



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO, VALIDACIÓN Y APLICACIÓN CLÍNICA
DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
VANCOMICINA EN PLASMA POR CLAR.**

**T E S I S M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A N

ARIEL TONATIUH REYES MEDINA

ROXANA HERMOSO SOLANO

MÉXICO, D.F.

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Inés Fuentes Noriega

VOCAL: Profesor: Helgi Helen Jung Cook

SECRETARIO: Profesor: Ricardo Rodríguez Sáenz

1er. SUPLENTE: Profesor: Sofía Margarita Rodríguez Alvarado

2° SUPLENTE: Profesor: María de Lourdes Mayet Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA. FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E", UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DRA. HELGI HELEN JUNG COOK

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. LOURDES MAYET CRUZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTES: ARIEL TONATIUH REYES MEDINA

ROXANA HERMOSO SOLANO

(nombre (s) y firma (s))

Agradecimientos

Agradecimientos Roxana:

Con este trabajo expreso mi infinita gratitud a Dios, a mis padres, mis hermanos (Liliana y Juan Miguel), a mi familia postiza (Adela, Nancy, Joana P.) y amigos que me apoyaron durante esta etapa de mi vida, una de las más importantes, más difíciles y sobre todo la que más disfruté... con sacrificios, tropiezos, tristezas, triunfos, alegrías, etc. pero que al fin y al cabo bien valieron la pena ya que estoy a punto de llegar a esa meta que me planteé al ingresar a la grandiosa Facultad de Química, egresar como toda una QFB de la máxima casa de estudios... la UNAM mi *alma mater*.

Dedico el presente a mis tres Ángeles Guardianes que día a día gracias a su fortaleza y bendición pude seguir adelante. Gracias Oscar por todo el valioso apoyo incondicional que me brindaste durante una gran parte de la carrera, gracias por tu comprensión, ayuda, cariño... por todo lo que hemos compartido en este pequeño trayecto del largo camino que aún nos espera.

También quiero expresar mi gratitud a la Dra. Helgi y a Tonatiuh (Tony) por creer y confiar en mí, por permitirme ser parte del presente proyecto, por la gran enseñanza, experiencia profesional y personal que me dejó el compartir este trabajo con personas tan valiosas.

Gracias en especial a ti Pedrito Villanueva por tus sabios consejos, por tu amistad incondicional, por la confianza que en mí depositaste y por tu apoyo, no menospreciando así a todos mis compañeros y amigos del laboratorio 3D.

Gracias a mis más grandes y entrañables amigos, que compartieron conmigo infinidad de experiencias tan lindas desde hace ya un tiempo...con esto intento mostrar un poco del gran cariño que les tengo: Paty, Nadia, mi Memua, George, Bety, Briseida, Yeco, Marco, Issac, Ara, Yerania, Roberto, Kikeman, Daniel, Ángel, Bk y muchas otras personas muy especiales más que hicieron mi estancia en la fac más llevadera.

...Orgullosamente puma, orgullosamente UNAM.

Por mi raza hablará el espíritu... .. México, Pumas, Universidad!!

Agradecimientos

GRACIAS...

A Dios, por haberme permitido conseguir mis metas propuestas, por haberme dado la capacidad para alcanzar mis ideales y objetivos los cuales espero no sean estos los únicos.

A mis padres por haberme apoyado en todos los sentidos y siempre, por que gracias a su guía pude formarme, aprender y conocer acerca de muchas cosas, por que sin sus consejos probablemente hubiera desistido durante el curso de mi vida como estudiante; gracias por su ánimo, paciencia y fortaleza cada día. A ustedes especialmente les dedico el presente trabajo, que para mí significa mucho y que espero se sientan satisfechos con el autor del mismo.

A mis tíos, hermanos, abuelos y todos los miembros de mi familia no menos importantes que influyeron en gran manera sobre mi formación tanto personal como profesional, gracias por su apoyo incondicional, por su cariño y muestras de afecto en cada momento.

A la Dra. Helgi y la Mta. Lourdes; por haberme permitido colaborar con ellas durante el tiempo en que se llevó a cabo el trabajo; por haberme dado buenos y muy útiles consejos. Gracias por su tiempo y dedicación al trabajo y a sus alumnos.

A la Dra. Inés y Mto. Ricardo por brindar un poco de su tiempo a la revisión del trabajo y por sus correcciones y aclaraciones hechas para este.

A Roxana por haber hecho su mejor esfuerzo para bien de los dos, por su tiempo y dedicación a la tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por formar profesionistas de alto nivel, por ser multicultural, laica, pública y por que en ella viví momentos inolvidables, tristes, alegres, preocupantes, y por que en ella conocí a una variedad de gente que en su momento estimé y me alegré de ser su compañero.

México, Pumas, Universidad...!!!!

A . T . R . M .



Índice

Índice

CONTENIDO	PÁGINA
Índice de tablas	V
Índice de figuras	VI
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	5
3. GENERALIDADES	
3.1 Vancomicina	
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas	7
3.1.2 Mecanismo de acción	9
3.1.3 Farmacocinética y farmacodinamia	10
3.1.4 Usos terapéuticos y dosis	11
3.1.5 Presentaciones comerciales	12
3.1.6 Reacciones adversas.....	12
3.1.7 Toxicidad	13
3.1.8 Métodos analíticos par cuantificación de vancomicina por CLAR	13
3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	
3.2.1 Componentes de CLAR	15
3.2.1.1 Fase estacionaria	16
3.2.1.1.1 Empaques para columnas	17
3.2.1.1.2 Termostatos para columnas	18
3.2.1.2 Fase móvil	18
3.2.1.3 Sistema de bombeo	19
3.2.1.4 Sistema de inyección	19
3.2.1.5 Detectores	20
3.2.2 Interpretación de cromatogramas	21
3.2.2.1 Parámetros cromatográficos	22
3.2.2.2 Eficiencia de la columna	24
3.2.2.3 Resolución de la columna	24
3.3 Método bioanalítico	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Reactivos, material y equipo	
4.1.1 Reactivos	27
4.1.2 Materiales	27
4.1.3 Equipos	28

Índice

4.2 Desarrollo del método analítico	28
4.3 Condiciones cromatográficas y método de extracción de vancomicina del fluido biológico.....	29
4.4 Preparación de soluciones	
4.4.1 Solución amortiguadora de fosfatos	30
4.4.2 Acetonitrilo	30
4.4.3 Fase móvil	30
4.4.4 Solución de extracción	31
4.4.5 Solución A	31
4.4.6 Solución B	31
4.4.7 Solución C	31
4.4.8 Preparación de la curva patrón en fase móvil	31
4.4.9 Preparación de los puntos control de vancomicina en fase móvil	32
4.2.10 Preparación de la curva patrón en plasma	32
4.2.11 Preparación de los puntos de control de vancomicina en plasma	33
4.5 Validación del método analítico	
4.5.1 Linealidad del método.....	34
4.5.1.1 Exactitud de la curva de linealidad	34
4.5.2 Precisión	
4.5.2.1 Repetibilidad	34
4.5.2.2 Reproducibilidad entre días	34
4.5.2.3 Reproducibilidad entre analistas	35
4.5.3 Exactitud	35
4.5.4 Selectividad	35
4.5.5 Recobro absoluto	36
4.5.6 Límite de detección y cuantificación	37
4.5.7 Estabilidad	
4.5.7.1 Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo .	37
4.5.7.2 Estabilidad de la muestra sin reconstituir.....	38
4.5.7.3 Estabilidad de la muestra reconstituida	38
4.5.7.4 Estabilidad de la muestra a largo plazo	38
4.5.7.5 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación	38
4.6 Aplicación clínica	40
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
5.1 Desarrollo del método analítico	
5.1.1 Condiciones cromatográficas	
5.1.1.1 Longitud de onda	42
5.1.1.2 Columna cromatográficas	42
5.1.1.3 Fase móvil	44
5.1.2 Selección del estándar interno	46
5.1.3 Método de extracción.....	46

Índice

5.2 Optimización del método analítico	47
5.3 Validación de método analítico	
5.3.1 Linealidad	47
5.3.1.1 Exactitud de la curva de linealidad	48
5.3.2 Precisión y exactitud	
5.3.2.1 Repetibilidad	49
5.3.2.2 Reproducibilidad entre días	49
5.3.2.3 Reproducibilidad entre analistas	50
5.3.3 Selectividad	53
5.3.4 Recobro absoluto	56
5.3.5 Límite de detección y cuantificación	57
5.3.6 Estabilidad	
5.3.6.1 Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo...	57
5.3.6.2 Estabilidad de la muestra sin reconstituir.....	58
5.3.6.3 Estabilidad de la muestra reconstituida.....	58
5.3.6.4 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación.....	59
5.3.6.5 Estabilidad de la muestra a largo plazo.....	60
5.4 Aplicación clínica.....	61
6. CONCLUSIONES.....	65
7. BIBLIOGRAFÍA.....	67
8. ANEXO	
8.1 Abreviaturas	70

Índice de tablas

No. DE TABLA		PÁGINA
1	Presentaciones farmacéuticas de vancomicina	12
2	Métodos analíticos para cuantificación de vancomicina por CLAR	14
3	Naturaleza de la fase estacionaria en función de los analitos a separar.....	17
4	Composición de la fase móvil de acuerdo al tipo de cromatografía	18
5	Detectores disponibles para CLAR.....	21
6	Condiciones cromatográficas para el análisis de vancomicina en Plasma.....	29
7	Preparación de la curva patrón de vancomicina en fase móvil	32
8	Preparación de los puntos control de vancomicina en fase móvil	32
9	Preparación de la curva patrón de vancomicina en plasma	33
10	Preparación de los puntos control de vancomicina en plasma	33
11	Fármacos evaluados para la selectividad del método.....	36
12	Criterios de aceptación para las distintas pruebas de validación	39
13	Datos demográficos de pacientes en la unidad de terapia intensiva del INNN	40
14	Resultados obtenidos de la evaluación de las diferentes columnas	43
15	Resultados obtenidos en la evaluación de diferentes fases móviles	44
16	Linealidad del método analítico	47
17	Concentración recuperada de vancomicina	48
18	Repetibilidad y exactitud del método analítico	49
19	Reproducibilidad y exactitud del método analítico entre días	50
20	Reproducibilidad del método analítico entre analistas	51
21	Resultados del estadístico t-Student	52
22	Selectividad del método analítico	53
23	Recobro absoluto (%)	56
24	Concentración inicial de muestras de vancomicina	57
25	Estabilidad de la muestra plasmática en la mesa de trabajo	57
26	Estabilidad de la muestra procesada sin reconstituir	58
27	Estabilidad de la muestra procesada y mantenida a temperatura Ambiente.....	59
28	Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación.....	59
29	Estabilidad a largo plazo (15 días).....	60
30	Estabilidad a largo plazo (30 días).....	61
31	Datos de linealidad para cuantificación de vancomicina en muestras.....	62
32	Puntos control para la cuantificación de vancomicina en muestras Plasmáticas de pacientes	63
33	Concentración de vancomicina en las muestras plasmáticas.....	63

Índice de figuras

No. DE FIGURA		PÁGINA
1	Estructura química de la vancomicina.....	7
2	Grupos funcionales que le confieren diferentes valores de pKa a la molécula de vancomicina.....	8
3	Mecanismo de acción de la vancomicina.....	9
4	Componentes básicos del equipo de CLAR.....	16
5	Cromatograma tipo en una separación cromatográfica.....	22
6	Cromatograma asimétrico, factor de coleo.....	24
7	Espectro de absorción de la vancomicina.....	42
8	Gráfico de linealidad del método analítico.....	48
9	Cromatograma típico de blanco de plasma tratado con el método analítico.....	54
10	Cromatograma típico de blanco de plasma tratado con el método analítico.....	54
11	Cromatograma de muestra de plasma #190106 de paciente tratado con vancomicina.....	54
12	Cromatograma de una muestra de plasma de paciente sin tratamiento con vancomicina.....	54
13	Cromatograma de la muestra plasmática #190039 sin diluir de paciente tratado con vancomicina. Muestra tomada post-infusión.....	55
14	Cromatograma de la muestra de plasma #190039 de paciente tratado con vancomicina. Muestra tomada post-infusión y diluida (1:3)....	55
15	Cromatograma de muestra plasmática de paciente administrado con vancomicina. Muestra #189647.....	55
16	Cromatograma de muestra de plasma de paciente que no fue tratado con vancomicina.....	55
17	Gráfico de linealidad para cuantificar las muestras.....	62

I. Introducción

Introducción

1. Introducción

A nivel mundial, las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, en especial en países en vías de desarrollo como lo es México, es por ello que el tratamiento oportuno y eficaz de éstas tiene gran impacto en el índice de salud poblacional.

Por su parte, la prevalencia de agentes bacterianos resistentes a la mayoría de los antibióticos en pacientes gravemente enfermos ingresados en unidades de cuidado intensivo es alta, por lo cual es necesaria la administración de fármacos capaces de combatir estas infecciones. La vancomicina se convierte en un fármaco de elección al erradicar eficazmente los microorganismos gram-positivos que son resistentes a la mayoría de los antibióticos de primera elección, como las penicilinas y cefalosporinas. También su uso es esencial para el tratamiento de infecciones graves causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, de *Staphylococcus epidermidis* en pacientes alérgicos a penicilinas, en el tratamiento de endocarditis de origen esptotocóccico y del género *Corynebacterium spp.*

Cabe mencionar que años atrás se creía que la vancomicina era tóxica *per se*. Gracias a investigaciones recientes dicho efecto tóxico se atribuye no sólo a las características de la molécula, sino también al método de obtención, formulación, régimen de dosificación y administración conjunta de otros fármacos con efectos tóxicos leves o graves; siendo esta última práctica la responsable de la toxicidad. Hoy en día se sabe que el uso de terapias de vancomicina a bajas concentraciones (al rededor de 10 µg/mL), disminuye el riesgo de producir daño renal y ótico; asimismo un control de los niveles plasmáticos de vancomicina (dada su pobre distribución) en pacientes tratados con ella, garantiza la integridad de oídos y riñones, que son los órganos más afectados durante la administración de vancomicina.

Introducción

Debido a lo anterior, es de suma importancia que en los hospitales en los cuales se utilizan terapias con vancomicina (particularmente en las unidades de terapia intensiva), se establezca un sistema de monitoreo del fármaco, para con ello asegurar que los niveles plasmáticos de vancomicina no sean nocivos para el paciente.



II. Objetivos

Objetivos

2. Objetivos

Dado que en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía no se cuenta con un método analítico validado que asegure cuantificar selectivamente los niveles de vancomicina, en plasma, se llevó a cabo el siguiente proyecto, cuyos objetivos fueron los siguientes:

- Desarrollar un método analítico para cuantificar los niveles de vancomicina en plasma empleando cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV.
- Validar el método analítico de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.
- Aplicar el método analítico en la cuantificación de los niveles plasmáticos de vancomicina en muestras de pacientes.



III. Generalidades

Generalidades

1. Generalidades

3.1 VANCOMICINA

La vancomicina es un glucopéptido tricíclico complejo, producido mediante cultivos de *Streptomyces orientalis* (familia *Streptomycetaceae*), mediante un proceso de fermentación de inmersión y que después de su purificación se convierte en clorhidrato de vancomicina soluble, utilizando HCl. ⁽¹¹⁾. En la figura 1 se muestra la estructura química de la vancomicina.

3.1.1 Propiedades fisicoquímicas ^(11, 13, 23)

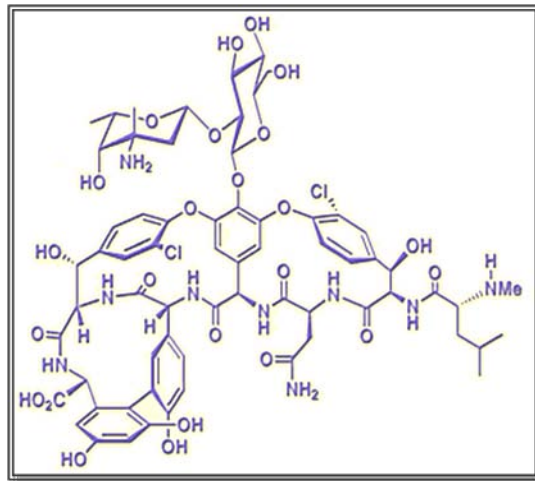


Figura 1. Estructura química de la vancomicina

Nombre genérico: Vancomicina

Categoría terapéutica: Antibiótico

Clase química: Glucopéptido

Nombre químico:

Ácido (S_a)-(3S,6R,7R,22R,23S,26S,36R,38aR)-44-[[2-O-(3-Amino-2,3,6-tridesoxi-3-C-metil- α -L-lixo-hexopiranosil)- β -D-glucopiranosil]oxi]-3-(carbamoilmetil)-10,19-dicloro-2,3,4,5,6,7,23,24,25,26,36,37,38,38a - tetradecahidro-7,22,28,30,32-pentahidroxi-6-[(2R)-4-metil-2-(metilamino)valer-amido] - 2,5,24,38,39 - pen-taoxo - 22H - 8-,11:18,21-di-eteno-23,26-(iminometano) - 13,16:31,35 - di-meteno - 1H,16H - [1,6,9] oxa - diazaciclohexadecino [4,5-m] [10,2,16]-benzoxadiazaciclótetracosin-26-carboxílico. ⁽¹⁸⁾

Fórmula molecular: C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄

Generalidades

Peso molecular: 1449.25 g/mol

Fórmula molecular del clorhidrato: $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, HCl

Peso molecular del clorhidrato: 1485.7 g/mol

Descripción: el clorhidrato de vancomicina es un polvo de flujo libre color de tostado a pardo, inodoro, ligero sabor amargo.

Solubilidad del clorhidrato: completamente soluble en agua (> 100 mg/mL), soluble en etanol (1:700), ligeramente soluble en metanol y alcoholes de bajo peso molecular; insoluble en éter, cloroformo, acetona y alcoholes de elevado peso molecular.

Absorción UV: 282 nm ($\epsilon^{1\%} = 40$, en la región UV).

Punto isoeléctrico: 8 – 8.3⁽¹⁵⁾.

Densidad: $1.65 \pm 0.1 \text{ g cm}^{-3}$

Valores de pKa: 2.18, 7.75, 8.89, 9.59, 10.4 y 12.0. En la figura 2, se presentan los grupos funcionales que le confieren dichos valores de pKa a la vancomicina.

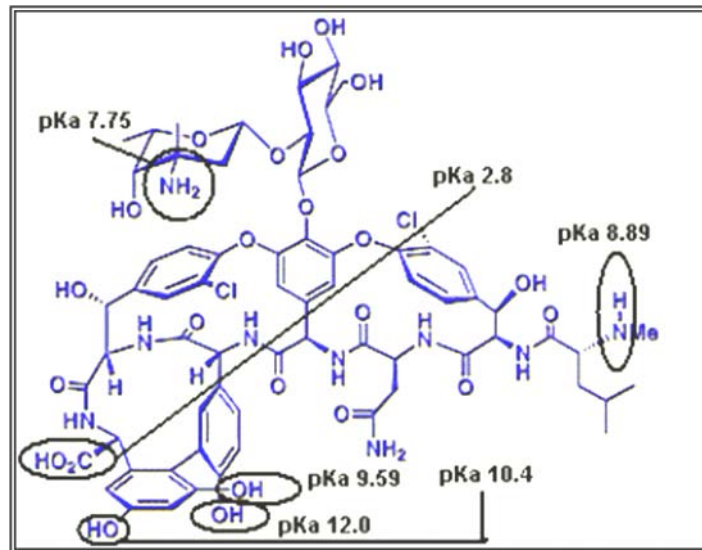


Figura 2. Grupos funcionales que le confieren los diferentes valores de pKa a la molécula de vancomicina.

Generalidades

3.1.2 Mecanismo de acción

La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular de bacterias que son sensibles, al unirse rápida e irreversiblemente a la porción terminal D-alanil-D-alanina de alta afinidad de las unidades precursoras parietales, evitando así la síntesis de péptidoglucano y dando como resultado final la modificación de la permeabilidad de la pared celular de la bacteria ^(11, 12, 18). En la figura 3 se esquematiza el mecanismo de acción del fármaco.

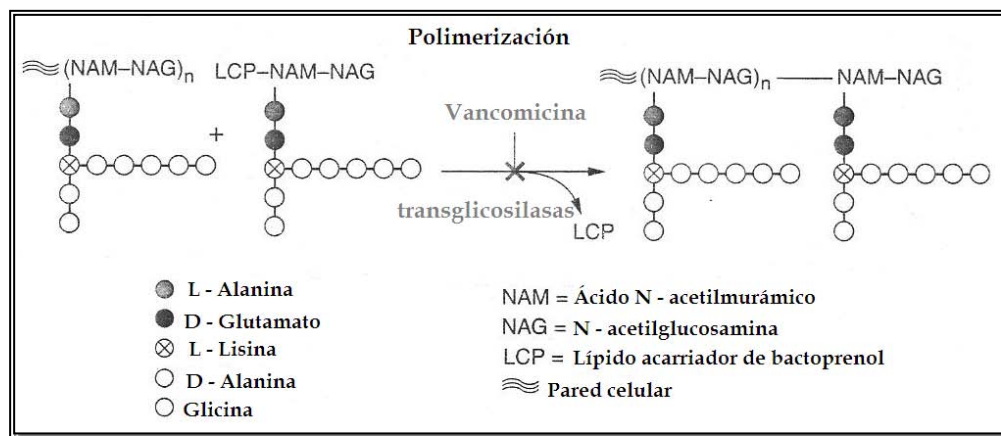


Figura.3 Mecanismo de acción de la vancomicina

La vancomicina también inhibe la síntesis de ARN; siendo quizás este mecanismo dual el responsable de la baja frecuencia de resistencia a vancomicina por parte de los microorganismos ⁽²⁶⁾.

Concentración Mínima Inhibitoria de vancomicina en diferentes especies: ^(12, 18) *Staphylococcus aureus* y *S Staphylococcus epidermidis*, se inhiben usualmente a concentraciones de 1.0 a 4.0 µg/mL, las cepas de *Streptococcus pyogenes* se inhiben a una concentración ≤ 0.3 µg/mL, *Streptococcus pneumoniae* de 0.25 a 0.50 µg/mL, mientras que *Streptococcus viridans* es altamente susceptible, ya que la concentración mínima inhibitoria < 0.1 µg/mL.

Generalidades

Bacillus spp., incluido *Bacillus anthracis* son inhibidos a 2 µg/mL. En el caso de *Corynebacterium* spp. (difteroides) este se inhibe a concentraciones de 0.04 a 3.1 µg/mL. Muchas especies de *Actinomyces*, se inhiben con concentraciones entre 5 y 10 µg/mL; y *Clostridium* spp., requiere de una concentración en el rango de 0.39 - 6.0 µg/mL.

3.1.3 Farmacocinética y farmacodinamia ^(11, 12, 18, 26)

En general se administra sólo por vía intravenosa; ya que su absorción por vía oral es pobre y solamente se emplea para tratar infecciones del tracto digestivo. Una infusión intravenosa de 1.0 g de vancomicina en adultos, produce concentraciones plasmáticas de 15 a 30 µg/mL después de 1 a 2 horas, en cambio la misma dosis de bolo intravenoso produce estos mismos valores en 1 hora.

La vancomicina se distribuye por la mayor parte de los tejidos incluidos el fluido pericárdico, pleural, ascítico y sinovial; difunde muy poco al sistema nervioso, a menos de que las meninges estén inflamadas. El volumen de distribución es de 0.39 ± 0.06 L/Kg. Su unión a proteínas es de 30 ± 11 % (algunos autores manejan 55%).

La vancomicina no se metaboliza; se excreta por filtración glomerular recuperándose a las 24 horas el 79 ± 11 %. El tiempo de vida media de eliminación es de 5.6 ± 1.8 horas en adultos y de 2–3 horas en niños menores de 12 años, y el de distribución de 0.5 horas. La depuración está dada por la expresión: $Cl = 0.79 Cl_r + 0.22$ (mL min⁻¹ Kg⁻¹) ⁽¹²⁾.

Dado que una gran cantidad de vancomicina se excreta en orina, en pacientes con insuficiencia renal con anuria, la vida media del fármaco se prolonga de 3 ó 10 días ya que la depuración disminuye. En pacientes con problemas de obesidad la vida media de eliminación disminuye, las concentraciones plasmáticas aumentan y el volumen de distribución disminuye. En ancianos la vida media aumenta y la depuración disminuye, lo que causa aumento en las concentraciones plasmáticas.

Generalidades

3.1.4 Usos terapéuticos y dosis ^(12, 18)

La vancomicina se emplea en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas graves, en aquellas que presenten resistencia a meticilina e infecciones por otros Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Corinebacterium diftheriae*, entre otros y cuando no puedan utilizarse fármacos como penicilinas.

Se utiliza sola o con otros fármacos, como aminoglucósidos, en el tratamiento y profilaxis de la endocarditis, para la profilaxis de las infecciones quirúrgicas en cuidados intensivos y en pacientes inmunodeprimidos. También se utiliza (vía oral) en el tratamiento de la colitis asociada con antibióticos.

En adultos con función renal normal la dosis intravenosa diaria habitual es de 2.0 g divididos en dosis de 500 mg cada 6 horas o 1.0 g cada 12 horas, cada dosis debe de administrarse a una velocidad de infusión no mayor a 10 mg/min; vía oral 125 a 500 mg cada 6 horas. En niños la dosis diaria habitual es de 10 mg/Kg administrada cada 6 horas, vía oral es 12.5 mg/Kg cada 6 horas. Para lactantes y neonatos se sugiere dosis inicial de 15 mg/Kg seguida por 10 mg/Kg cada 12 horas en la primera semana de vida, y cada 8 horas de ahí en adelante hasta el primer mes de edad.

El rango terapéutico recomendado en el tratamiento de infecciones causadas por organismos susceptibles a la vancomicina (MIC < 4 µg/mL) es de 5-15 µg/mL ⁽²⁴⁾.

Generalidades

3.1.5 Presentaciones comerciales

Las presentaciones farmacéuticas de vancomicina que actualmente se encuentran disponibles en México, se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Presentaciones farmacéuticas de vancomicina.

Nombre comercial	Laboratorio	Forma Farmacéutica	Presentaciones disponibles
Vancocin®	SANDOZ	Cápsulas	125 y 500 mg
		Polvo liofilizado (inyectable)	500 mg (100 mL) y 1 g (200 mL), 5 g y 10 g
Vancomicina (SSA)	Representaciones e investigaciones Médicas S.A de C.V	Polvo liofilizado (inyectable)	500 mg
Vanaurus	PISA	Polvo liofilizado (inyectable)	500 mg y 1 g

3.1.6 Reacciones adversas ^(8, 12, 18)

La administración intravenosa de vancomicina puede producir eritema, rubor o exantema en la cara y parte superior del tórax, algunas veces hipotensión y síntomas similares al shock, así como neutropenia reversible, eosinofilia y rara vez trombocitopenia y agranulocitosis. Muchas de estas reacciones se producen con menor frecuencia gracias a la utilización de preparados altamente purificados.

Se debe tener cuidado en la administración intravenosa para evitar la tromboflebitis y extravasación ya que existe el riesgo de necrosis tisular; a causa de su escasa absorción se han descrito pocos efectos adversos tras la administración oral.

Los efectos adversos de la infusión de vancomicina pueden minimizarse con la dilución de 500 mg de vancomicina en al menos 100 mL de líquido y también mediante la infusión de la dosis durante un tiempo no menor a 60 minutos.

3.1.7 Toxicidad ^(8, 18)

La ototoxicidad se ha relacionado con la administración de vancomicina, y es más probable en pacientes con concentraciones plasmáticas elevadas, con alteraciones renales o con la pérdida de audición preexistente. La administración de vancomicina además puede producir nefrotoxicidad particularmente a dosis elevadas o en pacientes con factores predisponentes, pero la frecuencia ha disminuido debido a la mayor concienciación del problema y el control adecuado de las concentraciones plasmáticas y de la función renal. El riesgo de nefrotoxicidad también se relaciona con el tratamiento simultáneo de aminoglucósidos, aumento de la creatinina sérica y con la profilaxis de la infección antes y después de cirugía vascular.

Los pacientes geriátricos tienen mayor probabilidad de presentar disminución de la función renal, que puede requerir el ajuste de la dosis para evitar una concentración sérica de vancomicina excesiva. Debido a esto, los pacientes geriátricos se encuentran en mayor riesgo de inducir nefrotoxicidad y ototoxicidad.

Por lo que, en general, se ha recomendado un ajuste de la dosis para evitar concentraciones plasmáticas máximas superiores a 30 – 40 µg/mL y concentraciones mínimas superiores a 10 µg/mL, concentraciones superiores a 80 µg/mL se consideran tóxicas.

3.1.8 Métodos analíticos para cuantificación de vancomicina por CLAR

Para llevar a cabo el monitoreo terapéutico de la vancomicina se requiere contar con un método analítico para su cuantificación en plasma, en la tabla 2 se muestran los métodos analíticos reportados en la literatura, empleados para la cuantificación de vancomicina por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Generalidades

Tabla.2. Métodos para cuantificación de vancomicina por CLAR.

Técnica	Matriz biológica	Método de extracción	Condiciones cromatográficas		Validación	t _R (min)	Referencia
CLAR/ UV	Plasma Humano	Líquido – líquido: Pp con TCA	Columna	μBondapak C ₁₈ (3.9 x 300 mm) 10μm	Linealidad Recobro absoluto	16	17
			F.M.	Ác. 1-heptanosulfónico 0.01M : ACN (88:12)			
			Flujo Vol. Inyección λ	2 mL/min 100 μL 280 nm			
CLAR/ UV RIA FPIA	Suero Humano, fluido cerebro-espinal y peritoneal	Líquido – líquido: Pp con Isopropanol: ACN (50:50)	Columna	Ultrasphere (4.0 x 150 mm) 5 μm	Linealidad Reproducibilidad Repetibilidad Precisión Especificidad LD	6.1	14
			F.M.	ACN: AcONH ₄ 0.2 M : H ₂ O (9:10:81) pH 5.4			
			Flujo Vol. Inyección λ	1mL/min 20 μL 214 nm, lámpara de Zn			
CLAR/ UV	Suero y tejidos humanos	SPE: Cartuchos Sep-Pak® C ₁₈	Columna	Nucleosil C ₁₈ (4.6 x 150 mm) 5 μm	Linealidad Recobro absoluto Precisión Reproducibilidad Repetibilidad Selectividad LD	2.5	3
			F.M.	KH ₂ PO ₄ 5 mM pH 2.8 : MeOH (88:22)			
			Flujo Vol. Inyección λ	1.5 mL/min 40 – 200 μL 229 nm			
CLAR/ UV	Plasma humano	Líquido – líquido: Pp con HClO ₄	Columna	Nucleosil RP-18 (4.6 x 150 mm) 5 μm	Linealidad LD LC Estabilidad Selectividad	4.8	16
			F.M.	KH ₂ PO ₄ 5 mM pH 2.8 : ACN (90:10)			
			Flujo Vol. Inyección λ Temperatura	1mL/min 50 μL 229 nm 30°C			
CLAR/ UV	Suero, humor vítreo y acuoso de conejo	Líquido – líquido: Pp con distintos solventes SPE: Cartuchos Sep-Pak® C ₁₈	Columna	Spherisorb 5ODS (4.6 x150 mm) 5 μm	No aplica	NA	21
			F.M.	KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 4 : ACN (90:10)			
			Flujo Vol. Inyección λ SI	1 mL/min 20 μL 198 nm Cafeína			
CLAR/UV FPIA	Plasma y tejido humano.	SPE: Cartuchos BondElute C18	Columna	Hypersil BDS C8 (4.6 x 100 mm) 3μm	Linealidad Reproducibilidad Recobro absoluto Exactitud Estabilidad Selectividad	7.6	6
			F.M.	KH ₂ PO ₄ 5 mM pH 2.8 : ACN (gradientes)			
			Flujo Vol. inyección λ Precolumna SI	1.5 mL/min 100 μL 282 nm C8 (2cm) Tinidazol			
CLAR/UV	Suero humano	SPE: Cartuchos SepPaK® C18	Columna	YMC Pak ODS-AQ (4.6 x 250 mm) 5μm	No aplica	18	2
			F.M.	KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 6:ACN: MeOH (91:5:4) y (84:8:8)			
			Flujo Vol. inyección λ SI	1.5 ml/min 50μL 210 nm Cefazolin			
CLAR/ Detección electroquímica y UV	Plasma Humano	Líquido – líquido: Pp con MeOH	Columna	Kromasil C18 (4.6 x 250mm) 5μm	Linealidad Precisión Exactitud LD LC Recobro absoluto	9.7	7
			F.M.	ACN: Na ₂ HPO ₄ 25mM pH 7 (12:88)			
			Precolumna Flujo Vol. inyección λ	Kromasil C18 5μm (4.0 x 10 mm) 0.8 mL/min 20 μL 215 nm			

Generalidades

Tabla 2. (Continuación) Métodos para cuantificación de vancomicina por CLAR.

Técnica	Matriz biológica	Método de extracción	Condiciones cromatográficas	Validación	t _R (min)	Referencia
CLAR / UV	Plasma Humano	Líqu-líqu: Pp con MOPS	Columna F.M. Flujo Vol. inyección λ Precolumna SI	Supelcosil™ LC-18 (4.6 x 250 mm) 5µm Acetatos 75mM pH 5:ACN (92.8) 0.8 mL/min 5µL 230 nm C18 Cefuroxima	Linealidad Precisión Selectividad Exactitud Recobro absoluto LD LC Estabilidad Robustez	17.4 27

3.2 Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR)

La cromatografía es una técnica utilizada para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos presentes en mezclas; su definición rigurosa es difícil debido a su variedad de sistemas y técnicas; tuvo sus inicios a principios del siglo XX; cuando el botánico ruso Mikhail Semenovich Tswett (1872 – 1919) empleó la técnica para separar algunos pigmentos de las plantas; reportando “una nueva categoría de análisis de adsorción” en 1903 ⁽¹⁾. Tswett utilizó columnas de vidrio empacadas con carbonato de calcio; por donde hizo pasar soluciones de clorofilas y xantofilas que al separarse aparecían como bandas coloridas sobre la columna; de ahí que eligiera del griego *chroma* (color) y *graphein* (escritura), para el nombre de la nueva técnica.

Recientemente la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), definió la cromatografía como ⁽⁴⁾: “Método usado principalmente para la separación de componentes, distribuidos entre dos fases, una estacionaria y otra móvil”.

3.2.1 Componentes de CLAR

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducirla muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, un integrador o un registrador. En la figura 4 se muestran con mayor detalle los componentes necesarios de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Generalidades

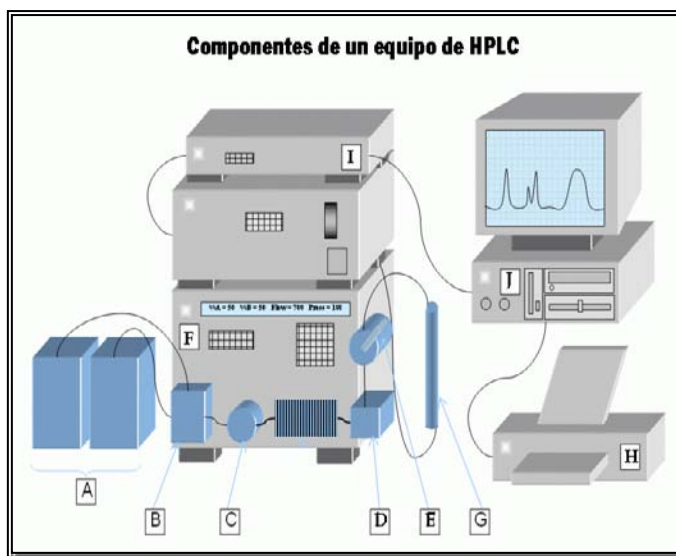


Figura 4. Componentes básicos del equipo de CLAR: A) recipientes para fase móvil (de acero inoxidable o vidrio), B) sistema de bombeo, C) amortiguador de pulsos, D) filtro, E) válvula de inyección, F) sistema controlador de flujo, G) columna, I) detector, J) software e H) impresora. Algunos equipos cuentan con termostatos para columnas y otros con válvulas para mezclar solventes, en caso de utilizar eluciones con gradientes.

3.2.1.1 Fase estacionaria ^(10, 22)

La columna cromatográfica es la fase estacionaria y es el principal componente cromatográfico; ya que es crucial para determinar la función y resolución del sistema CLAR.

La separación de los componentes presentes en una solución se logra por la partición de éstos entre la fase móvil y al fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describe como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. La elección de la columna cromatográfica está determinada principalmente, por el tipo de cromatografía (fase reversa o normal). La fase estacionaria para la cromatografía de líquidos de fase reversa consta normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales, sin embargo, la polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos que varía desde el octadecilsilano relativamente no polar a grupos nitrilo muy polares. El tamaño de partícula de una columna cromatográfica generalmente es de 3 μm a 10 μm de diámetro.

Generalidades

El material de las columnas generalmente es de acero inoxidable, y algunas veces de tubo Tygon para presiones bajas (<600 psi); su longitud varía de 10 a 30 cm; y el diámetro interno de 4 a 10 mm. En la actualidad se consiguen microcolumnas de alta resolución con diámetro interno de 1 a 4.6 mm y longitud de 3 a 7.5 cm y tienen la ventaja de hacer más rápidas las separaciones analíticas y ahorrar fase móvil.

3.2.1.1.1 Empaques para Columnas ^(10, 22)

El material de empaque tiene generalmente un tamaño de partícula de 5 a 10 μm , lo cual hace que los platos teóricos de la columna sean de 40 000 a 60 000 platos/m. Para microcolumnas el tamaño de partícula puede ser de 3 a 5 μm , aumentando hasta 100 000 platos/m. La naturaleza de la fase estacionaria empleada dependerá de los analitos a separar; se muestran algunos ejemplos en la Tabla 3.

Tabla 3. Naturaleza de la fase estacionaria en función de los analitos a separar

<i>Fase estacionaria</i>	<i>Tipo</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Analitos a separar</i>
Sílica	Sílice sin modificar	Fase normal	Hexano, alcoholes	Pesticidas y productos naturales
ODS	Cadenas hidrocarbonadas C18	Fase reversa	Agua, metanol, acetonitrilo, buffers(2<pH<8)	Péptidos y aminoácidos
C8	Cadenas hidrocarbonadas C8	Fase reversa	Agua, metanol, acetonitrilo, buffers (2<pH<8)	Fármacos y medicamentos
Cianopropil	Grupos cianopropil unidos a un soporte de sílica	Fase normal y reversa	Fase normal – Hexano, éter Fase reversa – agua, alcohol.	Alimentos y ácidos grasos
Aminopropil	Grupos aminopropil unidos a un soporte de sílica	Fase normal y reversa	Fase normal – Hexano, éter Fase reversa – agua, alcohol.	Surfactantes
Pirkle	Enantiómero de fenilglicina unido a un soporte de sílica	Separaciones quirales iónicas, son más efectivas y menos robustas	Hexano, modificadores	Pesticidas y herbicidas

Generalidades

3.2.1.1.2 Termostatos para columnas ^(22, 25)

En muchos casos no es necesario tener control estricto sobre la temperatura la columna; sin embargo, la columna puede calentarse para proporcionar separaciones más eficaces. Los equipos modernos regulan la temperatura dentro de unas décimas de grados Celsius, desde la temperatura ambiente hasta los 150 °C.

3.2.1.2 Fase Móvil ^(10, 22, 25)

Los eluyentes utilizados en CLAR van desde agua, soluciones acuosas, soluciones amortiguadoras, hasta solventes orgánicos como metanol, acetonitrilo o mezcla de todos los anteriores. Todos los solventes deben ser de alta pureza, libres de polvo y deben estar desgasificados para su uso; además no deben interferir con el sistema de detección del o los analitos. Su elección es de gran importancia por que es una variable que gobierna la separación; debiendo distinguirse claramente entre la fase normal y reversa, en la tabla 4 se muestra la composición de la fase móvil en función del tipo de cromatografía.

Tabla 4. Composición de la fase móvil de acuerdo al tipo de cromatografía

<i>FASE NORMAL</i>	<i>FASE REVERSA</i>
Hexano	Agua
Isooctano	Metanol
Dietil éter	Acetonitrilo
Diclorometano	Tetrahidrofurano
Alcohol Isopropílico	

Por su parte el sistema de elución puede ser de dos tipos:

- 1) Isocrático: donde la composición de la fase móvil permanece constante durante todo el análisis.
- 2) Gradiente: cuando la composición de la fase móvil cambia uniformemente durante el análisis.

Generalidades

3.2.1.3 Sistema de Bombeo ^(4, 22)

El propósito de las bombas en cromatografía es hacer pasar un flujo constante y exacto de fase móvil desde los recipientes hasta la columna cromatográfica mediante una tubería y uniones adecuadas para soportar altas presiones; son construidas con materiales resistentes a solventes orgánicos y soluciones acuosas buffer; en general deben cubrir los siguientes requisitos: (1) generar presiones de más de 6 000 psi (lb/pulg²), (2) estar libre de pulsos la presión de salida, (3) proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min, (4) ser reproducible el flujo dentro de un valor relativo de 0.5 % o mejor y (5) ser resistente a la corrosión.

Las bombas empleadas en CLAR pueden ser de tres tipos: (a) de jeringa remachada con tuerca, (b) bomba de vaivén o de movimiento recíproco y (c) de presión constante o neumática. Los sistemas modernos y más utilizados actualmente, constan de una o varias bombas reguladoras controladas por computadora que pueden programarse para variar la relación entre los componentes de la fase móvil, según se requiera para la cromatografía en gradiente, o bien, para mezclar la fase móvil en sistemas isocráticos.

3.2.1.4 Sistema de Inyección ⁽²²⁾

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos a separar, identificar y/o cuantificar se inyectan en la fase móvil, ya sea manualmente usando jeringas o inyectores de loop o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos, los cuales constan de un carrusel o gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un tapón perforable y un dispositivo de inyección para transferir la muestra desde los viales a un *loop* conectado al cromatógrafo. Los inyectores automáticos son los más empleados actualmente ya que pueden ser programados para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones y los ciclos de enjuague del loop, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas.

3.2.1.5 Detectores ^(10, 22, 28)

El detector es el dispositivo que permite medir en forma continua alguna propiedad física de los componentes de la muestra o de la fase móvil, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra medida a la salida de la columna. Los detectores que se utilicen deben cumplir con características como tener respuesta universal o selectiva, es decir, responder a todo tipo de compuestos o algunos de ellos, tener una respuesta lineal y ser estables a cambios de temperatura y variación de flujo.

Los detectores más utilizados en CLAR se pueden clasificar en dos grupos dependiendo el fenómeno físico que se mide, así tenemos los de tipo Espectrofotométricos (UV-Vis, fluorescencia, refractometría y de Masas) y los Electroquímicos (Conductimétrico, Amperimétrico, Voltamperométrico y Coulombimétrico).

Aunque no hay un sistema de detección universal con alta sensibilidad, el detector a utilizar dependerá de la naturaleza de la muestra (Tabla 5), pero los de más utilidad en CLAR son los de UV – visible con longitud de onda variable o con líneas de 254 y 280 nm para detectores con longitudes de onda fijas. En los detectores espectrofotométricos un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector, de esta manera, a medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.

Generalidades

Tabla 5. Detectores disponibles para CLAR. ^(10, 28)

<i>Detector para CLAR</i>	<i>Disponibilidad comercial</i>	<i>Límite de detección de masa*</i>	<i>Observaciones</i>
Absorbencia	Sí	10 pg	Aparatos versátiles, de longitud de onda variable o fija.
Fluorescencia	Sí	10 fg	Alta sensibilidad y muy específico.
Electroquímico	Sí	10 pg	Realizan mediciones potenciométricas y voltamperométricas.
Índice de refracción	Sí	1 ng	Es poco selectivo y responde a casi todos los solutos. Sensibilidad baja.
Conductividad	Sí	100 pg – 1 ng	-----
Espectrometría de masas	Sí	<1 pg	Razonablemente sensible, pero de uso complejo.
FTIR	Sí	1 µg	-----
Dispersión de luz	Sí	1 µg	-----

* Depende del compuesto, instrumento y condiciones de análisis.

3.2.2 Interpretación de cromatogramas

En la figura 5 se representa una separación cromatográfica típica de dos analitos, 1 y 2, donde el tiempo t_1 y t_2 son los tiempos de retención respectivos, W_1 y W_2 son los anchos respectivos de los picos 1 y 2 en la línea base, así como h , $h/2$ y $W_{h/2}$ son la altura, la mitad de la altura y el ancho a la altura media, respectivamente para el pico 1.

Generalidades

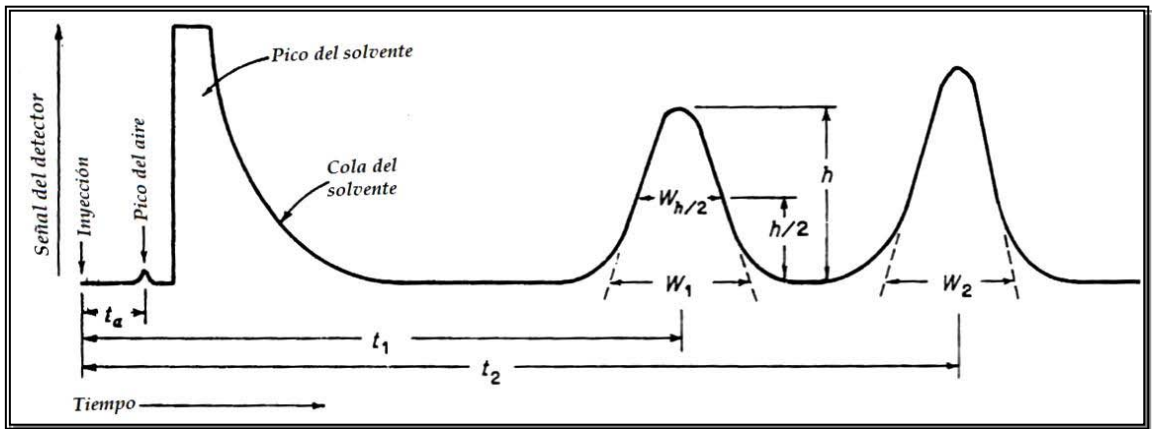
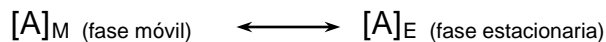


Figura 5. Cromatograma tipo en una separación cromatográfica

Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan pero no son únicos. Diversas variables físicas y químicas influyen en la velocidad de separación de los picos y su ensanchamiento; a menudo se pueden mejorar las separaciones si se controlan las variables que aumenten ⁽²⁵⁾: 1) la velocidad de separación de los picos ó 2) disminuyan la velocidad de ensanchamiento de los picos.

3.2.2.1 Parámetros cromatográficos ^(10, 22, 25)

Un factor importante en las separaciones cromatográficas son las velocidades relativas, determinadas por la relación de concentraciones del soluto $[A]$ en cada una de las fases:



Llegando a un equilibrio descrito por la constante de equilibrio (K_C); denominada *constante de distribución* (K_A); y definida por:

$$K_A = [A]_E / [A]_M$$

Por otro lado el *tiempo muerto*, t_M ; proporciona una medida de la velocidad promedio de migración de la fase móvil; es decir, es el tiempo que permanece en la columna, y muchas veces sirve de indicativo para identificar picos de analitos. Por su parte el tiempo (contado desde la inyección) que permanece un analito en la columna y que por ende tarda en llegar al detector; se le conoce como *tiempo de retención*, y se representa t_R .

Generalidades

El *factor de retención*, k_A , es un parámetro experimental importante utilizado para describir las velocidades de migración de solutos a través de las columnas. Para un soluto A, se define como:

$$k_A = K_A V_S / V_M$$

Donde: V_S es la velocidad de migración de solutos, V_M es la velocidad de migración de la fase móvil y K_A es la constante de distribución del soluto. Y al sustituir K_A , que es la constante de distribución del soluto y reacomodar expresiones; se obtiene la expresión para el factor de retención:

$$k_A = t_R - t_M / t_M$$

En la literatura antigua, este mismo factor se conocía como *factor de capacidad*, y se representaba como k' , sin embargo, en 1993 el Comité de Nomenclatura Analítica de la IUPAC recomendó denominar a esta constante como factor de retención y utilizar el símbolo ya descrito arriba.

El *factor de selectividad*, α , es una propiedad de la columna para dos solutos, y se define como:

$$\alpha = K_B / K_A$$

Donde el soluto B, es aquel que se retiene con más fuerza, y A el soluto retenido con menos fuerza por la misma columna; en otras palabras, A es el que se eluye más rápido; de acuerdo con esto, alfa es siempre mayor a la unidad. El factor de selectividad también se puede expresar en función de los tiempos de retención:

$$\alpha = (t_R)_B - t_M / (t_R)_A - t_M$$

Este parámetro es importante y útil para el cálculo del poder de resolución de la columna, cuando su valor es igual a 1, no es posible separar los componentes usando las mismas condiciones.

El *factor de coe*, T , es una medida de la simetría del pico y su valor debe ser cercano a la unidad, ya que a medida que el valor se incrementa, la cola del pico será más pronunciada, se calcula con la siguiente ecuación:

$$T = W_{0.05} / 2f$$

donde $W_{0.05}$, es el ancho del pico al 5% de la altura de este y f es la distancia del frente del pico hasta el máximo del pico, medida al 5% de la altura total (Figura 6).

Generalidades

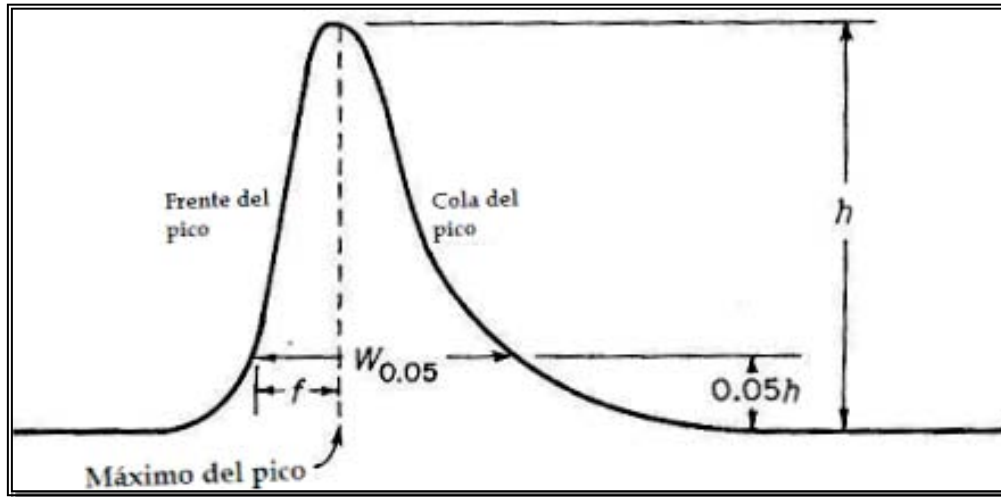


Figura 6. Cromatograma asimétrico, factor de coleo

3.2.2.2 Eficiencia de la columna ^(10, 22, 25)

Para conocer el valor cuantitativo de este parámetro cromatográfico; se emplean dos términos: 1) altura del plato H , y 2) cantidad o número de platos teóricos N . Los cuales se relacionan mediante la ecuación:

$$N = L/H$$

en donde L es la longitud del empaque de la columna. De este modo la eficiencia de la columna es mayor cuando aumentan los platos teóricos y disminuye la altura del plato. Por otra parte la eficiencia se puede calcular a partir de un cromatograma mediante la siguiente ecuación:

$$N = 16 (t_R / W)^2 = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$$

donde W es el ancho de la base del pico (en unidades de tiempo) a un tiempo de retención t_R , $W_{1/2}$ es el ancho del pico al 50% de la altura de este.

3.2.2.3 Resolución de la columna ^(10, 22, 25)

Provee de un valor cuantitativo de la capacidad para ser separados dos analitos presentes en una mezcla. Para una mezcla con dos analitos A y B, la ecuación de resolución está dada por:

$$R_s = 2[(t_R)_B - (t_R)_A] / W_A + W_B$$

Sí R_s es menor a la unidad, los compuestos no están separados del todo; pero si el valor es igual o mayor a 1, indica una buena separación.

3.3 Método bio-analítico⁽⁹⁾

Se entiende por método bioanalítico a la descripción de la secuencia ordenada de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis cualitativo y/o cuantitativo de un compuesto específico en una matriz biológica (plasma, orina, etc).

Para implementar un método analítico, se requiere primeramente de una revisión bibliográfica. De encontrarse uno, éste debe ser evaluado en cuanto a su selectividad y precisión. De no encontrarse un método adecuado, se deberá desarrollar un método específico para el fármaco de interés. En el desarrollo de un método es necesario verificar todo el proceso, que involucra, la preparación de la muestra, los procesos de extracción y/o separación, purificación, identificación y la cuantificación del fármaco en la matriz biológica.

En los estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia, así como en el monitoreo terapéutico de fármacos se debe asegurar que el método bioanalítico ha sido debidamente validado, esto es, se ha demostrado por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir, cumple con el propósito para el que fue diseñado, así de esta manera se obtienen resultados confiables y consistentes.

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 los parámetros fundamentales a evaluar para la validación de un método bioanalítico son: linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, selectividad, recuperación absoluta, límite de cuantificación, límite de detección y estabilidad (condiciones de almacenamiento, ciclos de congelación- descongelación, etc.), por lo que si el método cumple con estos criterios, es útil para su uso en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinéticos y monitoreo terapéutico.



IV. Parte Experimental

Parte Experimental

1. Parte Experimental

4.1 Reactivos, material y equipos

4.1.1 Reactivos

Agua, grado HPLC.

Acetonitrilo HPLC. Mallinckrodt

Metanol HPLC. J.T. Baker

Fosfato monobásico de potasio R.A.(cristales). J.T. Baker

Fosfato dibásico de potasio R.A.(polvo). J.T. Baker

Nitrógeno industrial. INFRA

Estándar secundario: clorhidrato de vancomicina, donación Laboratorios PISA.

Valoración 1014.4 µg/mg B.H.

4.1.2 Materiales

Matraces volumétricos: 5, 10, 25, 50 y 500 mL

Nave de pesado

Espátula

Pipetas automáticas: 100-1000 y 500-5000 µL

Puntas para pipetas automáticas

Probetas: 100 y 500 mL

Sistemas de filtración Millipore

Membranas de Filtración Nylon, 0.45µ y 47 mm de diámetro

Microviales: 300 µL

Tapas y septas para microviales

Camisas para microviales

Pipetas Pasteur y bulbos

Tubos eppendorf: 1mL

Tubos de ensayo silanizados: 10 mL

Gradilla para tubos de ensaye

Piseta

Vasos de precipitados: 100, 250mL

Parte experimental

4.1.2 Materiales (Continuación)

Guantes

Cartuchos Sep-Pak® Vac 3cc (500mg) C₁₈

Recipientes de vidrio de diferentes tamaños

4.1.3 Equipos

Balanza Analítica Sartorius

Sistema Desionizador de agua Milli-Q System-Waters

Sistema Cromatográfico Shimadzu

Bomba Mod. LC-10AT, Serie 4035IA

Controlador Mod. SCL-10A, Serie 60058ER

Detector UV-VIS Mod. SPD-10AV, Serie 40071D

Autoinyector Mod. SIL-10A, Serie 70042G

Computadora COMPAC Presario 4102, software Shimadzu Class-VP™

Columna LiChrosorb 100 RP-18 (4.0 x 250.0)mm, 5µm

Precolumna Phenomenex® C18 (4.0 x 3.0)mm

Ultrasonido Fisher Scientific

Potenciómetro ThermoOrion

Centrífuga eppendorf

Baño de agua LAB-LINE

Manifold System SUPELCO

Vórtex GENIE-2

4.2 Desarrollo del método analítico

Debido a que se deseaba desarrollar un método analítico que permitiera cuantificar vancomicina en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución, se inició el trabajo llevando a cabo la revisión de los métodos analíticos reportados en la literatura (Tabla 2).

Para obtener las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de vancomicina en plasma se recurrió a la información reportada en los artículos consultados (Tabla 2), por lo que se evaluaron las siguientes condiciones:

Parte experimental

- a) Longitud de onda: para establecer una longitud de onda de análisis fija se realizó un barrido de absorción UV (190 – 300 nm) de una disolución de vancomicina [25 µg/mL] disuelta en una solución de KH_2PO_4 5 mM pH2.8 : ACN (90:10), y así obtener su λ de máxima absorción.
- b) Fase estacionaria (columna): Se probaron 5 columnas cromatográficas de tipo C18 pero de distinto tamaño de partícula y de diferente longitud.
- c) Fase móvil: las 11 fases móviles evaluadas contenían solución amortiguadora de fosfatos y acetonitrilo, únicamente se modificó la proporción de fase orgánica, el pH y concentración de la solución amortiguadora de fosfatos.
- d) Velocidad de flujo: se ensayaron 5 diferentes velocidades de flujo en función del tiempo de retención requerido.
- e) Estándar interno: se probaron 3 moléculas diferentes, tinidazol, cafeína y trimetoprim.
- f) Método de extracción: se probaron tanto extracciones líquido- líquido como extracciones sólido-líquido, además de algunos agentes precipitantes. También se probaron los cartuchos: Sep-pak® Vac C18 3cc y Strata C18-E 1cc.

Al término del desarrollo del método analítico las condiciones cromatográficas y el método de extracción empleado se describen en las siguientes secciones:

4.3 Condiciones cromatográficas y método de extracción de vancomicina del fluido biológico.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para el análisis de vancomicina en plasma

Fase móvil	Solución reguladora de
	Fosfatos 50mM (pH 5 ± 0.05): acetonitrilo (9:1 v/v)
Columna cromatográfica	LiChrosorb 100 RP-18 (4.0 x 250 mm), 5 µm
Temperatura	Ambiente
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	100 µL
Longitud de onda	220 nm

Parte experimental

Para llevar a cabo la extracción del fármaco del fluido biológico se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) En un tubo eppendorf colocar 0.5 mL de muestra plasmática, adicionar 0.5 mL de agua destilada y agitar por 10 segundos en vórtex.
- 2) Acondicionar previamente los cartuchos Sep-Pak® Vac C18 3cc con 3mL de metanol HPLC, seguidos de 3mL de agua.
- 3) Transferir la muestra de plasma diluida al cartucho y pasar por este. Desechar residuos.
- 4) Lavar con agua 2 x 1.5 mL y desechar lavados.
- 5) Eluir la vancomicina con la solución de extracción 3 x 300 μ L. Recolectar en tubos los eluatos.
- 6) Centrifugar a 2000 g, durante 3 minutos los tubos con eluatos.
- 7) Evaporar a sequedad en B.M a 45 °C y bajo corriente de N₂ los tubos con eluatos.
- 8) Redisolver el residuo en 250 μ L de fase móvil, agitar en vórtex.
- 9) Inyectar al cromatógrafo 100 μ L de la solución anterior.

4.4 Preparación de soluciones

4.4.1 Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 5 \pm 0.05)

Pesar con exactitud 3.3916 g de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) y 0.0480 g de fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC, medir pH. Filtrar la solución a través de una membrana de 0.45 μ .

4.4.2 Acetonitrilo HPLC

Filtrar cantidad suficiente de acetonitrilo HPLC a través de membrana de 0.45 μ

4.4.3 Fase móvil.

Solución Amortiguadora de Fosfatos: Acetonitrilo (9:1 v/v); para 100 mL

Medir por separado y con la misma probeta, 90 mL de la solución amortiguadora de fosfatos y 10 mL de acetonitrilo HPLC; ya filtrados. Agregar siempre el buffer de fosfatos al ACN, posteriormente homogenizar. Desgasificar la solución en ultrasonido por 20 minutos sin vacío.

Parte experimental

4.4.4 Solución de extracción.

Solución Amortiguadora de Fosfatos: Acetonitrilo (50:50 v/v); para 50mL

Medir por separado con probeta 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 y 25 mL de acetonitrilo HPLC y mezclar.

4.4.5 Solución A.

Solución patrón de vancomicina (400 µg/mL)

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de vancomicina base seca y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver y llevar a volumen con fase móvil.

4.4.6 Solución B.

Dilución de la solución patrón de vancomicina (100 µg/mL)

Transferir cuantitativamente con pipeta automática 2 500 µL de la solución de A, a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil.

4.4.7 Solución C.

Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema

Transferir cuantitativamente con pipeta automática 2500 µL de la solución B, a un matraz volumétrico de 10mL. Esta solución contiene 25 µg/mL de vancomicina.

4.4.8 Preparación de la curva patrón en fase móvil

Realizar la preparación de la curva patrón de vancomicina de acuerdo a lo reportado en la Tabla 7.

Parte experimental

Tabla 7. Preparación de la curva patrón de vancomicina en fase móvil

Matraz	Alícuotas de solución de vancomicina (μL)	Solución de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para tomar alícuotas	Aforo (mL de fase móvil)	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1 250	A	10	50
2	900	A	10	36
3	750	A	10	30
4	5 000	50	10	25
5	5 000	30	10	15
6	2 400	25	10	6

4.4.9 Preparación de los puntos control de vancomicina en fase móvil.

Preparar cada uno de los puntos control alto, medio y bajo de vancomicina de acuerdo a lo reportado en la Tabla 8.

Tabla 8. Preparación de puntos control de vancomicina en fase móvil

Matraz	Alícuota de solución de vancomicina (μL)	Solución de vancomicina para tomar las alícuotas	Aforo (mL de fase móvil)	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1 100	A	10	44.0
2	2 000	B	10	20.0
3	800	B	10	8.0

4.4.10 Preparación de la curva patrón en plasma

Realizar la preparación de la curva patrón de vancomicina en plasma de acuerdo a lo reportado en la Tabla 9.

Parte experimental

Tabla 9. Preparación de la curva patrón de vancomicina en plasma

Matraz	Alícuotas de solución de vancomicina (μL)	Solución de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para tomar alícuotas	Aforo (mL de plasma)	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	625	A	10	25.0
2	225	A	5	18.0
3	375	A	10	15.0
4	2 500*	25	5	12.5
5	2 500**	15	5	7.5
6	150	100	5	3.0

* Alícuota tomada a partir del matraz 1 de la curva en plasma.

** Alícuota tomada a partir del matraz 3 de la curva en plasma.

4.4.11 Preparación de los puntos de control de vancomicina en plasma.

Preparar cada uno de los puntos control alto, medio y bajo de vancomicina en plasma de acuerdo a lo reportado en la Tabla 10.

Tabla 10. Preparación de puntos control de vancomicina en plasma

Matraz	Alícuota de solución de vancomicina (μL)	Solución de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Aforo (mL de plasma)	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	550	400	10	22.0
2	1000	100	10	10.0
3	400	100	10	4.0

La concentración de vancomicina en sistema (tablas 7 y 8) es dos veces la concentración en plasma para poder comparar ambas respuestas, debido a que empleando el método de extracción la vancomicina se reconstituye en la mitad del volumen utilizado para procesar la muestra.

Parte experimental

4.5 Validación del método analítico

4.5.1 Linealidad del método. Se evaluó la relación lineal entre concentración y respuesta cromatográfica, dentro del rango 3.0 a 25.0 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, para 3 gráficos de calibración, de acuerdo a la tabla 9, calculándose el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen. Resultado de la prueba página 47.

4.5.1.1 Exactitud de la curva de linealidad. Para determinar la exactitud de la curva de calibración, en cada punto se calculó la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación. Resultado de la prueba página 48.

4.5.2 Precisión.

4.5.2.1 Repetibilidad.

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de vancomicina en plasma. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación. Resultado en página 49.

4.5.2.2 Reproducibilidad entre días

Se analizó por quintuplicado durante tres días tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) del compuesto en plasma. De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación. Resultado en página 49.

Parte experimental

4.5.2.3 Reproducibilidad entre analistas

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado, por dos analistas diferentes, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de vancomicina en plasma. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación. Resultado en página 50.

Se realizó el análisis estadístico t-student para comparar los resultados obtenidos por los analistas.

4.5.3 Exactitud

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la desviación estándar absoluta (DEA) de las determinaciones en cada nivel de concentración conocida (alta, media y baja), empleando la siguiente relación matemática:

$$\% \text{ DEA} = \frac{(\text{Conc. Nominal}) - \text{Conc. Obtenida}}{\text{Conc. Nominal}} \times 100$$

1.5.4 Selectividad.

Se analizó la interferencia de los fármacos descritos en la tabla 11, utilizando como concentración de referencia el valor de $C_{\text{máx}}$ reportado en la literatura:

Parte experimental

Tabla 11. Fármacos evaluados para la selectividad del método

<i>Muestra adicionada de...</i>	<i>Concentración evaluada (µg/mL)</i>
Blanco de plasma	
Vancomicina	2.5
Ciprofloxacino	5.0
Meropenem	115.0*
Ceftriaxona	150.0**
Ceftazidima	170.0***
Cefepima	193.0****
Tienam® (Imipenem, Cilastatina)	69.0*****

* Concentración plasmática máxima tras una infusión intravenosa durante 30 minutos de una dosis única de 2 g. (MERREM®)

** Concentración plasmática máxima encontrada después de 30 min de una infusión intravenosa de 1.0 g. (CEFRADEN I.V.)

*** Concentración plasmática tras 5 minutos después de la inyección en bolo I.V. de 2 g. (FORTUM®)

**** Concentración plasmática tras 30 minutos después de la inyección en bolo I.V. de 2 g. (MAXIPIME®)

***** Concentración plasmática tras la infusión intravenosa (20 minutos) de 1g.(Tienam ®)

4.5.5 Recobro absoluto

Se analizaron por quintuplicado tres concentraciones conocidas de vancomicina en plasma (alta, media y baja), y se compararon con soluciones de vancomicina en fase móvil a concentraciones equivalentes. Se calculó el promedio del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración y por cada analista. El % de recobro absoluto se obtuvo mediante la siguiente relación matemática:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \frac{\text{Respuesta muestra}}{\text{Respuesta solución}} \times 100$$

Parte experimental

4.5.6 Límite de detección y cuantificación

Para el límite de detección se calculó la concentración cuya respuesta es 3 veces mayor a la respuesta promedio del blanco de plasma analizado por triplicado. Por su parte para el límite de cuantificación, se analizó por quintuplicado una concentración de 3.0 µg/mL. Ambos deben cumplir con los criterios mencionados en la tabla 12. Resultado en página 57.

4.5.7 Estabilidad de la muestra

Por medio de la pruebas de estabilidad se pueden determinar las condiciones y tiempo, bajo las cuales la vancomicina permanece estable y puede ser conservada antes de ser procesada y cuantificada. En todos los casos se evaluó la respuesta por duplicado a tres concentraciones conocidas (alta, media y baja), preparando cada día de análisis una curva de calibración, e interpolando en ella la respuesta obtenida de los puntos control. De igual modo se calculó el promedio de la desviación absoluta, el coeficiente de variación y la desviación estándar para cada nivel de concentración. Resultado en página 57.

4.5.7.1 Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo

Esta prueba sirve para conocer la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente y que permanece en la mesa de trabajo durante el proceso de análisis simultáneo de otras muestras. Para ello se prepararon por duplicado los puntos control de vancomicina en plasma, realizando dos series; una fue inyectada inmediatamente ($t = 0$ horas), y la otra se mantuvo 5 horas en la mesa de trabajo a temperatura ambiente y posteriormente fue procesada e inyectada al cromatógrafo.

En este caso 5 horas permite analizar 18 muestras.

Parte experimental

4.5.7.2 Estabilidad de la muestra sin reconstituir

Se prepararon dos series de los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado; una serie fue procesada e inyectada inmediatamente ($t = 0$ horas), la otra serie fue procesada, pero no se reconstituyó, se mantuvieron por 24 horas a 4°C , y pasado este tiempo se reconstituyeron en fase móvil y fueron inyectadas en el cromatógrafo

4.5.7.3 Estabilidad de la muestra reconstituida

Se prepararon los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado, en dos series; una serie fue procesada e inyectada inmediatamente ($t = 0$ horas) y la otra serie fue procesada y reconstituida pero se mantuvo por 24 horas a temperatura ambiente y dentro del autoinyector del cromatógrafo; pasado este tiempo las muestras fueron inyectadas y cuantificadas.

4.5.7.4 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación

Se prepararon los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado, en dos series; una fue procesada e inyectada inmediatamente ($t = 0$ horas) al cromatógrafo y la otra serie que sirvió de prueba fue sometida a 2 ciclos de congelación – descongelación, la temperatura de congelación fue de -20°C ; pasado el último ciclo la serie fue procesada y analizada.

4.5.7.5 Estabilidad de la muestra a largo plazo

Se prepararon por duplicado los puntos control de vancomicina en plasma, realizándose tres series; una fue inyectada inmediatamente ($t = 0$ horas), las otras dos fueron almacenadas a -20°C por 15 y 30 días; transcurrido el tiempo estipulado fueron procesadas e inyectadas al cromatógrafo.

En la tabla 12 se describen los criterios que se tomaron en cuenta para llevar a cabo la validación del método analítico desarrollado.

Parte experimental

Tabla 12. Criterios de aceptación para las distintas pruebas de validación, de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998

<i>Prueba de validación</i>	<i>Criterio de aceptación</i>
Linealidad del método	El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual 0.98.
Exactitud de la curva de linealidad	Para cada punto de la curva el %CV y %DEA deberán ser menores o igual al 15% excepto para el valor más bajo, que puede ser hasta del 20%.
Precisión	
Repetibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15%.
Reproducibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15%.
Exactitud	El valor promedio de las desviaciones absolutas de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro de $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.
Selectividad	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del compuesto a cuantificar (vancomicina).
Límite de detección	La concentración obtenida, cumple con los criterios de precisión y exactitud. El %CV no debe ser mayor al 20%.
Límite de cuantificación	El valor promedio de la concentración evaluada debe estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (exactitud) y no debe tener una variación mayor al 20% (preciso).
Estabilidad de la muestra	Los resultados obtenidos para los puntos control deben cumplir con los criterios de repetibilidad y exactitud.
Recobro absoluto	El porcentaje de recobro no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en los diferentes niveles de concentración.

Parte experimental

4.6 Aplicación clínica

Como ya fue mencionado en el capítulo de generalidades, la terapia con vancomicina está asociada a problemas nefrotóxicos y ototóxicos, recomendándose un monitoreo clínico de ésta. Debido a esto, una vez terminada la validación del método bioanalítico, este se utilizó para llevar a cabo el monitoreo clínico de vancomicina en pacientes internos en el área de terapia intensiva; obteniéndose muestras (1 hora post y pre-infusión) de pacientes hospitalizados en la unidad de terapia intensiva del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, cuyos datos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Datos demográficos de pacientes en la unidad de terapia intensiva del INNN

No. De registro	Género	Edad (años)	Fármacos administrados
189646	Masculino	53	Buprenorfina, cefepima, dexametazona, enoxaparina, hidrocortizona, isoniacida y omeprazol.
185333	Masculino	29	Buprenorfina, cefepima, enoxaparina, fosfossil, hidrocortizona, itraconazol, levotiroxina, milpar, ranitidina y TFH.
190039	Masculino	33	Albúmina, amikacina, cefepima, difenilhidantoína (DFH), fluticazona, gluconato de calcio, hidrocortizona, kepra, laxis, metoclopramida, omeprazol, temgesic, topamax, topiramato y vancomicina .
190106	Femenino	60	Albúmina, buprenorfina, cefepima, ciprofloxacina, difenilhidantoína, atorvastatina, gluconato de calcio, hidróxido de magnesio, itraconazol, nimodipino, nistatina, omeprazol, paracetamol y vancomicina .
189647	Femenino	17	Amikacina, buprenorfina, cefepima, enoxaparina, hidrocortisona, metoclopramida, omeprazol, paracetamol y vancomicina .



V. Resultados y análisis

Resultados y análisis

5 Resultados y análisis

5.1 Desarrollo del método analítico

5.1.1 Condiciones cromatográficas

5.1.1.1 Longitud de onda

Se encontraron discrepancias entre los distintos autores respecto a la longitud de onda de máxima absorción de la vancomicina; los cuales sugerían 190, 214, 216, 234, 280 y 290 nm. Por ello, se realizó un barrido para obtener el espectro UV del estándar de vancomicina a utilizar (figura 7) y determinar experimentalmente la longitud de máxima absorción. En un principio se eligió una longitud de onda de 230 nm; pero debido a que los componentes del plasma, generalmente absorben a esta longitud de onda y se optó por seleccionar la correspondiente a 220 nm.

En la figura 7 se presenta el espectro de absorción de la solución de vancomicina disuelta en fase móvil (Solución reguladora de fosfatos 5 mM, pH 5.0: ACN [90:10]), a una concentración de 25 µg/mL.

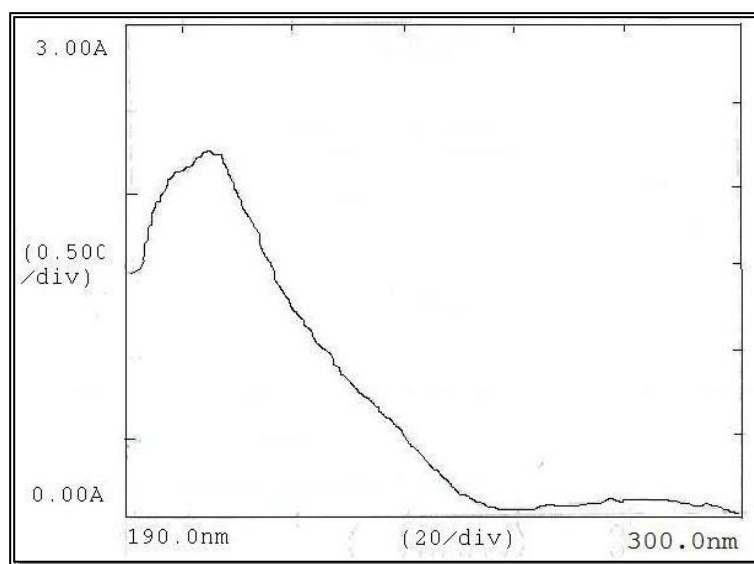


Figura 7. Espectro de absorción de vancomicina.

5.1.1.2 Columna cromatográfica

Al encontrar que en los artículos hacían referencia a columnas de distintas características; se procedió a evaluar las columnas cromatográficas indicadas en la tabla 14, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados y análisis

Tabla 14. Resultados obtenidos de la evaluación de las diferentes columnas.

Columna cromatográfica	Características			Resultado obtenido
	Longitud (cm)	Diámetro (mm)	Partícula (μm)	
Nova – pak® C ₁₈	15	3.9	4.0	Se encontraron tiempos de retención alrededor de 2 min, lo cual no era conveniente, ya que la mayor parte de los componentes del plasma, tienen ese mismo tiempo de retención. La respuesta era adecuada y los picos tenían buena simetría.
	Fase móvil: Soln. Amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 2.8: ACN (85:15) Flujo: 1.0 y 1.2 mL/min λ = 230nm			
μ Bondapak C ₁₈	30	3.9	5.0	El tiempo de retención osciló entre los 3 y 4 minutos probando distintas proporciones de fase móvil, pero había interferencia con un pico de los blancos de plasma, por lo que no era adecuada para el método.
	Fase móvil: Soln. Amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 2.8: ACN proporciones: (85:15) y (90:10). Flujo: 1mL/min λ = 230nm y 220 nm			
Hypersil ODS	20	4.6	5.0	El tiempo de retención fue de 7 minutos a flujo de 1.2 mL, pero los picos presentaban asimetría por coleo del pico. Tampoco fue adecuada para el método.
	Fase móvil: Soln. Amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 2.8: ACN (90:10). Flujo: 1.2 mL/min a 1.8 mL/min λ = 220 nm			
Zorbax SB-C ₁₈	25	4.6	5.0	Se obtuvieron picos simétricos a un tiempo de retención de 5.8 minutos. Pero presentó interferencia con pico de plasma.
	Fase móvil: Soln. Amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 4.0: ACN (90:10). Flujo: 1.0 mL/min λ = 220 nm			
LiChrosorb 100 RP-18	25	4.0	5.0	Se obtuvieron picos con altura adecuados para la cuantificación, el tiempo de retención sin precolumna fue de 6.0 minutos.
	Fase móvil: Soln. Amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5.0: ACN (90:10). Flujo: 1.0 mL/min λ = 220 nm			

Resultados y análisis

5.1.1.3 Fase móvil

De acuerdo a la literatura (Nozal M. 1996), se sabe que el pH de la fase móvil afectará proporcionalmente el tiempo de retención de la vancomicina, ya que a mayor valor de pH, mayor será su tiempo de retención. De igual modo se reporta en la literatura que la proporción de solvente polar – no polar afectará el tiempo de retención para la vancomicina, de manera que una proporción menor de solvente no polar (como lo sería el hexano, dietil éter, cloroformo, etc.) aumentará considerablemente el tiempo de retención; en cambio a menor cantidad de solvente polar (como H₂O, metanol, acetonitrilo, etc.) en la fase móvil, reducirá el tiempo de retención de la vancomicina en la fase estacionaria.

Por su parte la concentración de sales dentro de la fase móvil, cambiará la fuerza iónica y por lo tanto la respuesta del pico (altura y/o área bajo la curva), se verá afectada; en nuestro caso al aumentar la concentración de sales de fosfato en la fase móvil, la respuesta fue mayor.

En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos al emplear las diferentes fases móviles:

Tabla 15. Resultados obtenidos en la evaluación de diferentes fases móviles.

# Fase móvil	Fase móvil	Proporción	Resultado obtenido
1	Buffer de fosfatos 5mM pH 2.8 – ACN	85:15	Se disminuyó el tiempo de retención de la vancomicina, comparada con la proporción 90:10. De acuerdo a la columna empleada, las variaciones fueron desde 1min (para Nova – Pak), hasta 5 min (para Lichrosorb), las otras oscilaron dentro de este rango.
2	Buffer de fosfatos 5mM pH 2.8 – ACN	90:10	Generó los siguientes tiempos de retención: 2min, para la columna Nova-Pak, 9.5 min, para la μ Bondapak (en este caso el pico era de 2 min de ancho) y 7.5 min para la columna Hypersil ODS.
3	Buffer de fosfatos 10mM pH 2.8 – ACN	85:15	En todos los casos, la respuesta permaneció sin alteraciones considerables. El tiempo de retención no se vió modificado, respecto a la fase móvil 1.

Resultados y análisis

Tabla 15.(Continuación) Resultados obtenidos en la evaluación de diferentes fases móviles.

4	Buffer de fosfatos 10mM pH 2.8 – ACN	90:10	Tanto la respuesta como el tiempo de retención no tuvieron variaciones importantes respecto a la fase móvil 2. Los tiempos de retención aumentaron respecto a la fase móvil 3, de acuerdo con cada columna
5	Buffer de fosfatos 5mM pH 3.0 – ACN	90:10	Las respuestas (tiempo de retención y ABC) en comparación con la fase móvil 2 y 4, no cambiaron. En comparación con la fase móvil 1, el tiempo de retención de la vancomicina aumentó.
6	Buffer de fosfatos 5mM pH 4.0 – ACN	90:10	La repuesta (ABC) de los picos se vio disminuída en comparación con la fase móvil 2 y 5; ya que el tiempo de retención aumentó en aproximadamente 3 min, comparada con la fase 2, y en 1 min comparada con la fase móvil 5.
7	Buffer de fosfatos 5mM pH 5.0 – ACN	90:10	El ABC de los picos se vio disminuida, ya que el tiempo de retención de la vancomicina aumentó. El tiempo de retención aumentó considerablemente respecto a la fase móvil 2.
8	Buffer de fosfatos	90:10	En comparación con la fase móvil 7, no se vió modificada la respuesta.
9	10 mM pH 5.0 – ACN	91:9	En comparación con la fase móvil anterior, el tiempo de retención aumentó en 5 min. Para la columna LiChrosorb. El ABC y la altura del pico se vieron disminuidos.
10	Buffer de fosfatos 10 mM pH 5.0 – ACN	92:8	En comparación con la fase móvil 8, el tiempo de retención aumentó en 9 minutos. Para la columna LiChrosorb. El pico presentó coleo, y la altura y ABC, fueron más bajas respecto a las dos fases anteriores.
11	Buffer de fosfatos 50 mM pH 5.0 – ACN	90:10	Esta fase se evaluó utilizando las columnas LiChrosorb y Zorbax, presentando ambas un comportamiento semejante. El un tiempo de retención fue de 6 minutos aproximadamente y la altura del pico cromatográfico respecto a la fase móvil 8, fue mayor.

En todos los casos se utilizó un longitud de onda de 220 nm.

Además se probaron distintas velocidades de flujo de la fase móvil, para generar distintos tiempos de retención, los cuales variaron de acuerdo con la teoría; a menor flujo mayor tiempo de retención y viceversa. Se probaron los flujos: 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 y 1.8 mL/min.

Resultados y análisis

5.1.2 Selección del estándar interno

Se evaluaron 3 posibles moléculas que pudieran servir de estándar interno; estas fueron cafeína, tinidazol y trimetoprim, pero no fueron adecuadas para las condiciones cromatográficas empleadas; ya que la cafeína tuvo un tiempo de retención muy alto (16 minutos), y por lo tanto presentó coelución; por su parte el trimetoprim y el tinidazol presentaron un tiempo de retención cercano al de la vancomicina, lo que originó una mala resolución. Debido a eso no se empleó estándar interno en el método.

5.1.3 Método de extracción

En cuanto a la extracción líquido – líquido se probó con diclorometano sin precipitación y previa precipitación de proteínas con isopronanol – ACN (1:1); pero estas dos pruebas no fueron adecuadas, ya que en ambos casos los componentes del plasma presentaban interferencia en la cuantificación de la vancomicina.

Por su parte en la extracción en fase sólida, se probaron los cartuchos: Sep-pak® Vac C₁₈ y Strata C₁₈, resultando más adecuado el primer cartucho, ya que utilizando el cartucho Strata se obtenía una respuesta baja.

En el uso de los cartuchos también se probó sin precipitación de proteínas y con precipitación de ellas con los mismos solventes mencionados anteriormente; y se evaluaron distintos métodos de lavado y elución, probando para lavado de muestra entre H₂O, metanol y sus combinaciones H₂O–MeOH (95:5) y (90:10). Para la elución se trabajó con las fases: 1) buffer de fosfatos 50 mM pH 5.0 – ACN en proporciones (30:70) y (50:50); 2) Acetonitrilo–H₂O (50:50); 3) buffer de fosfatos 50 mM pH 2.8– ACN (50:50); 4) buffer de fosfatos 50 mM pH 4.0 – ACN en proporciones (50:50) y 5) Metanol y buffer de fosfatos 50 mM pH 2.8 – ACN en proporciones (50:50).

Finalmente se probó la cantidad de volúmenes de elución con el método que dió mejores resultados de recobro; probando las siguientes: a) 2 volúmenes de elución de 400 µL; b) 2 de 250µL y uno de 300 µL; y c) 3 volúmenes de 300 µL. Dando este último un mejor recobro del fármaco.

Resultados y análisis

5.2 Optimización del método analítico

Una vez obtenido el mejor método de extracción en fase sólida (descrito en la página 30); y obtenidas las mejores condiciones cromatográficas (tabla 6), se optimizó el método utilizando una precolumna Phenomenex® C18 (4.0 x 3.0) mm para así conservar la vida útil de la columna, ya que la mejor fase móvil presentó una alta concentración de fosfatos lo que deteriora considerablemente a la fase estacionaria. El empleo de dicha precolumna, da como resultado el incremento en aproximadamente de 0.5 a 1.0 minuto, el tiempo de retención de la vancomicina.

En definitiva el mejor método analítico para la cuantificación de la vancomicina es el que quedó descrito en la parte experimental en el numeral 4.3 del capítulo 4 (página 29 y 30).

5.3 Validación del método analítico

5.3.1 Linealidad del método

En la tabla 16 y en la figura 8 se presentan los resultados obtenidos de las 3 curvas de vancomicina en plasma; obteniéndose una correlación lineal entre respuesta (área bajo la curva) y concentración, con un coeficiente de correlación de 0.9978 y un CV menor a 15 % para cada nivel de concentración:

Tabla 16. Linealidad del método analítico

Vancomicina µg/mL	Área Bajo la Curva (ABC)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V. (%)
3.0	1900513	1764510	1612050	1759024	8.2
7.5	3781740	3069028	3843051	3564606	12.1
12.5	6479393	5795717	5633226	5969445	7.5
15.0	8018002	6570857	7536373	7375077	10.0
18.0	9278154	8558507	9195747	9010803	4.4
25.0	11636211	10976760	12872616	11828529	8.1
Pendiente	458509.6	436639.3	513584.26		
Intercepto	659122.4	227932.7	-151210.41		
Coefficiente de Correlación	0.9991	0.9953	0.9991		

Resultados y análisis

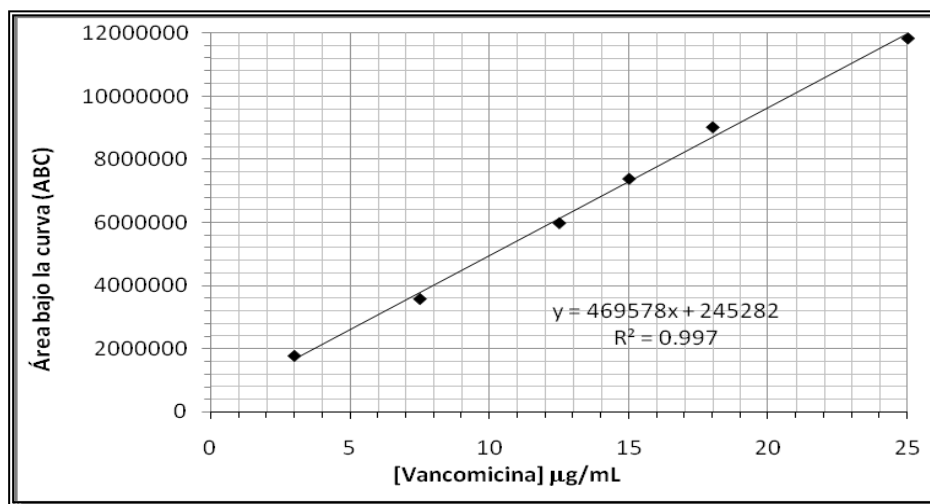


Figura 8. Gráfico de linealidad del método analítico

5.3.1.1 Exactitud de la curva de linealidad:

En la tabla 17 se presentan los resultados de exactitud para cada uno de los puntos de la curva. En ella se observa que en todas las concentraciones, la desviación estándar absoluta fue menor al 15%.

Tabla 17. Concentración recuperada de vancomicina.

Vancomicina µg/mL	Concentración recuperada					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V. (%)	% DEA
3.0	2.7	3.5	3.4	3.2	13.8	7.3
7.5	6.8	6.5	7.8	7.0	9.4	6.2
12.5	12.7	12.8	11.3	12.2	6.9	2.1
15.0	16.0	14.5	15.0	15.2	5.2	1.2
18.0	18.8	19.1	18.2	18.7	2.4	3.8
25.0	23.9	24.6	25.4	24.6	2.9	1.4

Resultados y análisis

5.3.2 Precisión y Exactitud

5.3.2.1 Repetibilidad

En la tabla 18 se presentan los resultados de la concentración recuperada de vancomicina obtenidos para los puntos control alto, medio y bajo. En ella se puede observar que el método analítico desarrollado es repetible; ya que el coeficiente de variación para los datos es menor del 15%, y es exacto ya que la desviación estándar absoluta para cada nivel de concentración es menor al 15%.

Tabla 18. Repetibilidad y exactitud del método analítico

Réplica	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	4.0	10.0	22.0
1	3.89	10.08	21.31
2	3.73	10.19	20.44
3	4.44	10.99	21.92
4	3.83	10.15	22.87
5	3.84	9.77	21.15
Promedio	3.94	10.23	21.54
D.E.	0.28	0.45	0.91
C.V. (%)	7.14	4.42	4.24
Exactitud % DEA	1.40	2.34	2.10

5.3.2.2 Reproducibilidad entre días

Los resultados de reproducibilidad se presentan en la tabla 19. En ella se puede observar que el método es reproducible y exacto, ya que tanto el coeficiente de variación como la desviación absoluta, son menores al 15%, para cada nivel de concentración evaluado.

Resultados y análisis

Tabla 19. Reproducibilidad entre días y exactitud del método analítico

Día	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.83	8.14	23.24
	3.79	9.86	25.16
	3.61	9.96	26.48
	3.38	9.93	23.97
	3.47	10.24	26.21
2	3.74	8.25	22.84
	3.83	10.15	22.87
	4.44	10.99	21.92
	4.47	9.24	23.73
	3.89	10.08	21.31
3	3.73	10.19	20.44
	3.84	9.77	21.15
	4.25	11.76	25.11
	3.90	10.68	27.86
	4.16	10.38	24.04
Promedio	3.95	9.97	23.76
D.E.	0.40	0.93	2.13
C.V. (%)	10.13	9.28	8.95
Exactitud % DEA	1.13	0.27	7.98

5.3.2.3 Reproducibilidad entre analistas

En la tabla 20 se presentan los datos de reproducibilidad entre dos analistas; en ella se muestra que el método es reproducible y exacto, ya que los valores de la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación no son mayores al 15% para cada nivel de concentración.

Resultados y análisis

Tabla 20. Reproducibilidad y exactitud del método analítico entre analistas

Réplica		Concentración de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)		
		4.0	10.0	22.0
Analista 1	1	3.74	8.25	22.84
	2	3.83	10.15	22.87
	3	4.44	10.99	21.92
	4	4.47	9.24	23.73
	5	3.89	10.08	21.31
Analista 2	6	3.73	10.19	20.44
	7	3.84	9.77	21.15
	8	4.25	11.76	25.11
	9	3.90	10.68	27.86
	10	4.16	10.38	24.04
Promedio		4.02	10.15	23.13
D.E.		0.28	0.96	2.20
C.V. (%)		7.02	9.43	9.52
Exactitud % DEA		0.62	1.47	5.12

Además se procedió a realizar un análisis estadístico, aplicando la prueba paramétrica t-Student para los datos, con ello se comprobó que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos por cada analista y con esto se asevera que el método es reproducible.

El modelo matemático t-Student que en seguida se presenta, aplica para dos muestras independientes.

Resultados y análisis

Donde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

\bar{X}_1 = valor promedio del grupo 1.

\bar{X}_2 = valor promedio del grupo 2.

σ_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos.

N_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

N_2 = tamaño de la muestra del grupo 1.

Ecuación para obtener la desviación estándar ponderada:

Donde:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{SC_1 + SC_2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

σ_p = desviación estándar ponderada.

SC = suma de cuadrados de cada grupo.

N = tamaño de las muestras 1 y 2.

Cálculo del estadístico t-Student para los datos de reproducibilidad del método analítico entre analistas.

Tabla 21. Resultados del estadístico t-Student.

	Control bajo		Control medio		Control alto	
	2	1	2	1	2	1
Promedio =	3.98	4.07	10.56	9.74	23.72	22.53
Desviación =	0.22	0.35	0.75	1.04	3.02	0.94
Varianza =	0.05	0.12	0.56	1.08	9.14	0.88
$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	0.09		-0.82		-1.19	
σ_p^2	0.109		1.025		6.263	
Σ	0.329		1.013		2.503	
$\sigma (1/N_1 + 1/N_2)^{1/2}$	0.20838		0.64042		1.58277	
$t_c =$	<u>0.47</u>		<u>-1.28</u>		<u>-0.75</u>	

$\alpha = 0.05$

$t_{8, 0.975} = \pm 2.31$

g.l. = 8

$N_1 = 5$

$N_2 = 5$

Hipótesis estadísticas:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Nota: 1=analista 1, 2=analista 2, σ_p = desviación estándar ponderada, t_c = t-Student calculada, σ_p^2 = varianza ponderada, α = nivel de significancia, g.l. = grados de libertad, Σ = Suma de cuadrados.

Dado que la t- Student calculada en todos los casos, está dentro del rango de -2.31 a $+2.31$, con 95% de confianza ($\alpha= 0.05$) se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos por analista 1 y analista 2.

Resultados y análisis

5.3.3 Selectividad

Después de evaluar la interferencia de los analitos mencionados en la parte experimental, se detectó una respuesta debida a los blancos de plasma, que con la metodología descrita no se logró eliminar del todo en el proceso de extracción en fase sólida del fármaco; es por ello que se debe tener especial cuidado en ese punto.

Tabla 22. Selectividad del método analítico

Analito	Tiempo de retención (min)
<i>Vancomicina</i>	7.0
Blanco de plasma	No detectado
Ciprofloxacino	No detectado
Meropenem	4.2
Ceftriaxona	No detectado
Ceftazidima	3.7
Cefepima	No detectado
Imipenem y Cilastatina	8.5

En las figuras siguientes se muestran los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras de pacientes, muestras adicionadas de vancomicina y blanco de plasma.

Resultados y análisis

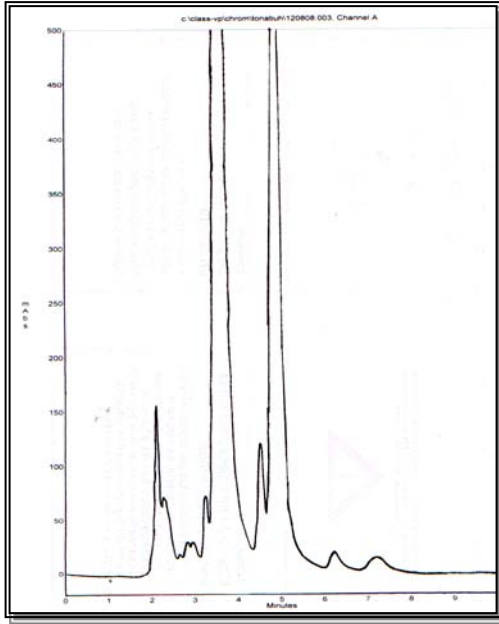


Figura 9. Cromatograma típico de blanco de plasma tratado por el método analítico.

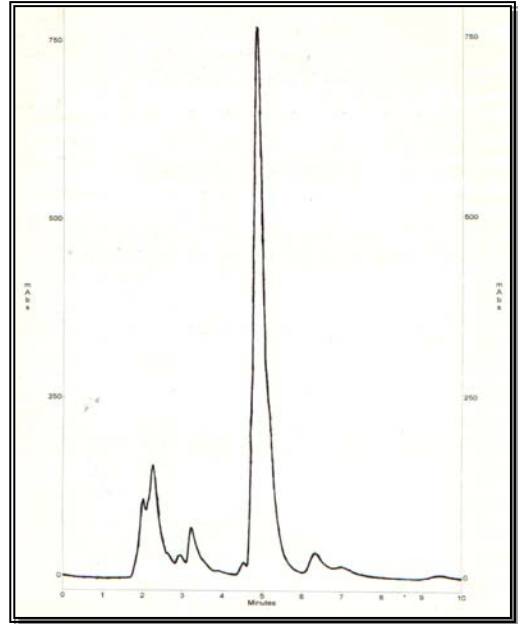


Figura 10. Cromatograma típico de blanco de plasma tratado por el método analítico.

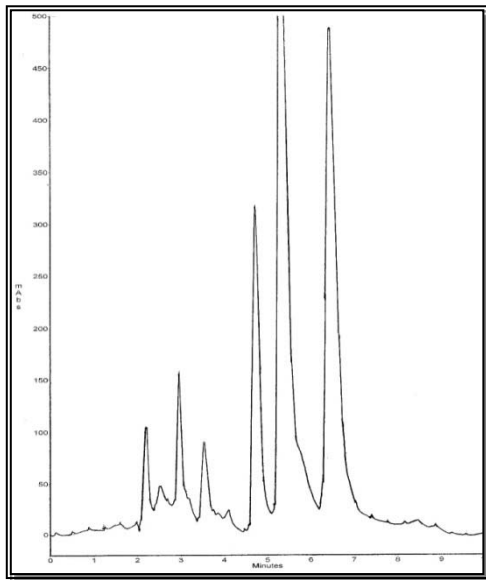


Figura 11. Cromatograma de muestra de plasma #190106, de paciente tratado con vancomicina.

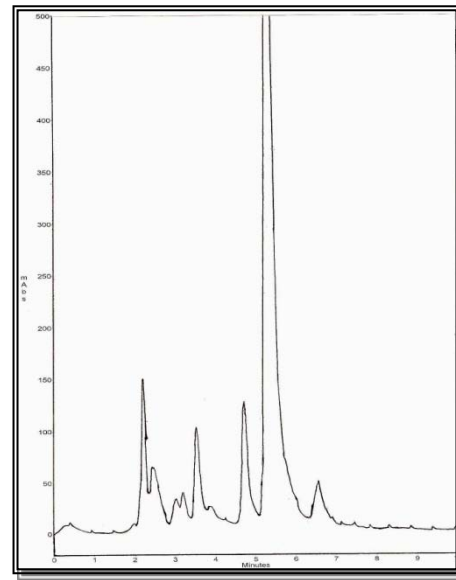


Figura 12. Cromatograma de una muestra de plasma de paciente sin tratamiento con vancomicina.

Resultados y análisis

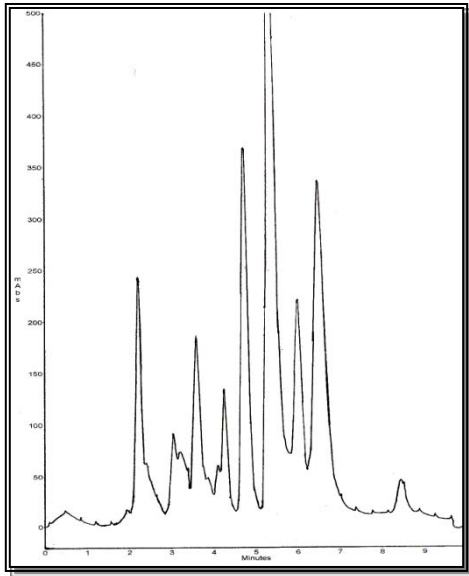


Figura 13. Cromatograma de la muestra de plasma #190039 sin diluir, de paciente tratado con vancomicina. Muestra tomada post-infusión.

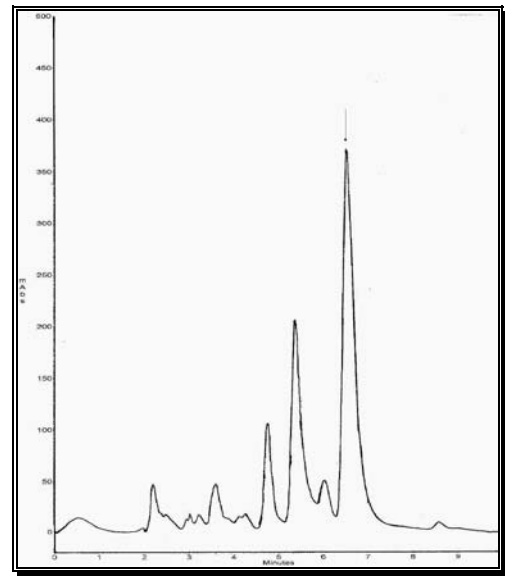


Figura 14. Cromatograma de la muestra #190039, de paciente tratado con vancomicina. Muestra tomada post-infusión y diluida (1:3).

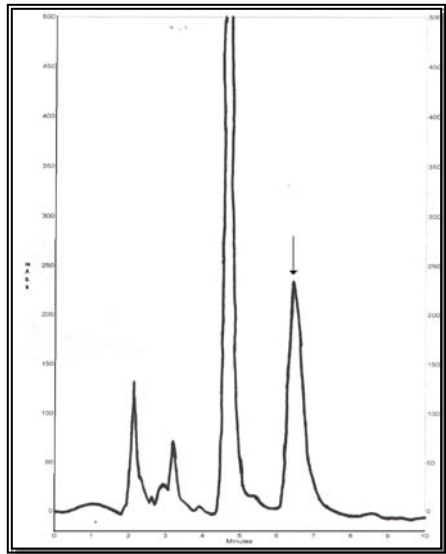


Figura 15. Cromatograma de una muestra plasmática de paciente administrado con vancomicina. Muestra # 189647

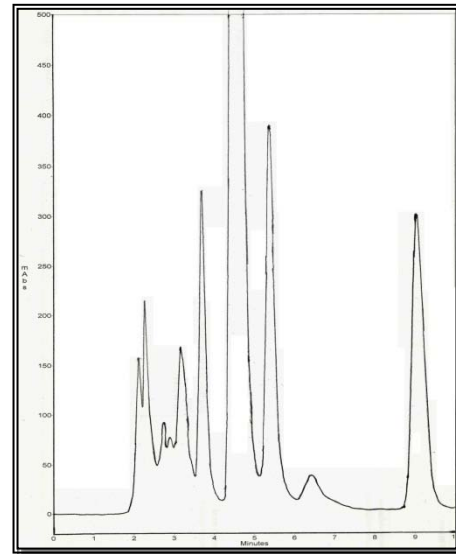


Figura 16 Cromatograma de una muestra de plasma de paciente que no era tratado con vancomicina.

Resultados y análisis

5.3.4 Recobro absoluto

Para determinar el recobro absoluto se evaluó por quintuplicado y por cada analista para cada nivel de concentración de vancomicina en plasma (método) y en solución (sistema) y se calculó el promedio del porcentaje recuperado de vancomicina por nivel, posteriormente por analista y finalmente el promedio general, obteniéndose como resultado un recobro absoluto de 74.3 ± 3.25 %. Como se puede observar en la tabla 23, el porcentaje de recobro absoluto fue constante para los niveles de concentración de vancomicina establecidos.

Tabla 23. Recobro absoluto (%)

[Vancomicina] ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 1		Recobro	Analista 2		Recobro	
	Áreas			Áreas			
	Sistema	Método		Sistema	Método		
4.0	2534158	1772111	68.9	2908023	2242078	75.1	
	2574289	1812967		2822912	2038533		
	2647192	2101176		2774708	2095348		
	2849357	2118166		2737193	1905991		
	3400002	1840274		2718963	2200331		
Promedio	2801000	1928939		2792360	2096456		
10.0	6421677	3903762	74.1	6303600	4615486	73.4	
	6260749	4802003		6513034	4423395		
	6252925	5199768		6553141	5321555		
	6181380	4371377		6573812	4834286		
	6000602	4769103		6593451	4698619		
Promedio	6223467	4609203		6507408	4778668		
22.0	13438830	10806859	78.9	13382138	9235370	75.4	
	13931852	10823851		14202504	9552900		
	13873956	10374521		14403530	11338332		
	13538800	11229522		14525804	12581486		
	12824862	10083744		14547392	10858210		
Promedio	13521660	10663699		14212274	10713260		
	Promedio parcial =		73.9	Promedio parcial =		74.6	Promedio total
						74.3	

Resultados y análisis

5.3.5 Límite de cuantificación y límite de detección

De acuerdo a la metodología descrita, se encontró que el límite de cuantificación fue de 3.0 µg/mL con un coeficiente de variación de 10.2 % y desviación estándar absoluta de 10.6 %; el límite de detección fue de 2.5 µg/mL con un coeficiente de variación de 12.8% y una desviación estándar absoluta de 15.0%; por lo que se consideran válidos los valores de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998, ya que ambos están por debajo el 20% de coeficiente de variación y desviación absoluta, a que hace referencia.

5.3.6 Estabilidad de la muestra

Después de evaluar aquellas condiciones que pudieran afectar la cuantificación de vancomicina; se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 24 a la 30 que se muestran subsecuentemente.

5.3.6.1 Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo

Los resultados para la estabilidad de la vancomicina mantenida a temperatura ambiente en la mesa de trabajo por 5 horas, se reporta en la tabla 25 y se compara con muestras analizadas a tiempo cero (tabla 24).

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 25. Estabilidad de la muestra plasmática en la mesa de trabajo

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.41	9.04	18.72
2	3.70	10.32	20.49
Promedio	4.05	9.68	19.61
D.E	0.50	0.90	1.25
C.V. (%)	12.33	9.32	6.37
% DEA	1.34	3.19	10.88

Resultados y análisis

Se puede observar que la vancomicina permanece estable durante 5 horas a temperatura ambiente; ya que el porcentaje del coeficiente de variación y de la desviación estándar absoluta son menores al 15%, lo cual indica que no se ve afectada la cuantificación de la muestra si permanece bajo estas condiciones.

5.3.6.2 Estabilidad de la muestra sin reconstituir

En la tabla 26 se muestran los resultados para la estabilidad de la vancomicina en muestras procesadas pero sin reconstituir y mantenidas a 4 °C por 24 horas. En esta se observa que la vancomicina es estable por 1 día conservándola sin reconstituir en refrigeración a 4 °C, ya que su coeficiente de variación y desviación absoluta son menores al 15%, como lo marcan las especificaciones. Además al comparar los puntos control de las muestras en estabilidad con los de las muestras a tiempo cero, se puede apreciar que no hubo cambios significativos en las muestras analizadas.

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 26. Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.19	9.50	20.09
2	3.74	8.95	21.16
Promedio	3.97	9.22	20.63
D.E	0.32	0.39	0.75
C.V. (%)	8.02	4.22	3.64
% DEA	0.79	7.76	6.25

5.3.6.3 Estabilidad de la muestra reconstituida

Al evaluar la estabilidad de la vancomicina reconstituida en fase móvil y que permaneció en el autoinyector por 24 horas a temperatura ambiente, se encontró que bajo estas condiciones no se afecta la cuantificación de la vancomicina; ya que al comparar con los datos de las muestras analizadas a tiempo cero, los porcentajes de coeficiente de variación y desviación absoluta son similares y además están dentro del criterio de aceptación.

Resultados y análisis

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 27. Estabilidad de la muestra procesada y mantenida a temperatura ambiente.

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.72	8.82	20.26
2	3.97	10.48	21.00
Promedio	4.35	9.65	20.63
D.E	0.53	1.17	0.53
C.V. (%)	12.19	12.18	2.55
% DEA	8.72	3.53	6.23

5.3.6.4 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28, en ella se observa que la vancomicina permanece estable en la matriz biológica después de 2 ciclos de congelación descongelación a -20 °C, ya que el porcentaje de coeficiente de variación y la desviación absoluta, son menores al 15% y además no se presentan diferencias importantes entre estos y los correspondientes valores a tiempo cero.

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 28. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación – descongelación

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.31	9.27	19.90
2	4.72	9.92	19.81
Promedio	4.52	9.60	19.86
D.E	0.29	0.46	0.06
C.V. (%)	6.47	4.81	0.31
% DEA	12.89	4.02	9.74

Resultados y análisis

5.3.6.5 Estabilidad de la muestra a largo plazo

Después de almacenar las muestras plasmáticas adicionadas de vancomicina a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 y 30 días, se encontró que la vancomicina es estable en la matriz biológica por 15 días, ya que los valores encontrados de % de coeficiente de variación y desviación absoluta, se encuentran dentro de especificaciones, y al compararlo con aquellos de tiempo cero, no se presenta diferencia significativa entre ambos, los resultados se presentan en la tabla 29. Se observó que la concentración baja se ve afectada en un lapso de tiempo mayor bajo esta misma condición de almacenamiento, ya que la desviación absoluta para los datos a 30 días, está por arriba de especificaciones, así como la cantidad recuperada de vancomicina es mayor a la teórica, lo cual indicaría que existe algún componente que origina un aumento en la señal; y esto se interpreta como inestabilidad de la vancomicina en plasma. Los resultados se muestran en la tabla 30.

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 29. Estabilidad a largo plazo ($t=15$ días)

Muestra	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.23	10.53	21.63
2	4.33	10.19	19.81
Promedio	4.28	10.36	20.72
D.E	0.07	0.24	1.29
C.V. (%)	1.67	2.35	6.21
% DEA	6.89	3.60	5.80

Resultados y análisis

Tabla 24. Concentración inicial de muestras de vancomicina

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.37	9.17	19.93
2	4.53	10.54	21.06
Promedio	4.45	9.85	20.49
D.E	0.11	0.96	0.80
C.V. (%)	2.54	9.79	3.91
% DEA	11.26	1.46	6.85

Tabla 30. Estabilidad a largo plazo (t= 30 días)

Muestra	Concentración de vancomicina (µg/mL)		
	4.0	10.0	22.0
1	5.34	8.67	20.89
2	4.78	9.46	19.81
Promedio	5.06	9.06	20.35
D.E	0.40	0.55	0.76
C.V. (%)	7.88	6.09	3.75
% DEA	26.50	9.35	7.49

Cabe añadir que los resultados de las estabilidades se pueden ver afectados por el bajo número de repeticiones en cada nivel de concentración, por lo que al aumentar el número de réplicas se disminuyen los valores de desviación y coeficientes de variación; esto conlleva a tomar en cuenta, por ejemplo, los criterios para evaluar estabilidad de acuerdo a las guías de la FDA, donde se piden tres puntos control (alto, medio y bajo) por triplicado para evaluar la estabilidad de las muestras biológicas.

5.4 Aplicación clínica

Una vez validado el método bioanalítico, se realizó la cuantificación de vancomicina en muestras plasmáticas de pacientes internados en la unidad de terapia intensiva del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), para demostrar que el método puede ser empleado en las unidades hospitalarias para realizar monitoreo clínico de la vancomicina.

Una muestra fue obtenida 1 hora post-infusión y tuvo que ser diluida para obtener una respuesta cuantificable; las demás muestras se obtuvieron una hora antes de la infusión. Los resultados obtenidos se toman como válidos debido a que el coeficiente de variación y la desviación absoluta de los puntos control son menores al 15%. Así mismo, la curva cumplió con los parámetros de linealidad y desviación estándar absoluta para cada nivel de concentración, por ello es válida para la interpolación de los puntos control y de las muestras de los pacientes a analizar.

Resultados y análisis

A continuación se resumen los datos obtenidos durante la aplicación clínica:

Tabla 31. Datos de linealidad para cuantificar las muestras

Vancomicina $\mu\text{g/mL}$	Respuesta	Concentración recuperada	% Desviación absoluta
3.0	2152975	3.0	1.3
7.5	4389576	7.3	3.2
12.5	7181293	12.5	0.3
15.0	8571785	15.2	1.1
18.0	10168819	18.2	1.0
25.0	13689852	24.8	0.7
Pendiente =	529555.2		
Intercepto =	543388.0		
R² =	0.9995		
R =	0.9998		

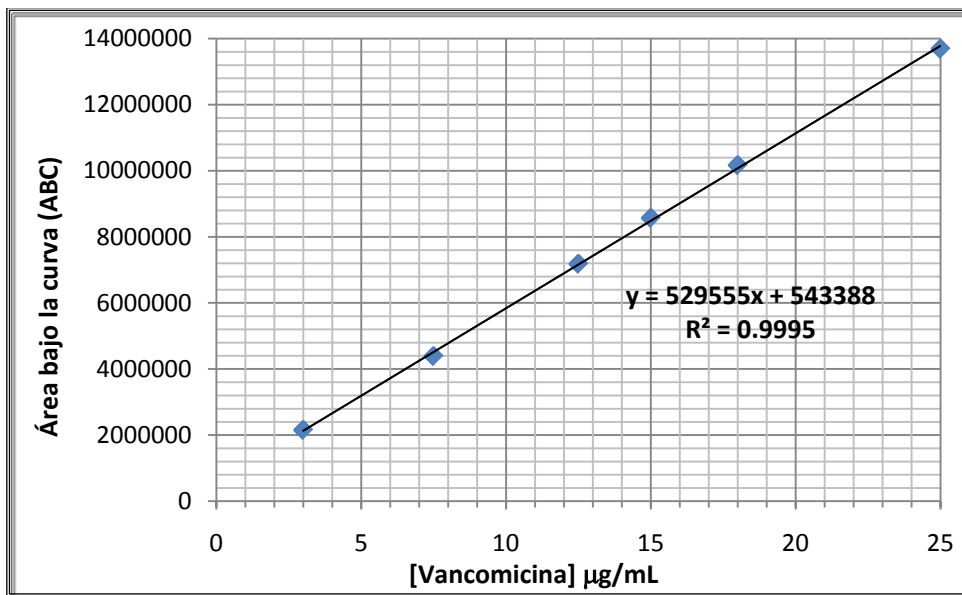


Figura 17. Gráfico de linealidad para cuantificar las muestras

Resultados y análisis

Tabla 32. Puntos control para la cuantificación de muestras plasmáticas

Muestra	Concentración de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	4.0	10.0	22.0
1	4.79	9.66	20.87
2	4.08	10.12	19.38
Promedio	4.43	9.89	20.12
D.E	0.50	0.32	1.05
C.V. (%)	11.34	3.28	5.24
% DEA	10.81	1.12	8.54

Tabla 33. Concentración de vancomicina en las muestras plasmáticas de pacientes

No. De registro	Género	Edad (años)	Concentración de vancomicina [$\mu\text{g/mL}$]
189646	Masculino	53	Paciente no tratado con vancomicina
185333	Masculino	29	Paciente no tratado con vancomicina
190039	Masculino	33	Postinfusión = 34.3 Preinfusión = 7.7
190106	Femenino	60	14.5
189647	Femenino	17	14.2

Con los resultados obtenidos, se demostró que el método bioanalítico validado puede ser empleado para llevar a cabo el monitoreo clínico de pacientes tratados con vancomicina, sin que se presente interferencia de otros fármacos administrados conjuntamente.



6. Conclusiones

Con el presente trabajo se lograron alcanzar los siguientes objetivos:

- ✓ Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de vancomicina en plasma humano mediante extracción del fármaco en fase sólida, aplicando cromatografía de líquidos con detección UV.
- ✓ El método desarrollado fue validado satisfactoriamente ya que resultó ser selectivo, lineal, preciso y exacto dentro del rango establecido, además de obtener un recobro aceptable.
- ✓ La vancomicina resultó contar con buena estabilidad en la muestra tanto procesada como no procesada para periodos cortos (24 horas) y tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. También se obtuvo buena estabilidad al someterse a dos ciclos de congelación-descongelación y en congelación a largo plazo por 15 días.
- ✓ Mediante la aplicación clínica se demostró que el método desarrollado y validado puede ser utilizado para monitorear los niveles plasmáticos de vancomicina.

VII. Bibliografía

Bibliografía

1. *A century of separation science*. ú.e., New York, Marcel Dekker, Inc., 2002, pages 1–5, 10–12.
2. BACKES D. W., et al. *Quantitation of vancomycin and its crystalline degradation product (CDP-1) in human serum by high performance liquid chromatography*. J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1998) 1281–1287.
3. BAUCHET J., et al. *Determination of vancomycin in serum and tissues by column liquid chromatography using solid-phase extraction*. J. Chromatogr. 414 (1987) 472–476.
4. BRAITHWAITE, A. and F. J. Smith. *Chromatographic methods*. 4th ed., London, Chapman & Hall, 1985, pages 1–5, 212–255.
5. Colegio Nacional de QFB, AC. *Guía de validación de métodos analíticos*. 2001
6. FARIN D., et al. *A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX)*. J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 367–372.
7. FAVETTA P., et al. *New sensitive assay of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection*. J. Chromatogr. B 751 (2001) 377–382
8. FLOREZ J., et al. *Farmacología humana*. 4^a ed., Barcelona, Masson S.A., 2004, pág. 1141–1144.
9. Food Drug Administration. *Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation*. Mayo 2001.
10. FUNG, Ho Win, et al., *Training Guide, High Performance Liquid Chromatography. Valid Analytical Measurement*, UK, November 2000, pp. 35.
11. GENNARO, R. A. *Remington. Farmacia*. Tomo II, 20^a ed., Buenos Aires, Editorial Médica – Panamericana, 2003, pág. 1840–1841.
12. GOODMAN & Gilman's. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed., USA, McGraw–Hill, 2006, pages 1194–1196, 1883.
13. *Hawley. Diccionario de Química y de productos químicos*. Barcelona, Ediciones Omega S.A., 1993, pág. 1016.
14. JEHL F., et al. *Determination of Vancomycin in Human Serum by High-Pressure Liquid Chromatography*. Antimicrob. Agents Chemother. 27 (1985) 4: 503–507.
15. JOHNSON J. L. H., et al. *Reformulation of a New Vancomycin Analog: An Example of the Importance of Buffer Species and Strength*. AAPS Pharm. Sci. Tech. 7 (2006) 1: 1–5.
16. LUKŠA J., et al. *Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human plasma*. J. Chromatogr. B 667 (1995) 277–281.

Bibliografía

17. LUNDY M. J. et al. *Vancomycin quantitation by high-performance liquid chromatography in human serum*. J. Chromatogr. 231(1982) 463–466.
18. *Martindale. Guía completa de consulta farmacéutica*. 2ª ed., Barcelona, Pharma Editores, 2006, pág. 389 – 391.
19. NIETO M., et al. *Physicochemical properties of vancomycin and iodovancomycin and their complexes with diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine*. Biochem. J. 123 (1971) 77 – 787.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
21. NOZAL M. J. Del., et al. *High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug*. J. Chromatogr. A 727 (1996) 231–238.
22. SKOOG, Douglas A., et al. *Química Analítica*. 7ª ed., México, McGraw–Hill, 2001, pág. 667–679, 703–709, 715.
23. *The Merck Index*. 13th ed., USA, Merck & Co., Inc., 2001, page 1768.
24. TOBIN C. M. et al. *Vancomycin therapeutic drug monitoring: is there a consensus view? The results of a UK National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) for antibiotic assays questionnaire*. J. Antimicrob. Chemotherapy 50 (2002) 713 – 718.
25. *United State Pharmacopeia*. USP 30 NF 25, U. S., Pharmacopeia the standard of Quality, 2007, pág. 272–277.
26. *Vademecum Farmacéutico IPE*. 10ª ed., Colombia, Rezza Editores S. A., 2001, pág. 2454–2455.
27. VERA López K. J., et al. *Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. B 860 (2007) 241–245.
28. SETTLE, F. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. USA, Prentice-Hall, 1997.



VIII. Anexo

Anexo

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
AcONH ₄	Acetato de amonio
BM	Baño María
Cl	Depuración
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C _{Máx}	Concentración máxima
Cl _r	Depuración renal
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
DEA	Desviación estándar absoluta
FDA	Food & Drug Administration
FM	Fase móvil
g.l.	Grados de libertad
HCl	Ácido clorhídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.V.	Intravenoso(a)
K ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
ODS	Octadecilsilano
Pp	Precipitación
R	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
RA	Reactivo analítico
SI	Internal estándar (Estándar interno)
SPE	Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
TCA	Ácido tricloroacético

UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO: 000	Hoja 1 de 12
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

1. OBJETIVO:

Determinación cuantitativa de vancomicina en plasma humano utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución y extracción en fase sólida.

1. ALCANCE:

Todos los analistas involucrados en la aplicación de este método analítico.

2. NOTAS PARA EL ANALISTA:

El analista debe mantener las sustancias de referencia utilizadas, bajo las especificaciones de las hojas de registro.

Las alícuotas de plasma son extraídas por medio de un método de extracción sólido-líquido, utilizando metanol como disolvente para la activación de los cartuchos, por lo que se requiere de equipo de seguridad como guantes y lentes de seguridad.

3. PROCEDIMIENTO:

Materiales

- 4.1.1 Matraces volumétricos: 5, 10, 25, 50 y 500 mL
- 4.1.2 Nave de pesado
- 4.1.3 Espátula
- 4.1.4 Pipetas automáticas: 100-1000 y 500-5000 µL
- 4.1.5 Puntas para pipetas automáticas
- 4.1.6 Probetas: 100 y 500 mL
- 4.1.7 Sistemas de filtración Millipore
- 4.1.8 Membranas de Filtración Nylon, 0.45µ y 47 mm de diámetro
- 4.1.9 Microviales: 300 µL
- 4.1.10 Tapas y septas para microviales
- 4.1.11 Camisas para microviales
- 4.1.12 Pipetas Pasteur
- 4.1.13 Tubos eppendorf: 2mL
- 4.1.14 Tubos de ensayo silanizados: 10 mL

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 2 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

- 4.1.15 Gradilla para tubos de ensaye
- 4.1.16 Piseta
- 4.1.17 Bulbos
- 4.1.18 Vasos de precipitados: 100, 250mL
- 4.1.19 Guantes
- 4.1.20 Cartuchos Sep-Pak® Vac 3cc (500mg) C₁₈
- 4.1.21 Recipientes de vidrio de diferentes tamaños

Reactivos

- 4.2.1 Agua, grado HPLC.
- 4.2.2 Acetonitrilo HPLC. Mallinckrodt 2856 C36D51
- 4.2.3 Metanol HPLC. J.T. Baker G06C06
- 4.2.4 Fosfato monobásico de potasio (cristales). J.T. Baker E35C09
- 4.2.5 Fosfato dibásico de potasio (polvo). J.T. Baker X34C20
- 4.2.6 Nitrógeno industrial. INFRA

Equipos

- 4.3.1 Balanza Analítica Sartorius
- 4.3.2. Sistema Desionizador de agua Milli-Q System-Waters
- 4.3.3. Sistema Cromatográfico Shimadzu
 - Bomba Mod. LC-10AT, Serie 4035IA
 - Controlador Mod. SCL-10A, Serie 60058ER
 - Detector UV-VIS Mod. SPD-10AV, Serie 40071D
 - Autoinyector Mod. SIL-10A, Serie 70042G
 - Computadora COMPAC Presario 4102, software Shimadzu Class-VP™
- 4.3.4. Ultrasonido Fisher Scientific
 - Mod. FS60
- 4.3.5 Potenciómetro ThermoOrion
 - Mod. 410

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 3 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

- No. Serie 058090
- 4.3.6 Centrifuga eppendorf
Mod. 5416
No de serie 5416B01202
- 4.3.7 Baño de agua LAB-LINE
- 4.3.8 Manifold System SUPELCO
- 4.3.9 Vórtex GENIE-2
Mod. G650
- 4.3.10 Columna LiChrosorb 100 RP-18 (4.0 x 250.0)mm, 5µm
- 4.3.11 Precolumna Phenomenex® C18 (4.0 x 3.0)mm, Part No. AJO-4287

Estándares

- 4.4.1 Vancomicina, clorhidrato. Estándar secundario.
ENTRADA 0000091958.
Valoración 1014.4 µg/mg B.H.

Preparación de soluciones

- 4.5.1 Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 5.0)
Pesar con exactitud 3.3916 g de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) y 0.0480 g de fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC, medir pH. Filtrar la solución a través de una membrana de 0.45 µ.
- 4.5.2 Acetonitrilo HPLC
Filtrar 100 mL de acetonitrilo HPLC con membrana de 45 µ
- 4.5.3 Fase móvil.

Solución Amortiguadora de Fosfatos: Acetonitrilo (9:1 v/v); para 100 mL:

Medir por separado y con la misma probeta, 90 mL de la solución amortiguadora de fosfatos y 10 mL de acetonitrilo HPLC. Agregar siempre el buffer de fosfatos al ACN,

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 4 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

posteriormente homogenizar. Desgasificar la solución en ultrasonido por 20 minutos sin vacío.

4.5.4 Solución eluyente.

Solución Amortiguadora de Fosfatos: Acetonitrilo (50:50 v/v).

Medir por separado con probeta 25 mL de solución de fosfatos y 25 mL de acetonitrilo HPLC y mezclar.

4.5.5 Solución A. Solución patrón de vancomicina (400 µg/mL).

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de Vancomicina, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver y llevar a volumen con fase móvil.

4.5.6 Solución B. Dilución de la solución patrón de vancomicina (100 µg/mL).

Transferir cuantitativamente con pipeta automática 2 500 µL de la solución de vancomicina de 400 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil.

4.5.7 Solución C. Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema.

Transferir cuantitativamente con pipeta automática 2500 µL de la solución de vancomicina de 100 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL. Esta solución contiene 25 µg/mL de vancomicina.

4.5.8 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN EN FASE MÓVIL

Realizar la preparación de la curva patrón de vancomicina de acuerdo a la Tabla 1.

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 5 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

Tabla 1. Preparación de la curva patrón de vancomicina en fase móvil

Matraz	Alícuotas de solución de vancomicina (µL)	Solución de vancomicina (µg/mL) para tomar alícuotas	Concentración de vancomicina (µg/mL)
1	1 250	400*	50
2	900	400*	36
3	750	400*	30
4	5 000	50*	25
5	5 000	30*	15
6	2 400	25*	6

* Todos los aforos son a 10 mL con fase móvil.

4.5.9 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN EN PLASMA

Realizar la preparación de la curva patrón de vancomicina de acuerdo a la Tabla 2.

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO: 000	Hoja 6 de 12
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

Tabla 2. Preparación de la curva patrón de vancomicina en plasma

Matraz	Alícuotas de solución de vancomicina (µL)	Solución de vancomicina (µg/mL) para tomar alícuotas	Aforo (mL de plasma)	Concentración de vancomicina (µg/mL)
1	625	400	10	25.0
2	225	400	5	18.0
3	375	400	10	15.0
4	2 500*	25	5	12.5
5	2500*	15	5	7.5
6	150	100	5	3.0

* Alícuotas tomadas a partir de los matraces 1 y 3 de la curva en plasma.

4.5.10 REPARACIÓN DE LOS PUNTOS CONTROL DE CALIDAD DE VANCOMICINA EN FASE MÓVIL.

Preparar cada uno de los puntos control de vancomicina de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3 Preparación de puntos control de calidad de vancomicina en fase móvil

Matraz	Alícuota de solución de vancomicina (µL)	Solución de vancomicina (µg/mL) para tomar las alícuotas	Aforo (mL de fase móvil)	Concentración de vancomicina (µg/mL)
1	1 100	400	10	44.0
2	2 000	100	10	20.0
3	800	100	10	8.0

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 7 de 12
	000	
		Fecha: SEP-08

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

4.5.11 PREPARACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONTROL DE VANCOMICINA EN PLASMA.

Preparar cada uno de los puntos control de vancomicina en plasma de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4 Preparación de puntos control de vancomicina en plasma

Matraz	Alícuota de solución de vancomicina (µL)	Solución de vancomicina (µg/mL)	Aforo (mL de plasma)	Concentración de vancomicina (µg/mL)
1	550	400	10	22.0
2	1000	100	10	10
3	400	100	10	4.0

Método

4.6.1 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA PARA CUANTIFICAR VANCOMICINA

- 1) En un tubo eppendorf colocar 0.5 mL de muestra plasmática, adicionar 0.5 mL de agua destilada y agitar 10 seg. en vórtex.
- 2) Acondicionar previamente los cartuchos con 3mL de metanol HPLC, seguidos de 3mL de agua.
- 3) Transferir la muestra de plasma diluida al cartucho y pasar por este. Desechar residuos.
- 4) Lavar con agua (2 x 1.5 mL). Desechar lavados.
- 5) Eluir la vancomicina con la solución eluyente (3 x 300 µL). Recolectar en tubos los

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 8 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

eluatos.

- 6) Centrifugar a 2000 g, durante 3 minutos los tubos con eluatos.
- 7) Evaporar a sequedad en B.M a 45 °C y bajo corriente de N₂ los tubos con eluatos.
- 8) Redisolver el residuo en 250 µL de fase móvil, agitar en vórtex.
- 9) Inyectar al cromatógrafo 100 µL de la solución anterior.

4.6.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras son las que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para el análisis de vancomicina en plasma

Fase móvil	Buffer Fosfatos 50mM (pH 5 ± 0.05): acetonitrilo (9:1 v/v)
Columna cromatográfica	LiChrosorb 100 RP-18 (4.0 x 250 mm), 5 µm
Temperatura	Ambiente
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	100 µL
Longitud de onda	220 nm

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

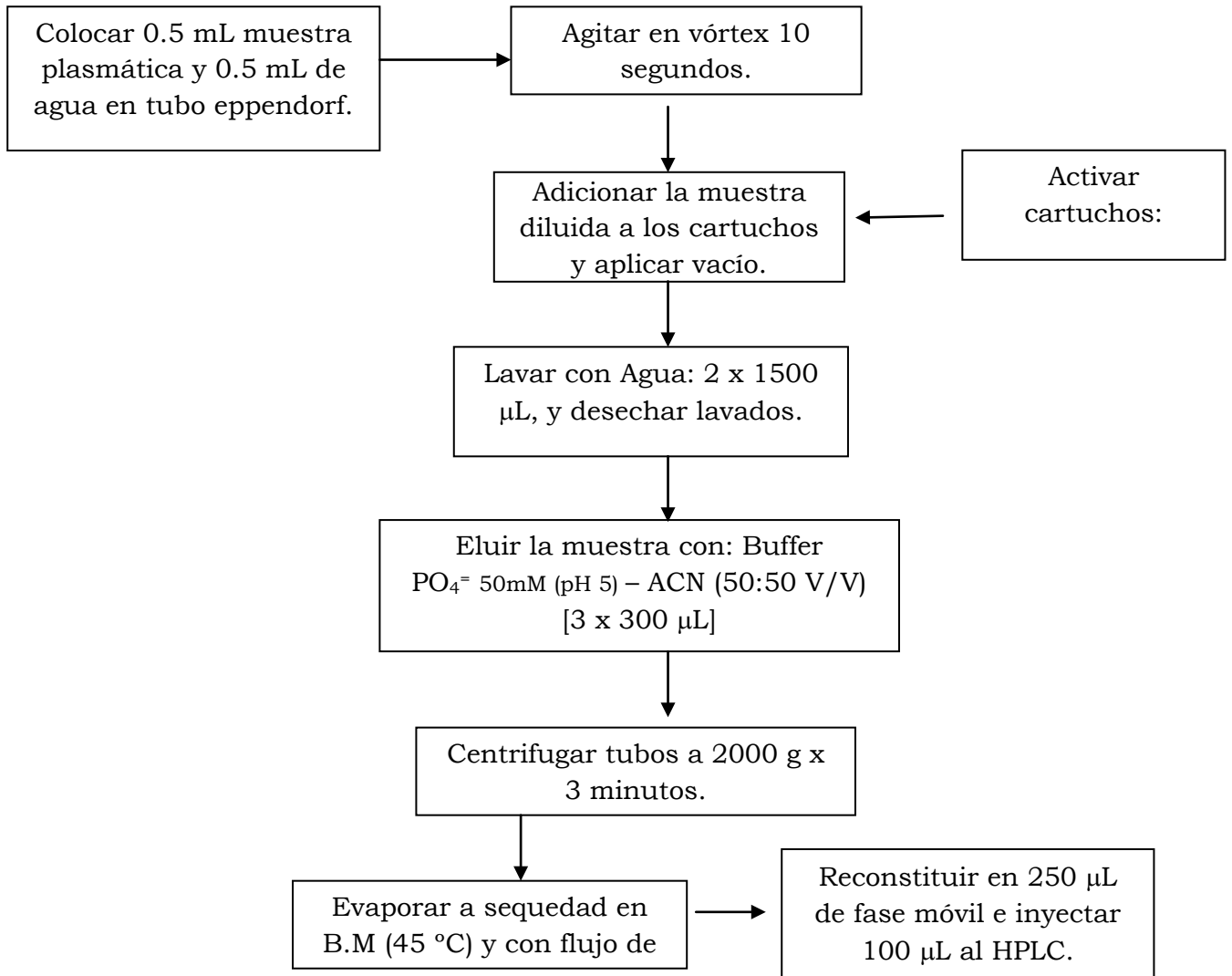
**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO: 000	Hoja 9 de 12
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

4.6.3 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



Resultados

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 10 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

4.7.1 En las siguientes figura se presentan los cromatogramas típicos para este método analítico:

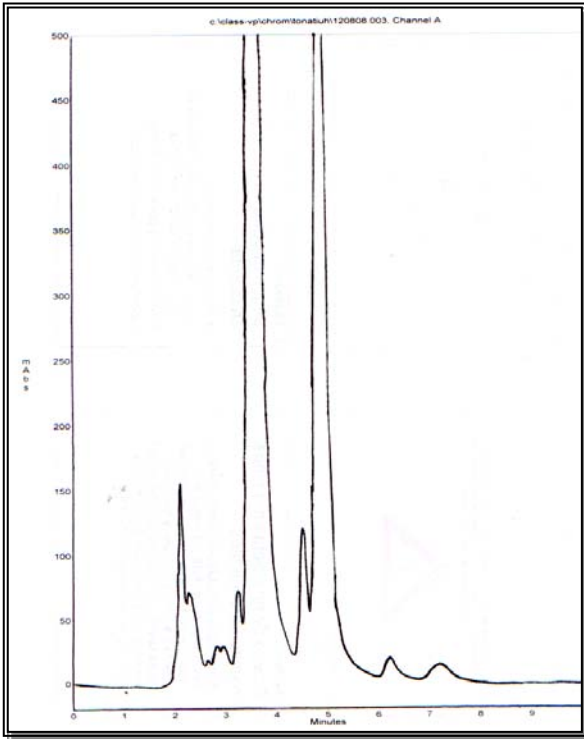


Figura 1. Cromatograma típico de un blanco de plasma para el método analítico.

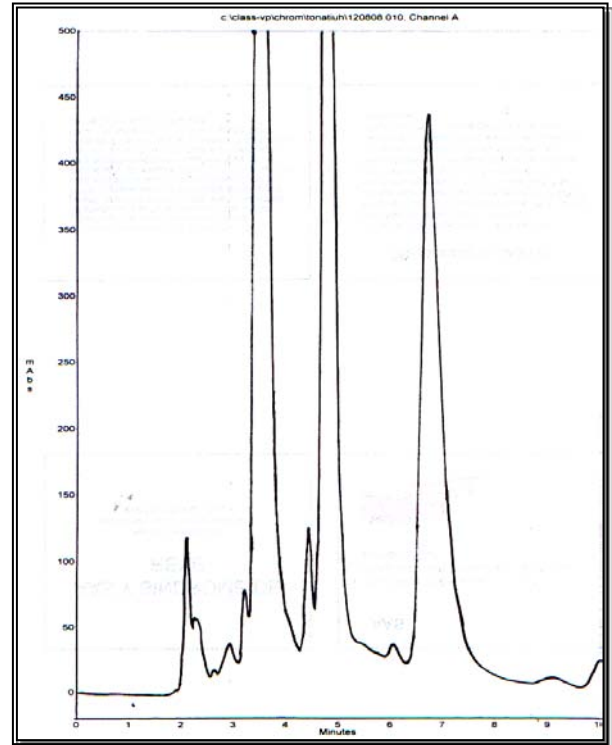


Figura 2. Cromatograma típico de una muestra procesada con vancomicina a [25µg/mL] para el método analítico.

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

**UNIDAD ANALÍTICA PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "E"
LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
MÉTODO ANALÍTICO**



Nombre: DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN PLASMA POR CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	MÉTODO ANALÍTICO NO:	Hoja 11 de 12
	000	
	Fecha: SEP-08	

Sustituye a: NUEVO	Siguiente Revisión:
------------------------------	----------------------------

5 REGISTROS PARA LA CALIDAD:

La validación del método analítico se reporta en la bitácora de tesis de licenciatura: BTL-08-096.

6 BIBLIOGRAFÍA:

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Fecha:	Fecha:	Fecha: