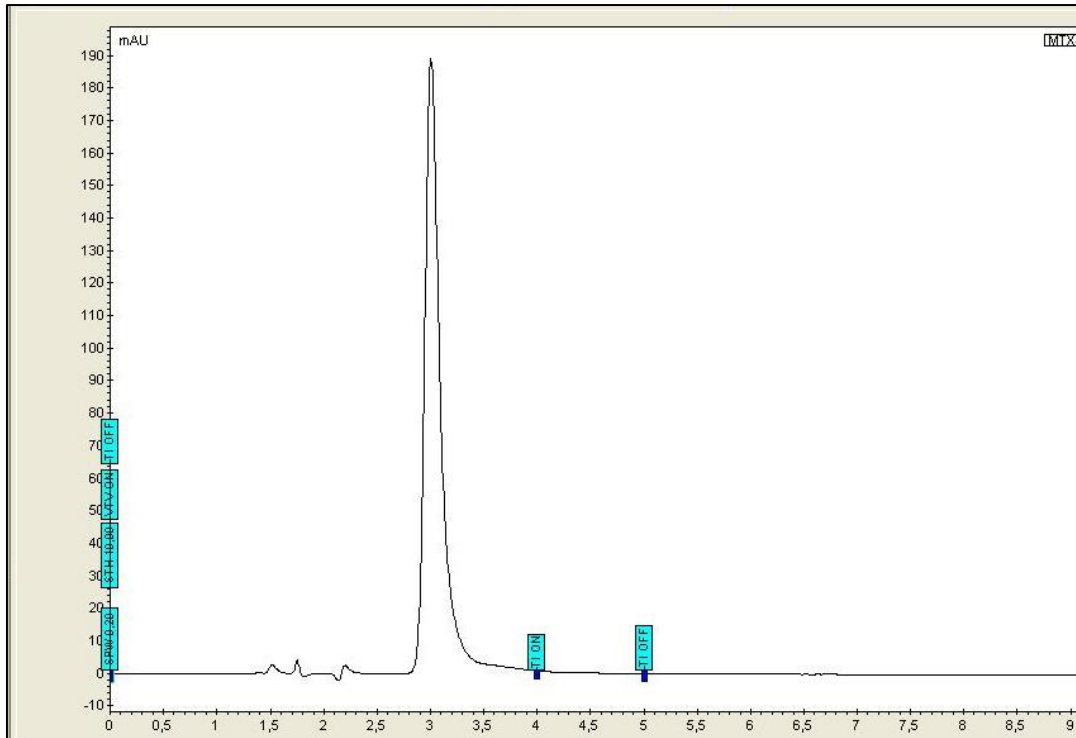


Figura 22. Cromatograma de metotrexato en plasma purificado en una concentración 0.1 mg/ml corrido a 302 nm con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo pH 6.0.

Al analizar el metotrexato en plasma se observó un pico definido, por lo que se decidió realizar una muestra con analito y estándar interno en plasma para observar su comportamiento. Al mismo tiempo, se decidió cambiar de equipo a un HPLC PDA ya que por la sensibilidad del equipo nos permitiría analizar si existía la presencia de alguna interferencia que no se apreciara en el equipo HPLC Varían. El tratamiento de esta nueva muestra se llevó a cabo de la siguiente manera:

8.7 Adecuabilidad del del sistema

Para saber si el sistema funciona de manera correcta y demostrar que el desempeño de este cumple con los criterios preestablecidos fue necesario realizar pruebas de adecuabilidad para asegurar la confiabilidad de los resultados del método analítico.

Para lo cual, se realizó una solución stock de metotrexato en fase móvil, una solución stock de metronidazol y se realizó el tratamiento de la muestra previamente mencionado. De esta muestra se realizaron 6 inyecciones del mismo vial en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución y se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 5. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA			
Inyección	ABC MTX	ABC MTZ	R.R
1	63586696	4630342	13.73261327
2	63600593	4636529	13.71728571
3	63637976	4645327	13.69935335
4	63759458	4632885	13.76236578
5	63637257	4629160	13.74704201
6	63814524	4633268	13.77311306
			X̄
			13.73862886
			S
			0.025356346
			% CV
			0.18456242

De acuerdo con las áreas bajo la curva derivadas del analito de interés y del estándar interno se determina que existe una baja variabilidad entre las inyecciones de la muestra, lo que indica que el sistema está trabajando de manera correcta.

Con los resultados obtenidos se calculó el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (%CV) de las respuestas relativas (R.R).

8.8 %CV de Horwitz

Para analizar si el %CV obtenido en la adecuabilidad cumplía con el criterio de aceptación se utilizó la ecuación de Horwitz para definir este parámetro:

$$\%CV = 2^{((1-0.5)\text{LogConc})}$$

Donde:

C= Concentración nominal

Para calcular la concentración nominal se realizó la siguiente conversión:

- Nivel 0.5% de concentración de MTX = 0.00005mg/mL de MTX
- 0.00005 mg/mL= 0.05 μ /mL
- 2×10^{-4} % de concentración de MTX = 2×10^{-6} Concentración nominal de MTX

Aplicando la fórmula de Horwitz:

$$\%CV = 2^{((1-0.5)\text{Log}2 \times 10^{-6})}$$

$$\%CV = 14.414860$$

De acuerdo con la ecuación de Horwitz el %CV para la muestra debe de ser <14.414860. Comparando el valor del %CV obtenido en la adecuabilidad con el %CV calculado se determina que %CV de la muestra cumple con el criterio de aceptación calculado, por lo cual, los resultados obtenidos son confiables. Con este criterio ya determinado se procedió a establecer una curva de calibración del método analítico.

8.9 Purificación de plasma con metotrexato y metronidazol.

En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la solución stock de metotrexato en plasma, 1 mL de la solución stock de metronidazol y 1 mL de la solución metanol 99:1 ácido tricloroacético. Se colocó en el vortex por 2 minutos y después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Finalmente se tomó 1.5 mL del sobrenadante y se agregó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se sónico durante 1 minuto.

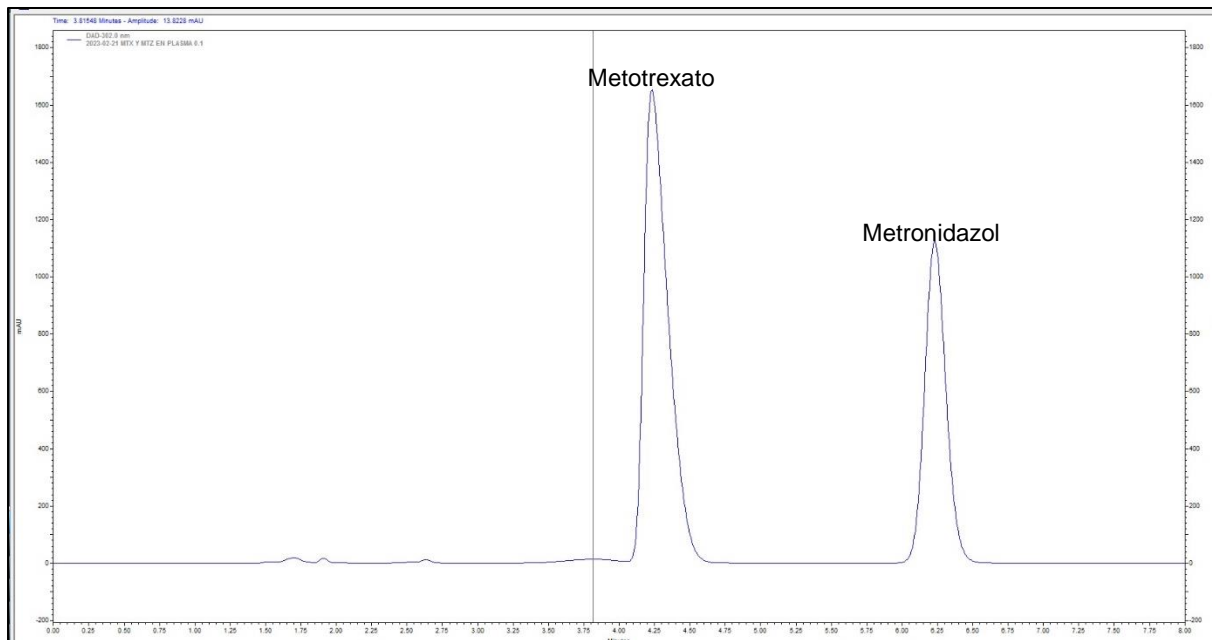


Figura 23 Cromatograma de metotrexato y metronidazol en plasma purificado en una concentración 0.1 mg/mL corrido a 302 nm con fase móvil ácido cítrico-fosfato de potasio 90:10 acetonitrilo pH 6.0.

Debido al cambio de equipo, los tiempos de retención cambiaron, el metotrexato eluyó al minuto 4.25 y el metronidazol al 6.27, a pesar de eso, los picos se mantuvieron sin interferencia y con buena resolución.

Con estos resultados se procedió a calcular el porcentaje de recobro para determinar la capacidad del método analítico para cuantificar el metotrexato.

TABLA 4. RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL %R.				
MUESTRA				
METOTREXATO			METRONIDAZOL	
Vial	Tiempo	Área [mUA.Sec]	Tiempo	Área [mUA.Sec]
1	3.39	3841.8	5.47	2673.8
2	3.39	3704.3	5.47	2593.2
3	3.39	3810.4	5.47	2643.5
4	3.40	3848.8	5.47	2731.3
5	3.39	3899.1	5.46	2759.5
6	3.40	3876.6	5.47	2724.7

Promedio	3830.1667
DS	68.736502
CV	1.7946086

Promedio	2687.666667
DS	62.45365215
CV	2.323712718

RESPUESTA RELATIVA	
Vial	-
1	1.4368315
2	1.4284668
3	1.4414224
4	1.4091458
5	1.4129734
6	1.4227621

%R	
Vial	
1	101.3970643
2	100.8067671
3	101.7210424
4	99.44329073
5	99.71339964
6	100.4041925

Promedio	1.425267
----------	----------

Promedio	100.5809594
----------	-------------

Se obtuvo un promedio del porcentaje de recobro del 100.58%, con este resultado se podía continuar con el desarrollo del método analítico.

8.10 Curva de calibración del método analítico

La teoría menciona que la dosis promedio de administración de MTX es de 25 mg alcanzando niveles séricos de 0.1 mg/mL, tomando este valor como el 100% se propuso realizar una curva en la cual se cuantificarán niveles bajos para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) en el cual este método podría cuantificar el metotrexato.

Los niveles de concentración para la curva de calibración del método y la manera de preparación de la muestra se pueden observar en la siguiente tabla:

TABLA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO					
Nivel [%]	Concentración [mg/mL]	Volumen de MTX en plasma.	Volumen de metronidazol.	Volumen de plasma.	Volumen de solución de extracción
0.01	0.0001	1 mL	1 mL	NA*	1 mL
1	0.001	1 mL	1 mL	NA	1 mL
10	0.01	100 µL	1 mL	900 µL	1 mL
40	0.04	400 µL	1 mL	600 µL	1 mL
80	0.08	800 µL	1 mL	200 µL	1 mL
100	0.1	1 mL	1 mL	NA	1 mL

*NA = No aplica

Los cromatogramas derivados se muestran a continuación:

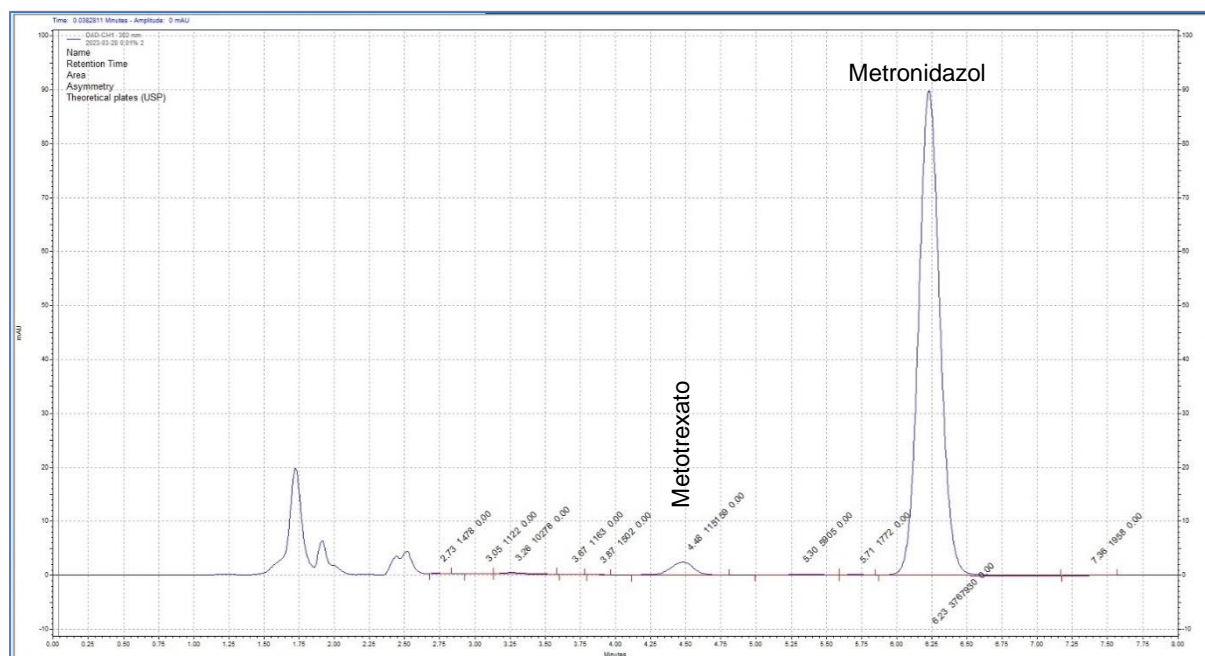


Figura 24. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 0.01%.

Para el nivel 0.01% se efectuó una disolución de 1 mL de la solución stock de metotrexato en plasma en 100 mL de agua y de esta se tomó 1 mL y se disolvió en 10 mL de plasma, con esta última disolución se continuo con el tratamiento de la muestra.

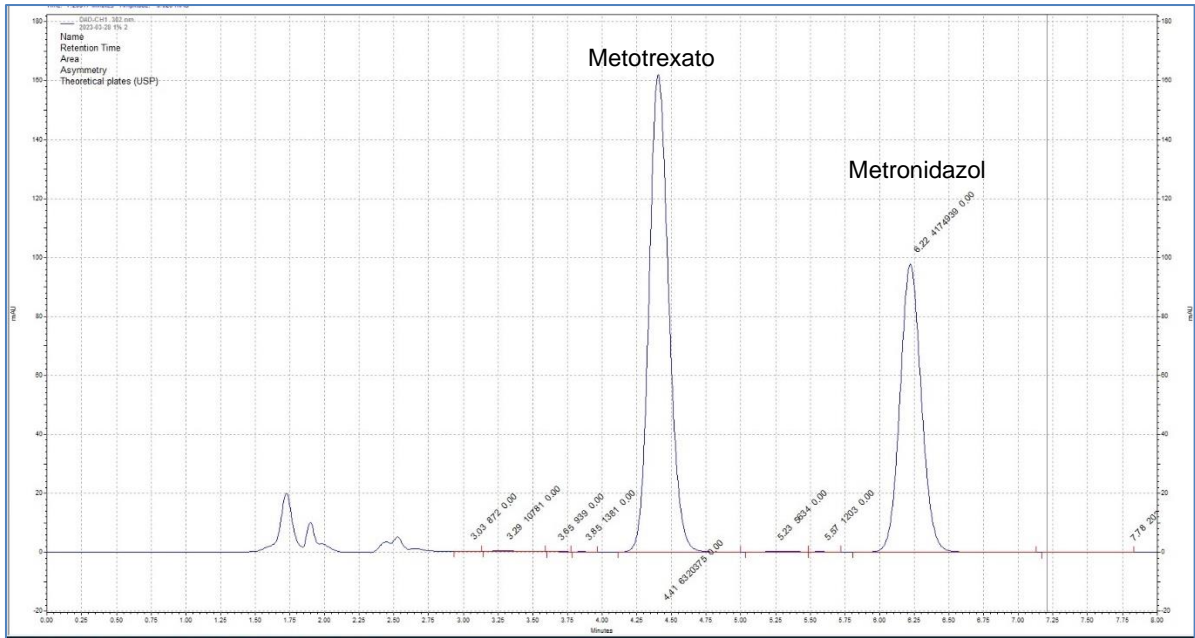


Figura 25. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 1%.

Para el nivel 1% previo al tratamiento de la muestra se realizó una disolución de 1 mL de la solución stock de metotrexato en plasma en 10 mL de plasma y con esta se realizó la curva.

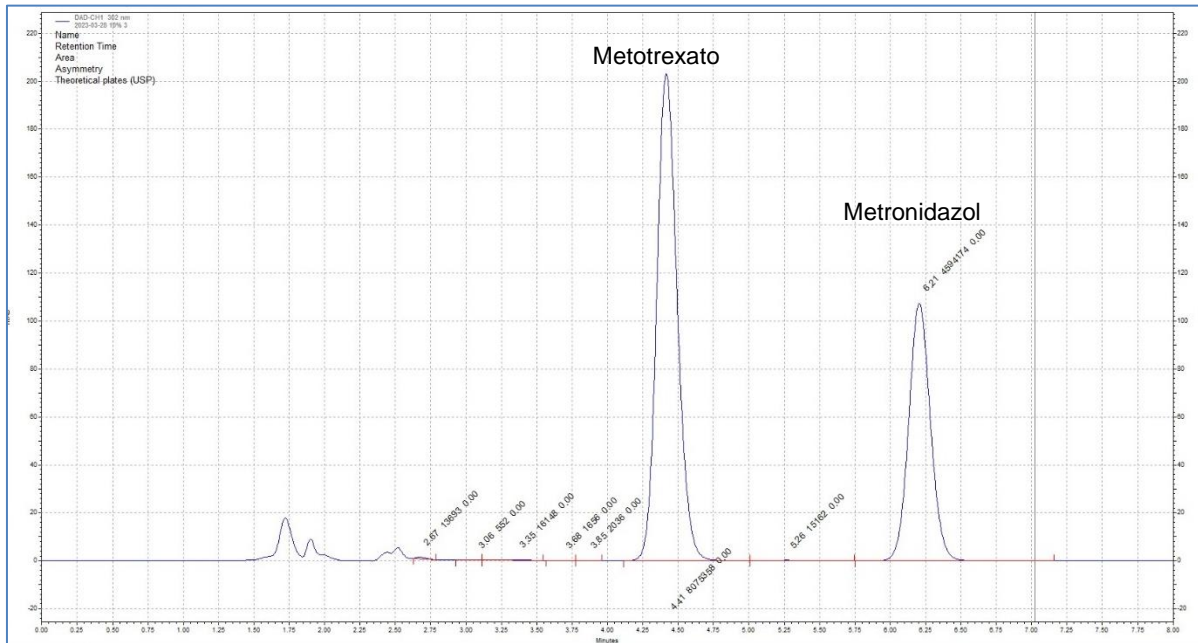


Figura 26. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 10%.

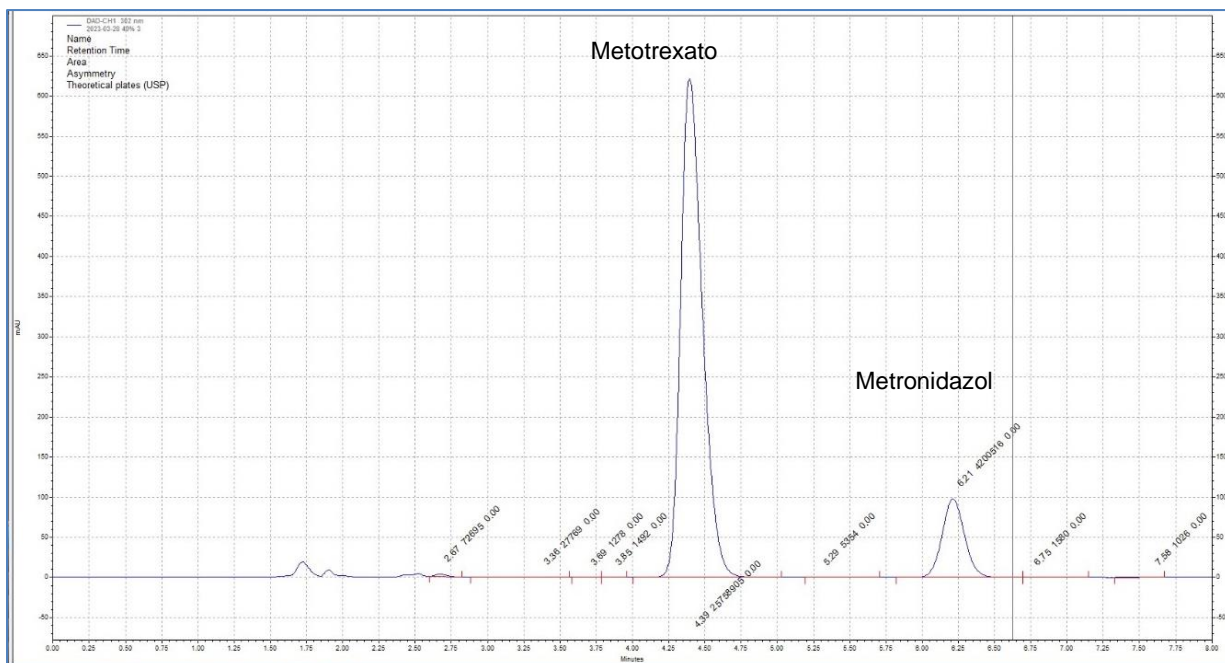


Figura 27. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 40%.

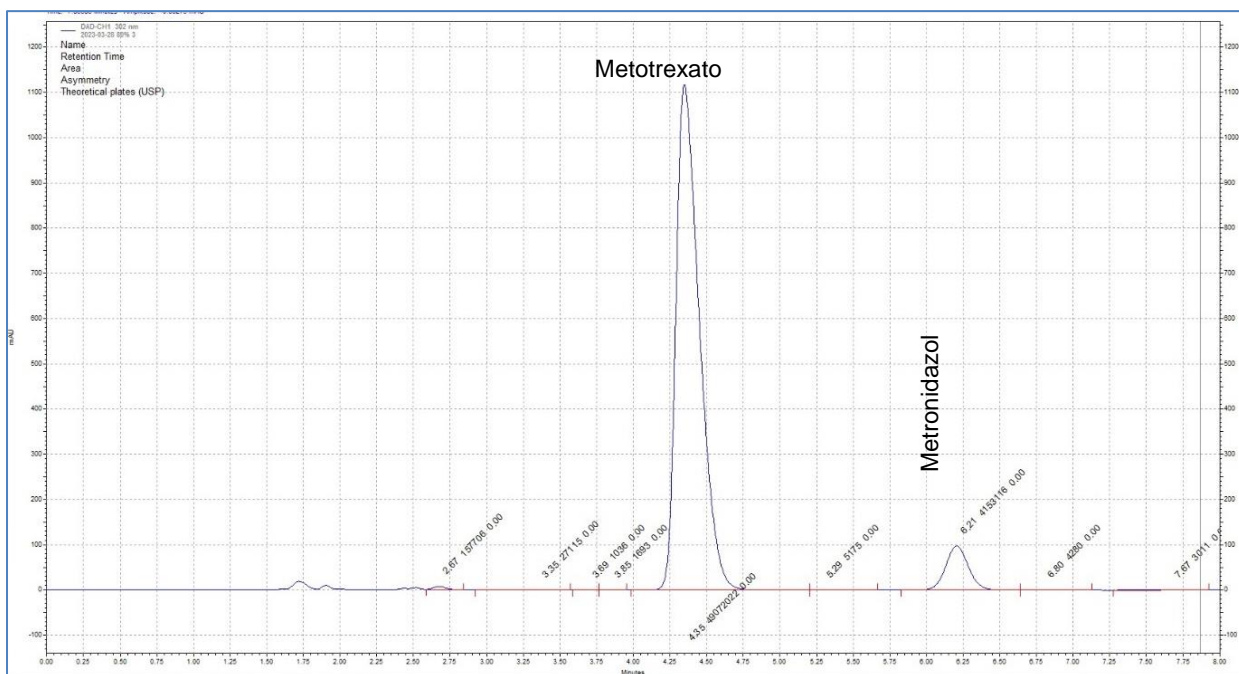


Figura 28. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 80%.

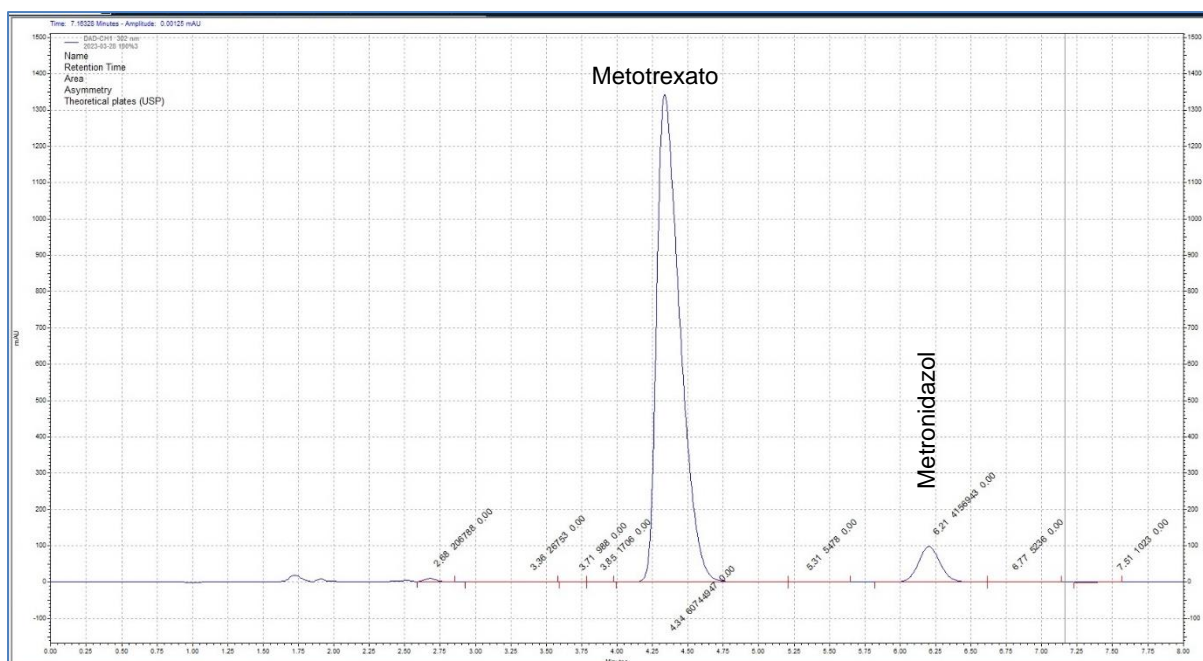


Figura 29. Cromatograma de la curva de calibración del método en el nivel 100%.

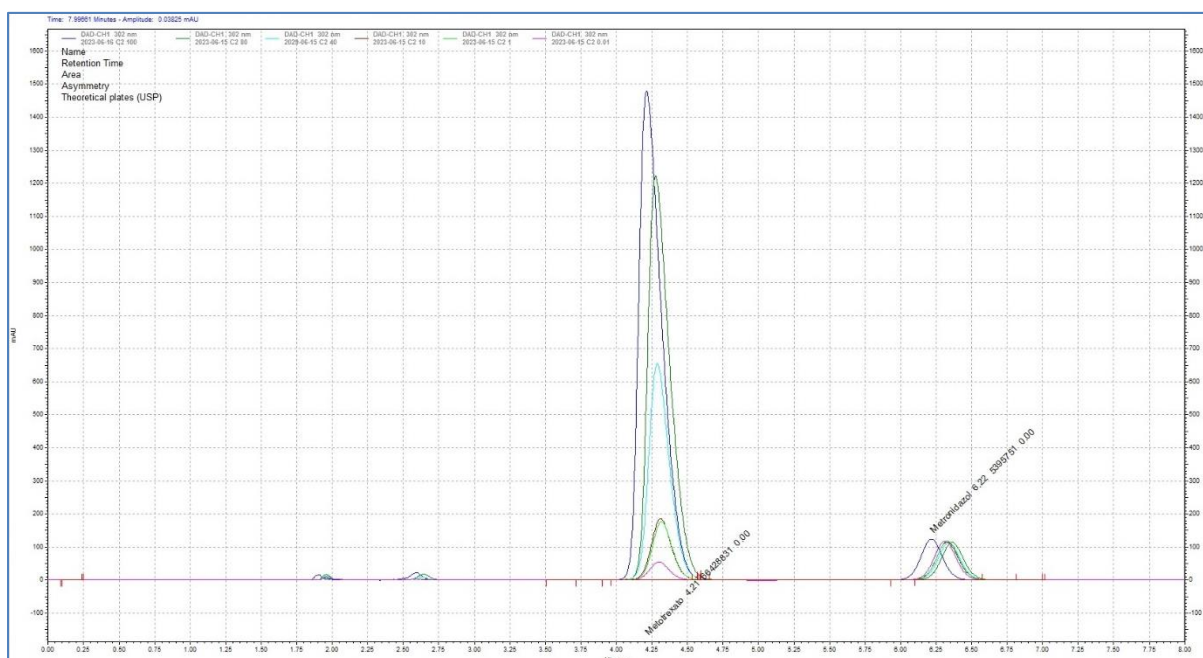


Figura 30. Cromatograma de la curva de calibración del método en todos los niveles.

En la Tabla 7. Resultados de la curva de calibración del método analítico, se muestran los resultados obtenidos, para ello, se realizaron tres muestras por % de nivel de concentración y con las áreas bajo la curva obtenidas en cada cromatograma se calcularon las respuestas relativas de cada de una. El promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación se calculó por % de nivel de concentración.

Conforme al %CV determinado por la ecuación de Horwitz, todos los niveles de concentración cumplen con el criterio de aceptación, pues ningún valor obtenido es mayor a 14.414860.

TABLA 7. RESULTADOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO								
Replica	Nivel %	Conc. [mg/mL]	ABC MTX	ABC MTZ	R.R			% Recobro
1	0.01	0.0001	91273	4962057	0.0184	X	0.0185	0.1339
2		0.0001	91156	4976009	0.0183	DS	0.0002	0.1333
3		0.0001	90331	4837989	0.0187	CV	1.0045	0.1359
1	1	0.001	6861860	4952410	1.3856	X	1.3674	10.0851
2		0.001	6942837	4953910	1.4015	DS	0.0460	10.2011
3		0.001	6566721	4993246	1.3151	CV	3.3612	9.5724
1	10	0.01	7014309	4859183	1.4435	X	1.4607	10.5070
2		0.01	7102209	5016197	1.4159	DS	0.0555	10.3057
3		0.01	7501546	4926094	1.5228	CV	3.8009	11.0842
1	40	0.04	26981644	5021298	5.3734	X	5.6160	39.1119
2		0.04	27472133	4773563	5.7551	DS	0.2108	41.8896
3		0.04	28196148	4929932	5.7194	CV	3.7533	41.6299
1	80	0.08	50533554	4848509	10.4225	X	10.9043	75.8627
2		0.08	53922154	4815614	11.1974	DS	0.4205	81.5027
3		0.08	55622248	5014148	11.0931	CV	3.8563	80.7436
1	100	0.1	65472649	4843303	13.5182	X	13.6980	98.3954
2		0.1	67655886	4840688	13.9765	DS	0.2446	101.7314
3		0.1	71698100	5272177	13.5993	CV	1.7855	98.9861
					5.5108	X̄		40.1118
					5.3147	S		38.6841
					96.4408	%CV		96.4408

8.11 Linealidad del método analítico

A las respuestas relativas también se les calculó el promedio, el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m), y la ordenada al origen (b). Para corroborar que la pendiente y la ordenada al origen cumplen con los criterios de aceptación, se calcularon los intervalos de confianza (IC) para cada parámetro. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8. Cálculos para la linealidad del método.

TABLA 8. CÁLCULOS PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO			
m [b1']	131.4388		
b [b0]	0.4482		
r²	0.9930		
Sx/y	0.4585		
gl	16		
N	18		
α	0.05		
x	5.5108		
Σx	99.1945		
Σx²	1026.8187		
Ttab (0.975, n-2)	2.1199	2.1098	Ttab (0.975, n-1)
Sb1'	0.0209		
Sb0	0.1581		
IC[b1/m] Inferior	131.3945	131.4831	IC[b1/m] Superior
IC[b0/b] Inferior	0.1132	0.7832	IC[b0/b] Superior
CVx/y	8.3209		
X % Recobro	40.1118		
%CV %Recobro	96.4408		
IC [X%recobro) Inferior	20.8746	59.3489	IC [X%recobro) Superior

Al demostrar que la pendiente es diferente a 0, la ordenada al origen es igual a 0 y que el coeficiente de correlación es ≥ 0.99 de acuerdo con la relación respuesta vs concentración, lo que indica una correlación positiva la cual demuestra que los valores de la concentración (mg/mL) y la respuesta relativa tienden a incrementar juntos. A su vez, los valores de estos criterios indican que el método analítico es lineal pues tiene la capacidad de proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del metotrexato de la muestra.

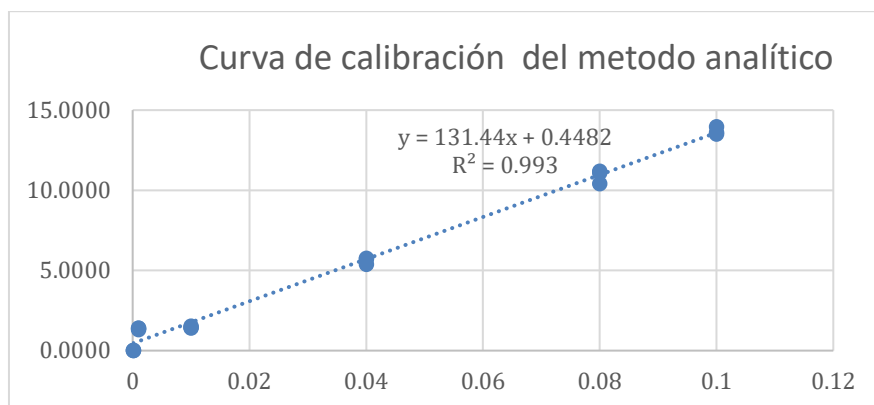


Gráfico 1. Curva de calibración del método analítico

8.12 Limite de detección

Mientras más pequeña sea la concentración de analito en la muestra existe la posibilidad de que la señal de respuesta se vea afectada por diferentes factores, como puede ser el ruido de la línea base e incluso que el analito se pierda durante el tratamiento de la muestra.

Con ayuda de la curva de calibración se logró observar como el pico correspondiente a metotrexato y las áreas bajo la curva de cada nivel iban disminuyendo conforme la concentración disminuía. Visualmente, el límite de detección fue a una concentración de 0.0001 mg/mL de metotrexato, pues fue el nivel más bajo de la curva de calibración donde se consiguió observar una respuesta conforme al cromatograma.

Sin embargo, se estableció el límite de detección de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3.3(S_{XY})}{m}$$

Donde:

LD = Limite de detección.

S_{XY} = Desviación estándar de la regresión.

m = Pendiente de la curva de concentración vs respuesta.

Se sustituyo en la fórmula los datos calculados en la Tabla_. Resultados de la curva de calibración del método analítico:

$$LD = \frac{3.3(0.4585)}{131.43} = 0.0115 \text{ mg/mL}$$

El valor para el límite de detección calculado fue de 0.0115 mg/mL, lo que indicó que el metotrexato puede ser detectado de manera eficiente a un nivel del 10% analizado en la curva de calibración. De acuerdo con la teoría esta es la menor concentración en la cual se puede detectar el analito, pero no necesariamente se puede cuantificar.

8.13 Limite de cuantificación

Para conocer la menor concentración a la cual se puede cuantificar el analito, teniendo determinaciones confiables se realizó el cálculo del límite de cuantificación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10(S_{XY})}{m}$$

Donde:

LC = Limite de cuantificación.

S_{XY} = Desviación estándar de la regresión

m = Pendiente de la curva de concentración vs respuesta.

Los valores calculados en la Tabla_. Resultados de la curva de calibración del método analítico se sustituyeron en la ecuación:

$$LC = \frac{10(0.4585)}{131.43} = 0.0348 \text{ mg/mL}$$

El valor para el límite de cuantificación fue de 0.0348 mg/mL, lo que indico que el metotrexato puede ser cuantificado entre el nivel 10 % y 40% analizado en la curva de calibración del método analítico.

8.14 Condiciones de lavado de la columna del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Una vez efectuados los análisis anteriores, fue necesario realizar la limpieza de la columna para mantenerla en buenas condiciones, por lo que se establecieron los siguientes parámetros de lavado.

- Velocidad de flujo: 0.70
- Volumen de inyección: 20 μ L.
- Tiempo de corrida: 45 min.
- Longitud de onda: 302 nm.

TABLA 9. PROPORCIONES DE LAS LÍNEAS PARA LLEVAR A CABO EL LAVADO.			
Tiempo (min)	FASE MÓVIL	ACETONITRILO	AGUA
0	0	10	90
10	0	10	90
11	0	30	70
21	0	30	70
22	0	50	50
32	0	50	50
33	0	70	30
45	0	70	30

8.15 Perfil Analítico Objetivo

De acuerdo con la guía ICH Q14 Desarrollo de métodos analíticos, durante el desarrollo de un método analítico se debe de realizar un Perfil Analítico Objetivo (PAO) para derivar los atributos del método analítico y los criterios de aceptación apropiados para la validación. Este perfil debe de incluir la definición del analito, la descripción de la matriz analítica, el rango de concentración para el método y la exactitud y precisión aceptable para el valor reportado.

Cumpliendo con lo establecido en la guía, se propuso el siguiente Perfil Analítico Objetivo:

TABLA 10. PERFIL ANALITICO OBJETIVO PARA EL DESARROLLO DEL METODO ANALITICO	
Finalidad prevista	Cuantificación de metotrexato solución inyectable en plasma o suero por cromatografía de líquidos de alta resolución.
Enlace a CQA	El método analítico debe ser capaz de cuantificar la concentración de metotrexato dentro de un rango de 0.5% al 100% (de 0.0001 mg/mL a 0.1 mg/mL) en presencia de plasma o suero con una exactitud del 100% ± 15% y una precisión ≤ 15% para el valor reportable.

Una vez establecido el PAO, la Guía ICH Q14 indica que durante el desarrollo de un método analítico se debe de realizar una gestión de riesgos.

8.16 Gestión de riesgos

Con la finalidad de obtener un método analítico que diera resultados confiables, se realizó un diagrama de Ishikawa y después una gestión de riesgos para reducir el riesgo de un desempeño deficiente y de obtener resultados incorrectos.

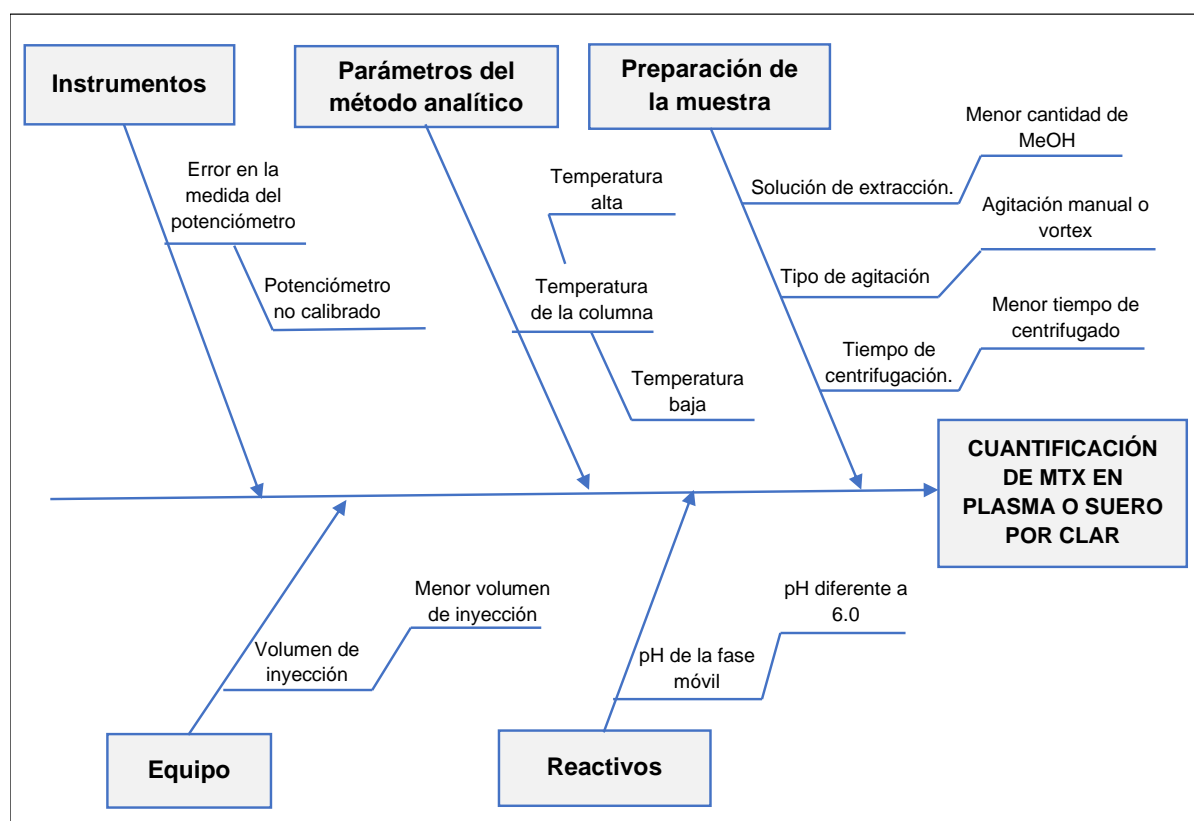


Figura 31. Diagrama de Ishikawa del método analítico para la cuantificación de Metotrexato en plasma o suero por CLAR.

Con el diagrama de Ishikawa se identificaron y priorizaron los parámetros del método analítico que pudieron tener un impacto potencial en el rendimiento de este y se realizó la gestión de riesgos.

TABLA 11. GESTIÓN DE RIESGOS DEL METODO ANALITICO

	Descripción	Escenario de riesgo	Efecto-Daño (Efecto de falla)	Evaluación de riesgo					Control actual	Acción de contención	Control para implementar	
				Probabilidad	Severidad	Clase de riesgo	Detectabilidad	Prioridad			Acción correctiva	Acción preventiva
Parámetros del método	Temperatura de la columna	Temperaturas mayores a 25°.	Disminución del tiempo de retención lo que puede provocar picos empalmados.	Baja	Alta	2	Alta	Baja	Temperatura fijada en el método analítico creado en el equipo.	Incluir en el espacio de diseño.	En la evaluación del espacio de diseño, examinar un rango de temperatura operable en el método analítico.	NA
Equipo	Volumen de inyección bajo.	Inyectar volúmenes menores a 50 µL.	No se podría detectar la respuesta del analito en el cromatograma.	Media	Alta	3	Alta	Media	Volumen de inyección fijado en el método creado en el equipo.	NA.	De acuerdo con los resultados obtenidos, no se recomienda bajar el volumen de inyección ya que en concentraciones muy bajas del analito no sería posible visualizar el pico en el cromatograma, por lo que se recomienda verificar siempre que el volumen de inyección corresponda con lo indicada en el método analítico	
Preparación de la muestra	La solución de extracción se realiza con menos metanol y más ácido tricloroacético.	Incompleta precipitación de las proteínas	Deficiente precipitación de proteínas, lo que puede provocar respuestas que interfieran con los analitos principales.	Baja	Alta	2	Media	Media	No hay	Incluir en el espacio de diseño.	Evaluar un rango de porcentaje de ácido tricloroacético útil para el método analítico en la evaluación del espacio de diseño.	NA
				Baja	Alta	2	Media	Media	No hay			
	Agitación manual.	No se mezclan en su totalidad todos los componentes para llevar a cabo la extracción del analito y la precipitación de proteínas.	Deficiente precipitación de proteínas, lo que puede provocar respuestas que interfieran con los analitos principales y baja cuantificación del analito de interés.	Baja	Alta	2	Media	Media	Uso de cronometro y se mide el tiempo de la agitación de acuerdo con la metodología desarrollada	Incluir en el espacio de diseño	Evaluar en el espacio de diseño si la agitación manual permite una buena precipitación de proteínas y cuantificación del analito.	Uso de cronómetros calibrados
	Menor tiempo de centrifugado.	Botones de proteínas más pequeños y menos sólidos.		Baja	Alta	2	Media	Media	De acuerdo con los resultados obtenidos se tiene que centrifugar durante 10 minutos.	NA.	NA	Checar siempre que el tiempo marcado en la centrifuga sea el indicado en el método analítico.
Reactivos	pH diferente a 6.0 en la fase acuosa.	Diferente tiempo de retención para el analito y el estándar interno.	Picos con interferencia provocando mala cuantificación del analito.	Alta	Alta	1	Alta	Media	Calibración y limpieza del potenciómetro o antes de la medición de pH.	NA	Evaluar un rango de pH en la región operable del método analítico en la evaluación del espacio de diseño.	Mantener la limpieza y calibración del potenciómetro antes de la medición de pH.

Conforme a la gestión de riesgos se determinó que los parámetros que podrían afectar el rendimiento del método analítico era la temperatura de la columna, el % de metanol en la solución de extracción, el tipo de agitación y el pH de la fase acuosa.

8.17 Diseño se experimentos

De acuerdo con la guía ICH Q14, a través de un enfoque mejorado se puede garantizar la calidad de un método analítico, esto se puede cumplir a través de la calidad por diseño. El diseño de experimentos (DoE) es una parte fundamental para lograr un método analítico sólido y eficiente.

Recapitulando, por medio del diagrama de Ishikawa se empezaron a proponer cuales serían los parámetros que afectarían el desempeño del método, posteriormente, con la gestión de riesgos se plantearon los factores de diseño que se podrían variar y que tendrían efecto sobre el PAO del método analítico.

Una vez que se estableció lo anterior se seleccionó un diseño experimental que fuera apropiado y que suministrara información valida y precisa. Se propuso realizar un diseño experimental de Plackett-Burman para detectar factores importantes que impactarían en los resultados del proceso y que podrían afectar directamente en la calidad del desempeño del método analítico.

El diseño se llevó a cabo en el software Minitab 19, se utilizaron los 4 factores que se plantearon en la gestión de riesgos, dando 12 corridas base, cada una con 3 réplicas, originando un total de 36 corridas. Para analizar los resultados se utilizaron los parámetros de % recobro y resolución. Todas las posibles combinaciones se realizaron de modo aleatorio.

Diseño de Plackett-Burman			
Resumen del diseño			
Factores:	4	Réplicas:	3
Corridas base:	12	Total de corridas:	36
Bloques base:	1	Total de bloques:	1

Figura 32. Resumen del diseño de Plackett-Burman realizado en Minitab 19.

TABLA 12. TOTAL DE CORRIDAS EN ORDEN ALEATORIO GENERADAS POR EL SOFTWARE MINITAB 19.

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	Temp. columna	% sol. extracción	Forma de agitación	pH fase acuosa	%R	Resolución
16	1	1	1	30	90	Vortex	6.1	94.42	5.85
28	2	1	1	30	90	Vortex	6.1	94.57	7.22
24	3	1	1	20	90	Manual	5.9	80.68	8.56
29	4	1	1	30	95	Manual	6.1	93.01	4.81
14	5	1	1	30	95	Manual	6.1	92.49	4.93
9	6	1	1	20	90	Manual	6.1	87.26	8.18
21	7	1	1	20	90	Manual	6.1	90.5	8.33
27	8	1	1	20	95	Vortex	5.9	87.23	7.82
33	9	1	1	20	90	Manual	6.1	89.09	8.15
32	10	1	1	20	90	Vortex	6.1	90.41	8.39
12	11	1	1	20	90	Manual	5.9	81.57	8.48
26	12	1	1	30	95	Manual	6.1	95.24	5.05
35	13	1	1	20	95	Manual	5.9	81.94	8.55
22	14	1	1	30	90	Manual	5.9	80.71	9.05
13	15	1	1	30	90	Vortex	5.9	84.89	9.15
23	16	1	1	20	95	Manual	5.9	84.66	7.73
34	17	1	1	30	90	Manual	5.9	83.66	9.13
18	18	1	1	30	95	Vortex	5.9	83.5	9.13
7	19	1	1	20	95	Vortex	6.1	87.95	6.96
11	20	1	1	20	95	Manual	5.9	88.02	7.51
8	21	1	1	20	90	Vortex	6.1	91.38	6.73
30	22	1	1	30	95	Vortex	5.9	86.8	9.24
17	23	1	1	30	95	Manual	6.1	92.11	4.34
31	24	1	1	20	95	Vortex	6.1	92.48	7.09
2	25	1	1	30	95	Manual	6.1	97.13	4.28
36	26	1	1	20	90	Manual	5.9	81.74	8.55
5	27	1	1	30	95	Manual	6.1	95.8	4.28
4	28	1	1	30	90	Vortex	6.1	95.3	6.56
25	29	1	1	30	90	Vortex	5.9	82.44	9.27
15	30	1	1	20	95	Vortex	5.9	87.52	7.64
1	31	1	1	30	90	Vortex	5.9	84.83	9.29
19	32	1	1	20	95	Vortex	6.1	87.95	6.96
6	33	1	1	30	95	Vortex	5.9	84.88	9.32
10	34	1	1	30	90	Manual	5.9	83.49	9.24
3	35	1	1	20	95	Vortex	5.9	87.99	7.71
20	36	1	1	20	90	Vortex	6.1	90.21	8.25

El diseño se dividió en dos partes, La primera parte se efectuó en un día y se realizaron todas las muestras que utilizaban fase acuosa con pH 5.9 y en un segundo día se realizaron las muestras que necesitaban fase acuosa con pH 6.1. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

TABLA 13. ADECUABILIDAD CON FASE ACUOSA pH 5.9			
Inyección	ABC MTX	ABC MTZ	R.R
1	63586696	4630342	13.7326
2	63600593	4636529	13.7173
3	63637976	4645327	13.6994
4	63759458	4632885	13.7624
5	63637257	4629160	13.7470
6	63814524	4633268	13.7731
		Promedio	13.7386

TABLA 14. RESULTADOS DEL DoE PARA LAS MUESTRAS CON FASE ACUOSA pH 5.9								
Temp. Columna	% Metanol	Agitación	pH fase acuosa	ABC MTX	ABC MTZ	R.R	%R	Resolución
20	90	Manual	5.9	55537247	5010505	11.0842	80.6788	8.56
20	90	Manual	5.9	53409741	4766200	11.2059	81.5652	8.48
20	90	Manual	5.9	54564809	4846974	11.2575	81.9405	8.55
20	95	Manual	5.9	60560568	5206935	11.6308	84.6573	7.73
20	95	Manual	5.9	60038900	4964812	12.0929	88.0210	7.51
20	95	Manual	5.9	58415969	4978807	11.7329	85.4010	7.78
20	95	Vortex	5.9	61284903	5113974	11.9838	87.2271	7.82
20	95	Vortex	5.9	59140828	4918451	12.0243	87.5217	7.64
20	95	Vortex	5.9	59417064	4914895	12.0892	87.9941	7.71
30	90	Manual	5.9	53782565	4850026	11.0891	80.7150	9.05
30	90	Manual	5.9	54835943	4770732	11.4942	83.6637	9.13
30	90	Manual	5.9	54764287	4774357	11.4705	83.4909	9.24
30	90	Vortex	5.9	54505835	4673572	11.6626	84.8889	9.15
30	90	Vortex	5.9	55258328	4878621	11.3266	82.4437	9.27
30	90	Vortex	5.9	54310195	4660134	11.6542	84.8281	9.29
30	95	Vortex	5.9	53602631	4672581	11.4717	83.4999	9.13
30	95	Vortex	5.9	54607470	4579335	11.9248	86.7973	9.24
30	95	Vortex	5.9	53411336	4580279	11.6612	84.8786	9.32
						Promedio	84.4563	

TABLA 15. ADECUABILIDAD CON FASE ACUOSA pH 6.1			
Inyección	ABC MTX	ABC MTZ	R.R
1	73015983	4636157	15.7492
2	73051332	4623058	15.8015
3	72987304	4632888	15.7542
4	73142615	4642281	15.7557
5	72944611	4632256	15.7471
6	72632033	4623714	15.7086
		Promedio	15.7527

TABLA 16. RESULTADOS DEL DoE PARA LAS MUESTRAS CON FASE ACUOSA pH 6.1								
Temp. Columna	% Metanol	Agitación	pH fase acuosa	ABC MTX	ABC MTZ	R.R	%R	Resolución
20	90	Manual	6.1	68646299	4994142	13.7454	87.2570	8.18
20	90	Manual	6.1	69275475	4859366	14.2561	90.4991	8.33
20	90	Manual	6.1	66432165	4733757	14.0337	89.0875	8.15
20	90	Vortex	6.1	65865159	4624617	14.2423	90.4116	8.39
20	90	Vortex	6.1	67159458	4715177	14.2433	90.4177	8.26
20	90	Vortex	6.1	66173281	4656610	14.2106	90.2105	8.25
20	95	Vortex	6.1	68951348	4976971	13.8541	87.9472	6.96
20	95	Vortex	6.1	71073222	4937389	14.3949	91.3804	6.73
20	95	Vortex	6.1	69168497	4747896	14.5682	92.4807	7.09
30	90	Vortex	6.1	69845715	4695902	14.8738	94.4202	5.85
30	90	Vortex	6.1	71505475	4799706	14.8979	94.5734	7.22
30	90	Vortex	6.1	70576800	4701090	15.0129	95.3032	6.56
30	95	Manual	6.1	72389718	4940560	14.6521	93.0133	4.81
30	95	Manual	6.1	70739885	4855108	14.5702	92.4932	4.93
30	95	Manual	6.1	72039632	4801711	15.0029	95.2401	5.05
30	95	Manual	6.1	72424959	4991374	14.5100	92.1112	4.34
30	95	Manual	6.1	72320157	4726509	15.3010	97.1322	4.28
30	95	Manual	6.1	71438847	4733883	15.0910	95.7990	4.28
						Promedio	92.2098	

Para las muestras analizadas con fase acuosa pH 5.9, el %R que se obtuvo fue bajo y no cumplió con la especificación del PAO. En el caso de la fase acuosa pH 6.1 se obtuvo un %R mayor y aunque cumplió con la especificación del PAO, los cromatogramas obtenidos mostraron picos asimétricos y deformados.

El cambio de los parámetros analizados no afectó la resolución de los picos, pues se pudieron observar picos separados, sin embargo, en todas las muestras analizadas estos no fueron simétricos y definidos.

En el caso de la temperatura, los tiempos de retención cambiaron un poco en ambos casos. Para el % de metanol en la solución de extracción, se pudo observar durante la preparación de la muestra que la proporción metanol 95:5 ácido tricloroacético permitía una extracción más eficiente en comparación con la proporción metanol 90:10 ácido tricloroacético, pues después del centrifugado, el sobrenadante de las muestras era más traslucido y el botón de proteínas precipitado era más grande y sólido, a pesar de eso, los picos del cromatograma presentaban interferencia.

El cambio de pH afectó el estado de ionización del analito convirtiendo a la molécula de metotrexato más polar, haciendo que el analito tuviera más interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria y que formara más enlaces de hidrógeno con la fase acuosa provocando una menor retención la cual se vio reflejada en los cromatogramas con picos anchos, partidos y asimétricos.

A continuación, se pueden observar algunos de los cromatogramas obtenidos durante el desarrollo del DoE:

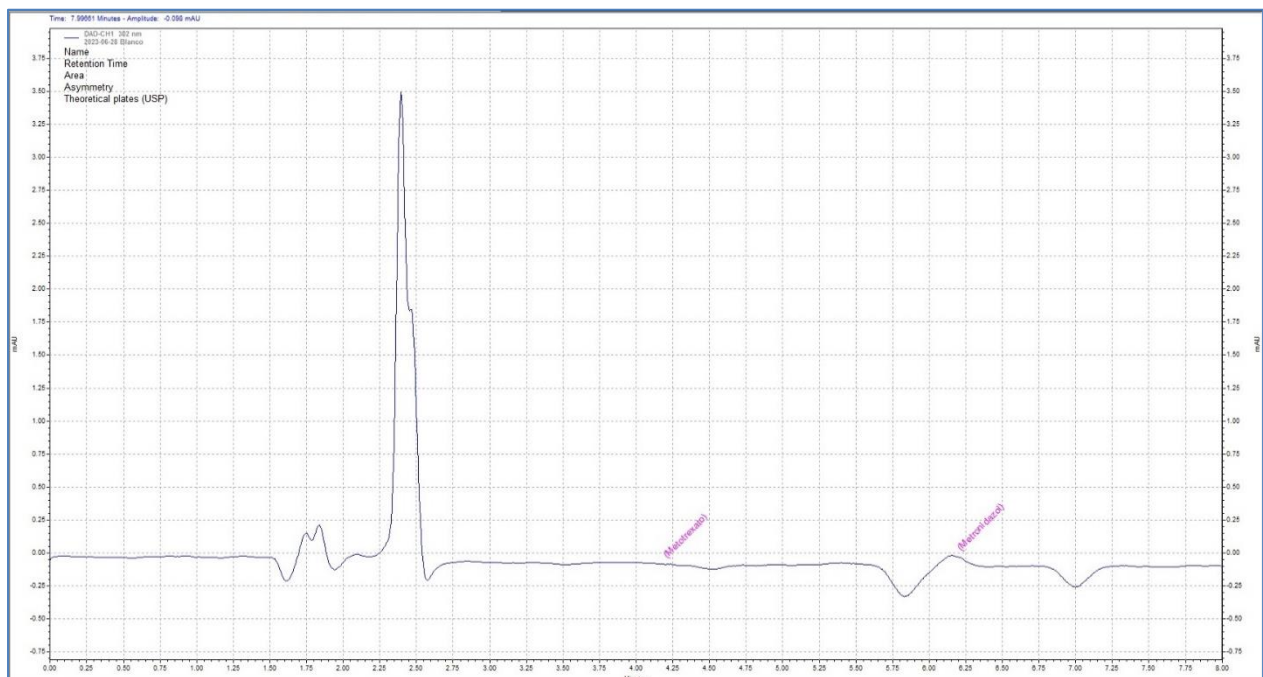


Figura 34. Cromatograma del blanco corrido con fase acuosa pH 5.9

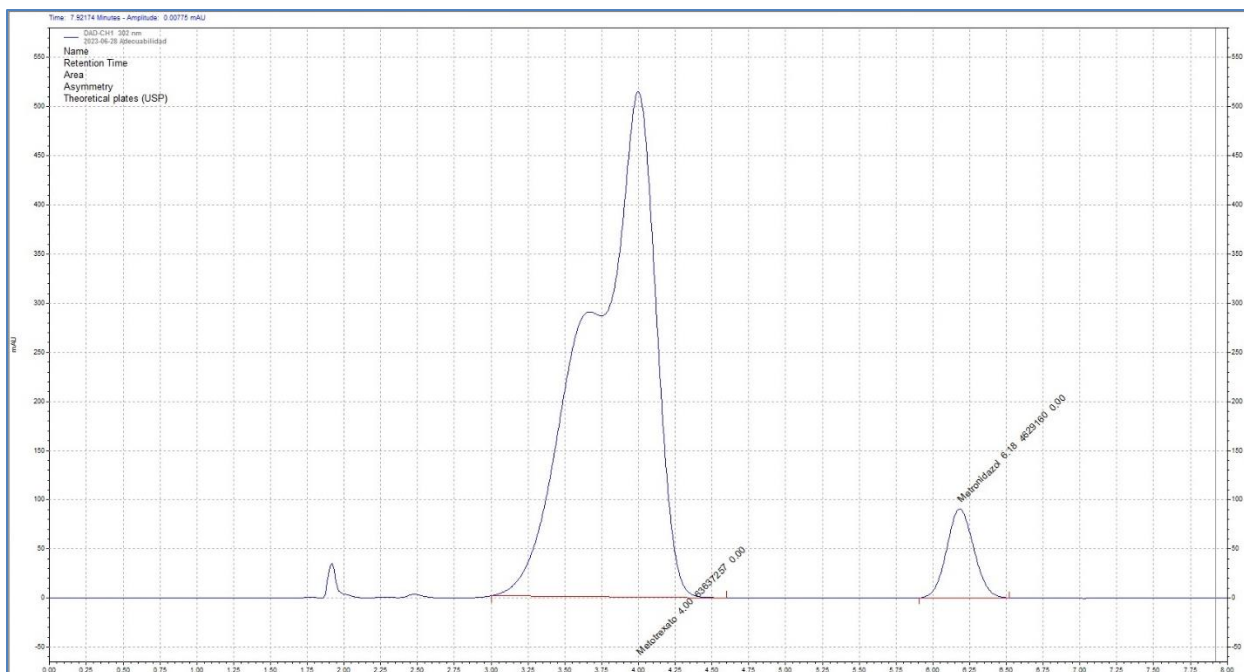


Figura 35. Cromatograma de una muestra de adecuabilidad corrida con fase acuosa pH 5.9

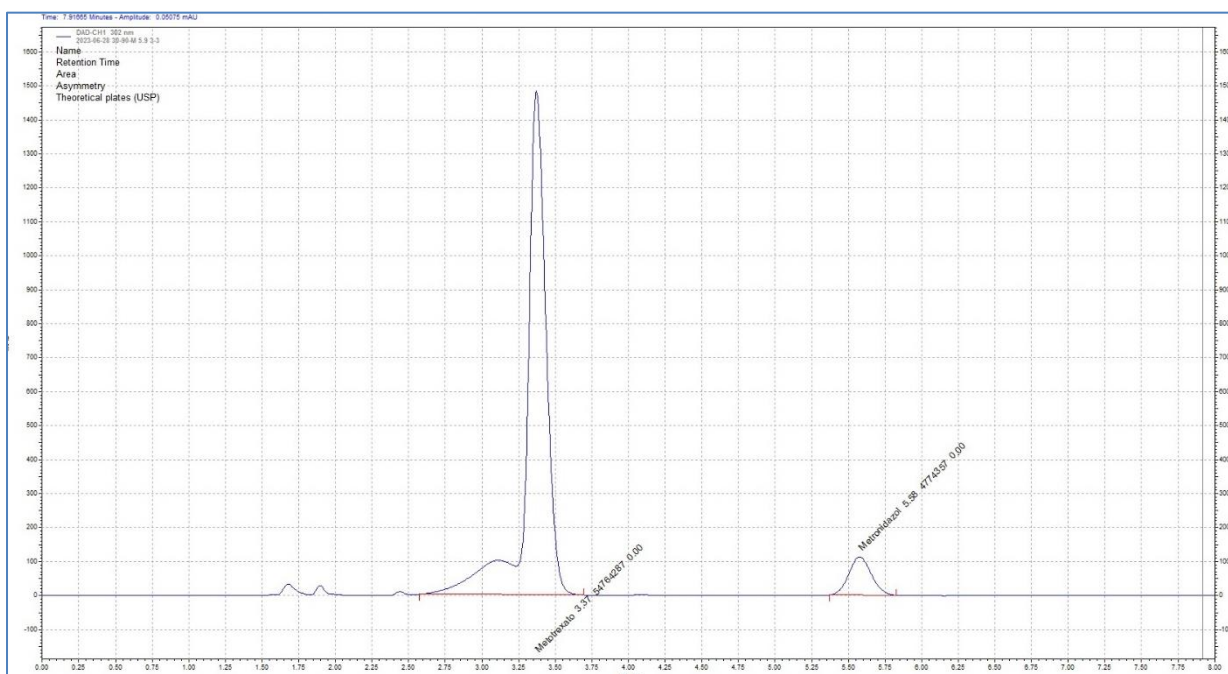


Figura 36. Cromatograma de una muestra del DoE con una temperatura en la columna de 30°C, solución de extracción metanol 90:10 ácido tricloroacético y agitación manual corrida con fase acuosa pH 5.9.

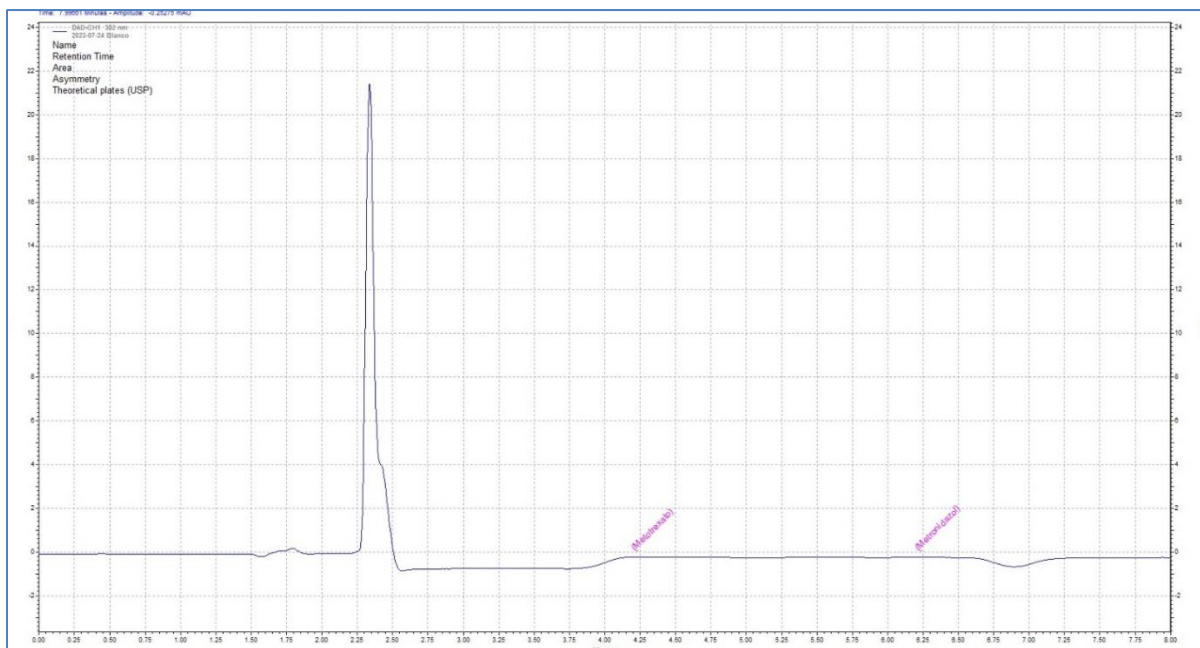


Figura 37. Cromatograma del blanco corrida con fase acuosa pH 6.1.

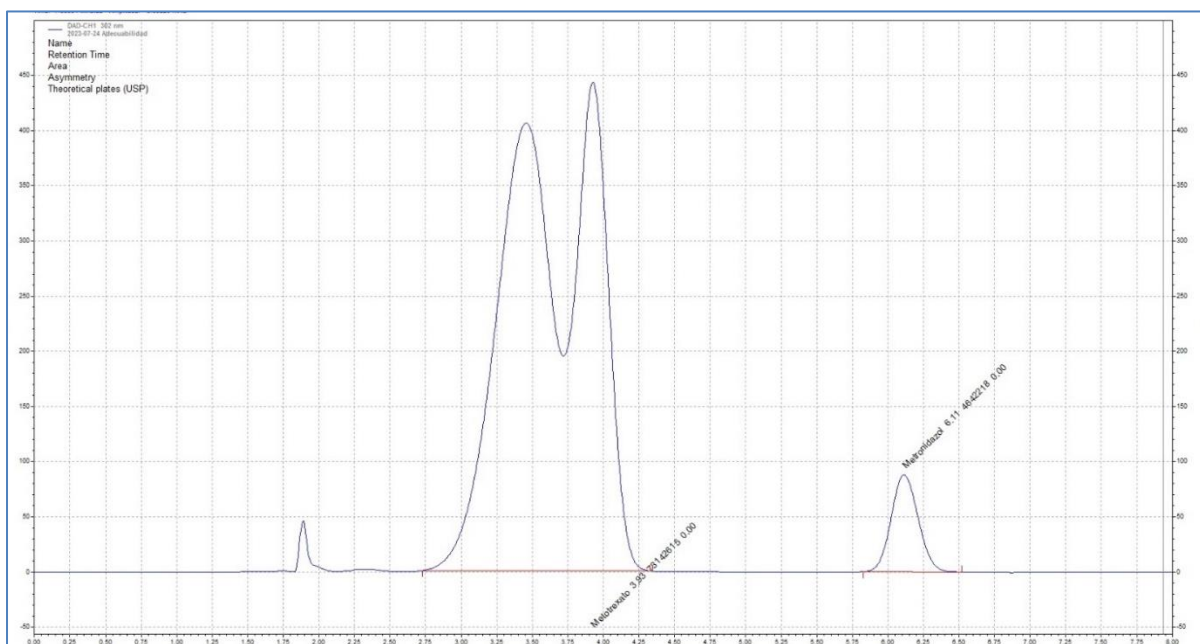


Figura 38. Cromatograma de una muestra de adecuabilidad corrida con fase acuosa pH 6.1.

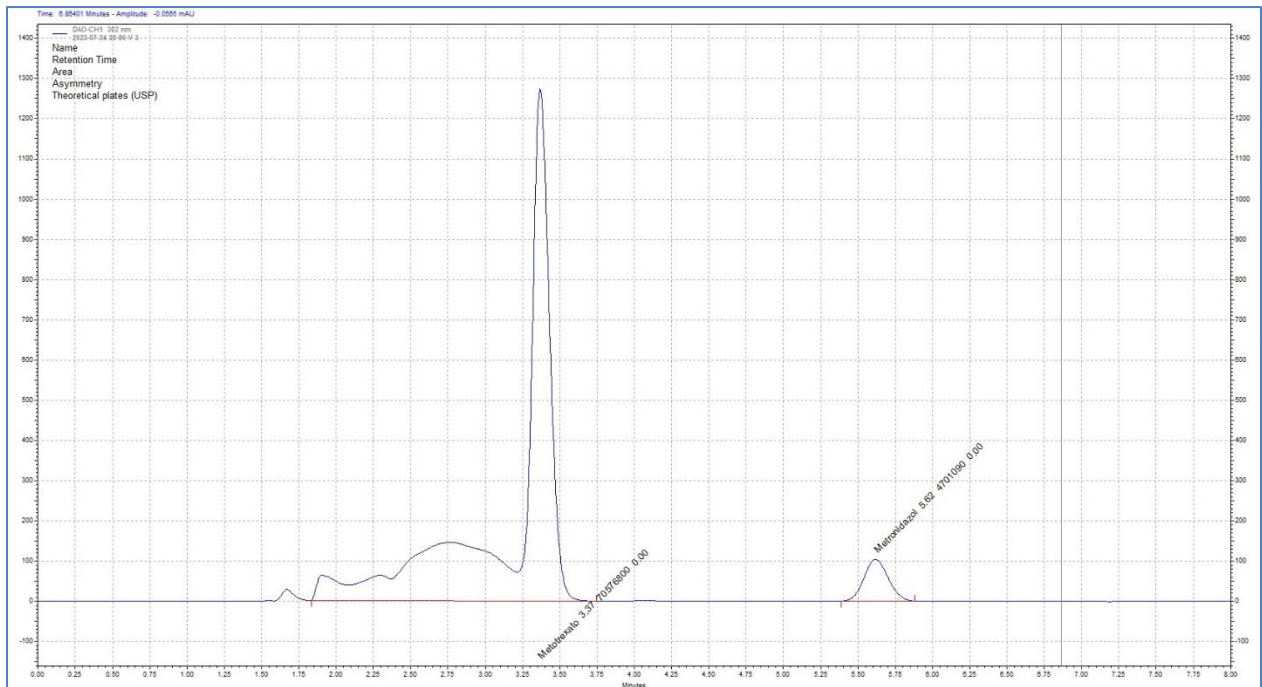


Figura 39. Cromatograma de una muestra del DoE con una temperatura en la columna de 30°C, solución de extracción metanol 90:10 ácido tricloroacético y agitación con vortex corrida con fase acuosa pH 6.1

Los resultados obtenidos en las Tabla 14. Resultados del DoE para las muestras con fase acuosa pH 5.9 Y Tabla 15. Resultados del DoE para las muestras con fase acuosa pH 6.1, fueron analizados mediante el software Minitab 19 arrojando los siguientes resultados:

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	68.326	17.0816	25.50	0.000
Lineal	4	68.326	17.0816	25.50	0.000
Temp. columna	1	3.642	3.6417	5.44	0.026
% sol. extracción	1	17.403	17.4028	25.98	0.000
Forma de agitación	1	5.010	5.0101	7.48	0.010
pH fase acuosa	1	42.272	42.2717	63.11	0.000
Error	31	20.765	0.6698		
Falta de ajuste	6	16.806	2.8009	17.69	0.000
Error puro	25	3.959	0.1584		
Total	35	89.091			

Figura 40. Análisis de varianza de los resultados del DoE calculado en el software Minitab 19.

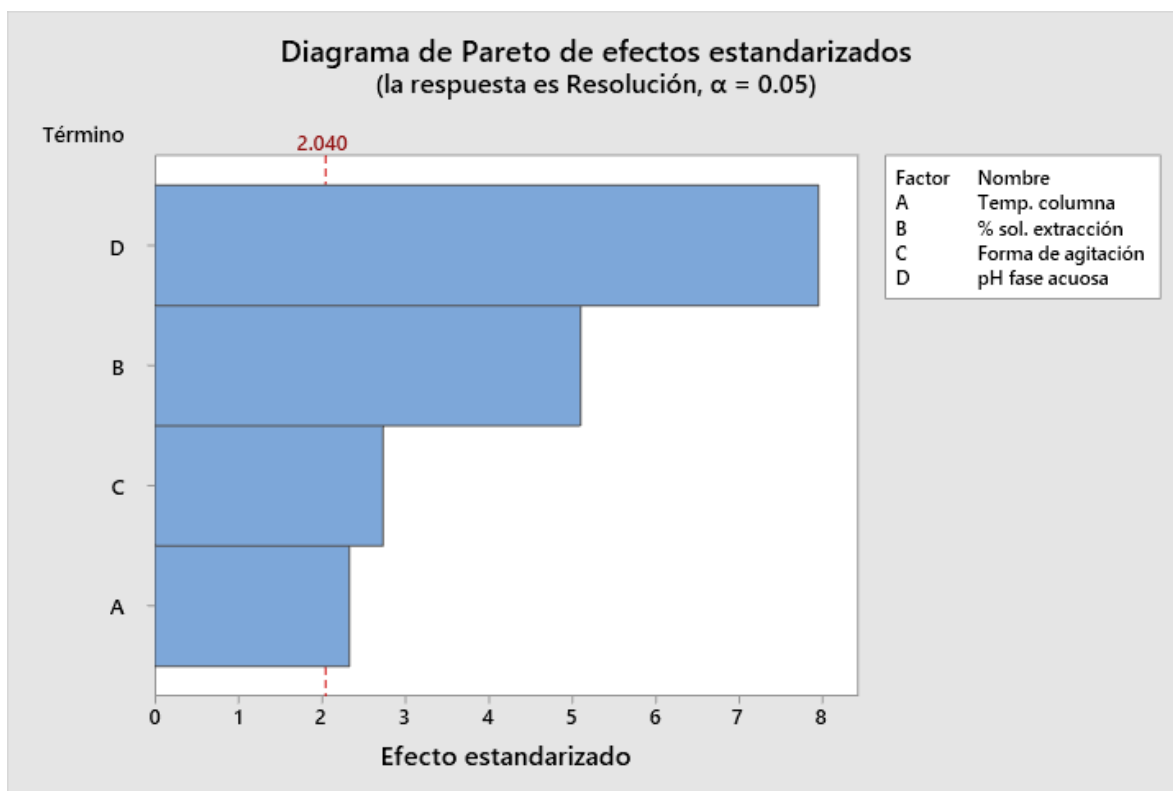


Figura 41. Diagrama de Pareto de los resultados del DoE analizado en Minitab 19.

De acuerdo con el análisis de varianza y el diagrama de Pareto el valor de p debe de ser mayor a $\alpha=0.05$ para que no sea un efecto significativo. En este caso, en el análisis de varianza, todos los valores p fueron menores a $\alpha=0.05$ lo que determino que todos los factores afectan el desempeño del método analítico. Mediante el diagrama de Pareto se pudo observar que los factores estuvieron por delante del factor crítico que fue de 2.040 siendo el más significativo el pH de la fase acuosa.

A través del análisis anterior se pudo concluir que el método no es robusto pues los resultados obtenidos demostraron que cuando se realizaron ciertos cambios se provocaron resultados analíticos imprecisos, por lo que es necesario que el método se aplique en las condiciones con las que se desarrolló.

8.18 Análisis de muestras reales

Finalmente, se puso a prueba el método analítico analizando muestras de un paciente pediátrico con tratamiento con metotrexato. La dosis administrada para 24 horas fue de 3550 mg, posteriormente, se administró un bolo de 800 mg para una hora y después 2750 mg en 5 cargas por 6 horas cada una. Las muestras analizadas fueron tomadas a las 20, 40 y 64 horas después de la administración del medicamento.

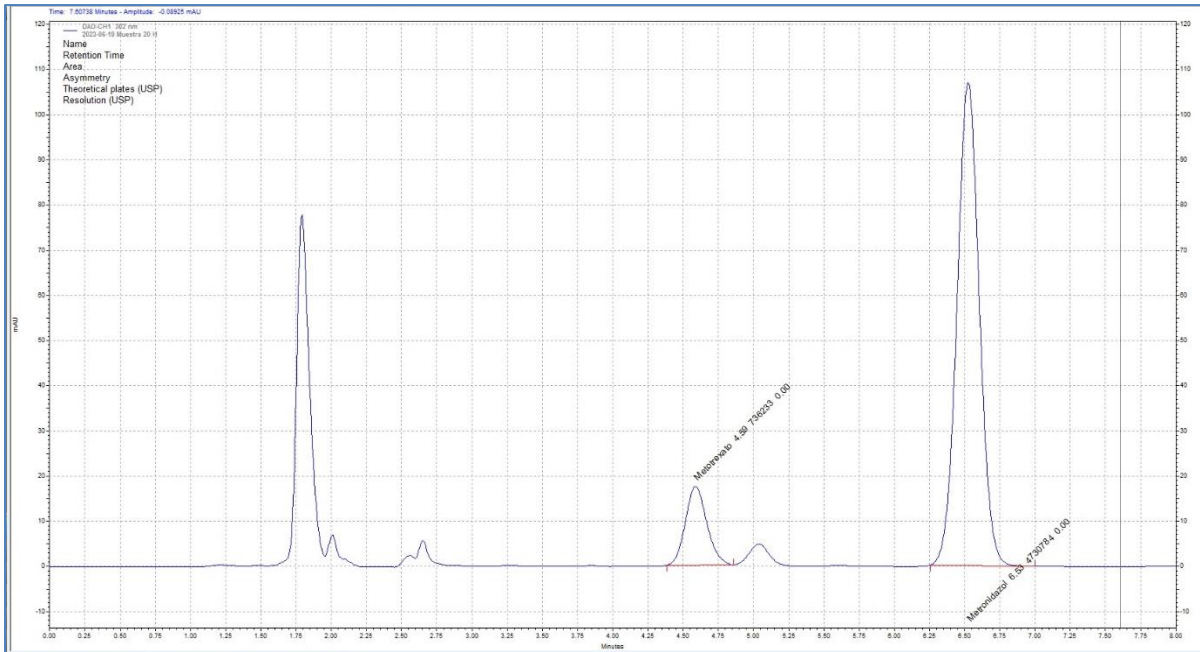


Figura 42. Cromatograma de muestra tomada a las 20 horas después de la administración del medicamento.

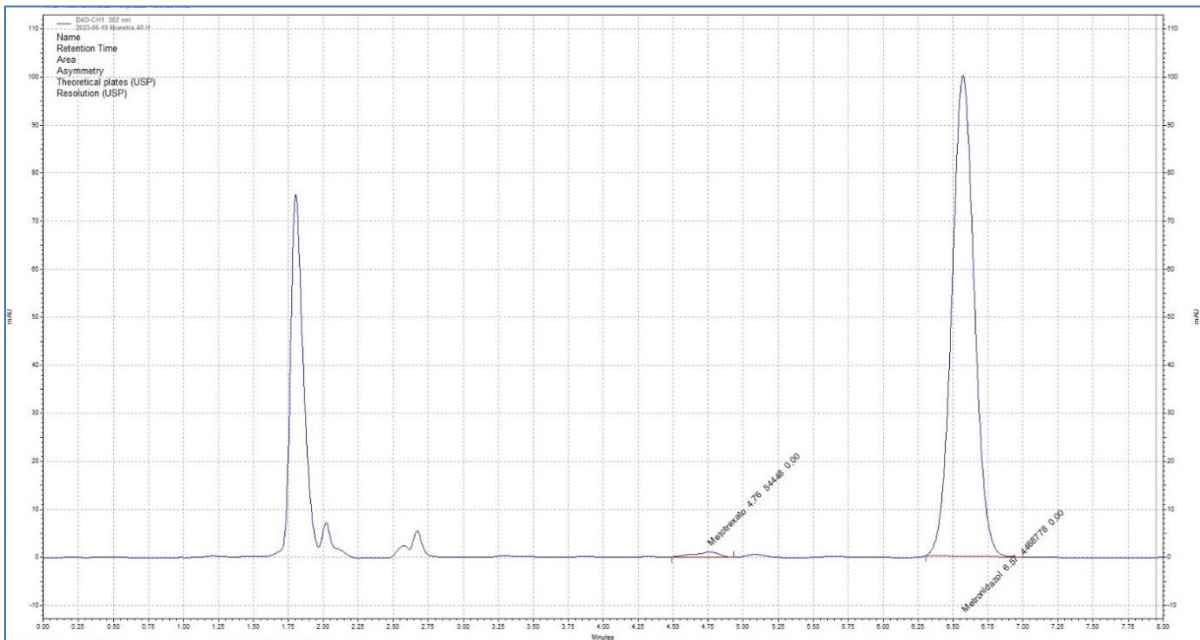


Figura 43. Cromatograma de muestra tomada a las 40 horas después de la administración del medicamento.

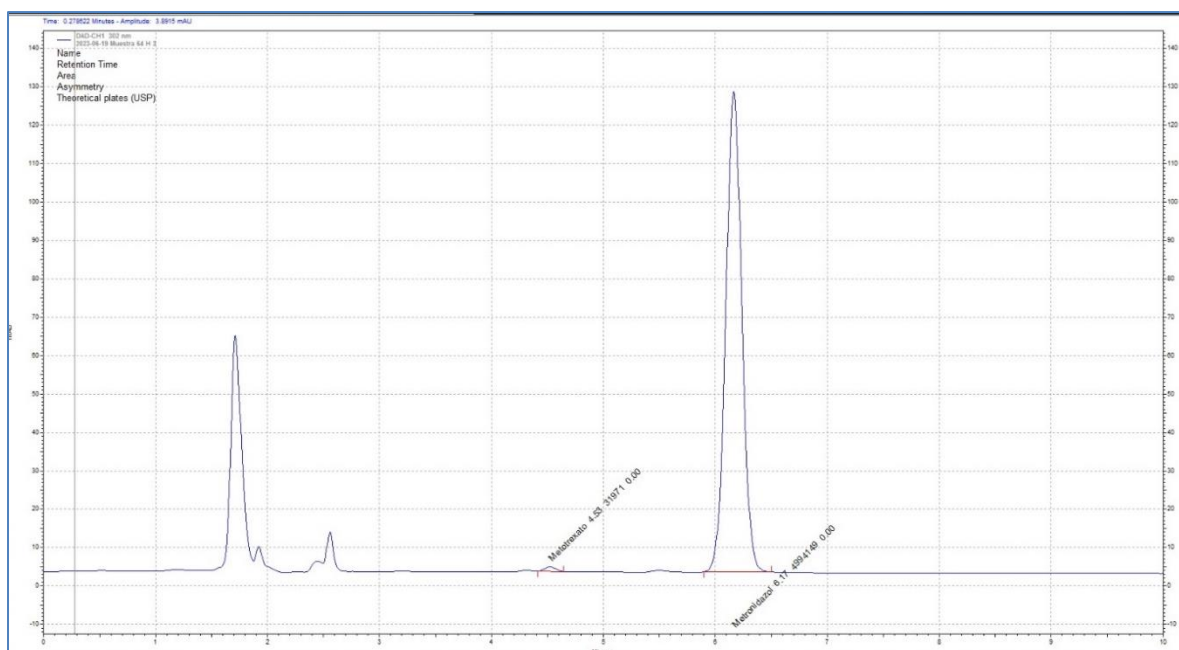


Figura 44. Cromatograma de muestra tomada a las 64 horas después de la administración del medicamento.

TABLA 17. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS REALES				
Hora de la toma de muestra	ABC MTX	ABC MTZ	R.R	Conc. Real [mg/mL]
20 H	736233	4730748	0.155627186	-0.0022
40 H	54448	4468778	0.012184091	-0.0033
64 H	31971	4994149	0.006401691	-0.0033

Con ayuda de la curva de calibración del método analítico y la ecuación de la recta presentada en el *Grafico 1*. Curva de calibración del método analítico, se despejó “x” para conocer el valor de la concentración real de cada muestra. Los valores negativos dieron a conocer que los niveles de concentración obtenidos no se encontraban dentro de la curva de calibración que se realizó para el método, pues la presencia de metotrexato en las muestras era aún más baja, sin embargo, se pudo observar el analito mediante los cromatogramas conseguidos donde se obtuvieron picos definidos y simétricos, con lo que se concluye que el método analítico desarrollado se desempeña eficazmente.

Adicionalmente, se observó la presencia de otra respuesta cercana a metotrexato, la cual cumple con la resolución mínima necesaria, este se piensa que puede ser un metabolito de la asimilación del metotrexato por el paciente, sin embargo, no afectó en el análisis del estudio final.

8.19 Conclusiones

Se concluye que el método es eficiente, pues cumple con el PAO establecido y tiene un buen rendimiento. Se sugiere mantener las condiciones en las que se desarrolló, puesto que, los cambios probados en el espacio de diseño afectarían la recuperación del analito en las muestras. Se recomienda llevar a cabo la validación completa de este método.

9. REFERENCIAS

1. Goicoechea C. Farmacología del metotrexato. *Reumatología clínica*. Noviembre 2016; 11(1): 7-3. Disponible en: <https://www.reumatologiaclinica.org/index.php?p=revista&tipo=pdf-simple&pii=X1699258X16545643&r=273>
2. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [Internet]. México: COFEPRIS; 2019 [Citado 29 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cofepris/prensa/fabricantes-e-importadores-del-medicamento-metotrexato-para-tratamiento-de-cancer-cuentan-con-registros-o-permisos-sanitarios-vigentes?idiom=es>
3. DrugFuture [Internet]. República Popular China: Chemical Index Database; 2006 [2022; citado 16 junio de 2022]. Disponible en: <https://www.drugfuture.com/chemdata/Methotrexate.html>
4. ChemicalBook [Internet]. Product catalog; 2006 [2017; citado 16 junio de 2022]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126941>
5. DrugFuture. Martindale: The Complete Drug Reference [Internet]. 40 ed. Pharmaceutical Press, 2006. [Citado el 16 junio de 2022]. Disponible en: <https://www.drugfuture.com/mt/search.aspx>
6. Moreno V, Martínez J, Kravzov J, Pérez L, Moreno C, Altagracia M. Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* [Internet]. 2013 [Citado el 16 junio de 2022]; 44 (4): pp.17-29. Disponible en: ISSN 1870-0195.
7. Torregiani L, Soledad Y, Mercedes M. Monitorización terapéutica de metotrexato en pacientes leucémicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Desarrollo, validación y aplicación clínica del método analítico. *Revista del Laboratorio Clínico* [Internet]. 2017 [Citado el 17 junio del 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.09.007>
8. Ficha de medicamento: Methoxetate [Internet]. ClinicalKey: ELSEVIER; diciembre 2020 [Citado el 17 de junio del 2022]. Disponible en: https://www.clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/drug_monograph/6-s2.0-385?scrollTo=%23References
9. Chan E, Cronstein B. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* [Internet]. Marzo 2002 [Citado el 17 de junio del 2022]; 4 (4): 266-73. Disponible en: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar419>
10. Inoue K, Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2014 [Citado el 13 de julio del 2022]; 29(1): 12-9. Diposnible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RV-119>
11. Castro R, Escudero A, Calvo J, Castro M, Collantes E. Optima utilización del metotrexato. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba [Internet]. Marzo 2013 [Citado el 13 de julio del 2022]; 14(1): 24-27. Disponible en: DOI: 10.1016/j.semreu.2013.01.004

12. Ortega R, Escudero A, Calvo J, Castro M, Collantes E. The best use of Methotrexate. *Seminars of The Spanish Foundation of Rheumatology* [Internet]. March 2013 [Citado el 18 Junio del 2022];14 (1): 24-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semreu.2013.01.004>
13. Katzung B, Kruidering-Hall M, Tuan R, Vanderah T, Trevor A. *Farmacología. Examen y revisión* [Internet]. 13 ed. MacGraw-Hill, 2013. [Citado el 21 de junio del 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.pbidi.unam.mx:2443/content.aspx?bookid=3116§ionid=265807621>
14. Shen D, Azzaord D. Clinical Pharmacokinetics of Methotrexato. *Clinical Pharmacology-Toxicology* 1978; 3:1-13.
15. Kosuri S, Church G. *Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. Nature Methods* [Internet]. 2014 [Citado el 21 de julio del 2022]; 11: 499-507. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2918#ethics>
16. Mendoza E, Torres I, González I, Hoyos J, García M, Medina E. Importancia de la sangre, hemoderivados y las donaciones voluntarias de sangre. *Rev.Med.Electrón.* [Internet]. 2020 [citado Agosto 2022] ; 42(1): 1674-1681. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168418242020000101674&lng=es
17. Moltalvo C. Tejido sanguíneo y hematopoyesis. UNAM: Departamento de biología celular y tisular. 2018 [Citado Agosto 2022]. Disponible en: <https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/Tejido-sanguineo.pdf>
18. Flamini A, Barbeito C. Sangre o tejido sanguíneo. Facultas de ciencias veterinarias de la UNLP. Buenos Aires Argentina: Capitulo 8. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/149548/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
19. Sepulveda J, Medina R. Histología. Biología celular y tisular. Instructivo de laboratorio [Internet]. 6 ed. México: McGraw Hill, 2014 [Citado agosto 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1503§ionid=99838740>
20. Biddlecombe B, Smith G. Sample preparation techniques: *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. Florida; 2004.
21. Nelson D, Cox, M. Lehninger. *Principles of Biochemistry* [bibliografía]. 5ta ed. New York: WH Freeman and Company; 2008, p. 921. ISBN: 10:0-7167-7108-X.
22. Chávez M. Temas de enzimología. Tomo II. [Bibliografía]. La Habana: ENPES, 1990, p 280.
23. Heredia Diaz Y, Machado García R, Mendoza Suarez M, Jardines Cala M, Vazquez Domínguez A. Desproteínización de muestras de suero y plasma para el estudio analítico de carbamazepina. *Revista cubana de química*. Diciembre 2016; 28 (3):870-889.

24. Quattrocchi A. O, Abelaira de A. S, Laba F. R. *Introducción al HPLC. Aplicación y práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro; 1992.
25. Snyder R, Kirkland J. Introduction to modern liquid chromatography [Internet]. 2 ed. Nueva York: Wiley Int. Publication, 1979 [Citado en noviembre 2022]. Disponible en: https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/introduction_to_modern_liquid_chromatography.pdf
26. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists [Internet]. New Jersey: Wiley; 2007. [Citado en noviembre 2022]. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=csAkMpeTocC&printsec=frontcover&hl=es&vq=%22Enhancement+of+retention+by+ionpair+formation+in+liquid+chromatography+with+nonpolar+stationary+pases,+Anal.+Chem.+49%22&source=gbs_quotes
27. Suarez Ospina D, Morales Hernández Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Revista Semilleros: Formación investigativa*. Diciembre 2018; 4 (1). Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
28. Departamento de ingeniería química de la Universidad de Alicante. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Servicios técnicos de investigación de la Universidad de Alicante. Disponible en: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
29. Corzo A. Técnicas de análisis en química orgánica: cromatografía [Internet]. Santiago del Estero: Universidad Nacional de Santiago del Estero, 2019. [Citado en noviembre 2022]. Disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>
30. PanReac AppliChem. Reactivos para cromatografía de par iónico [internet]. 2013 [Citado en noviembre 2022]. Disponible en: https://www.itwreagents.com/download_file/info_point/IP-013/es/IP013_es.pdf
31. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals Human Use. ICH Guideline Q14 on Analytical Procedure Development. European Medicines Agency: Science Medicines Health; 31 March 2022.