



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO  
PARA CUANTIFICAR CEFACLOLOR EN PLASMA  
UTILIZANDO CROMATOGRÁFIA DE LÍQUIDOS  
DE ALTA RESOLUCIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

NANCY MONSALVO MARTINEZ



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:**

<b>PRESIDENTE:</b>	INÉS FUENTES NORIEGA
<b>VOCAL:</b>	RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ
<b>SECRETARIO:</b>	MYRIAM CORTÉS FUENTES
<b>PRIMER SUPLENTE:</b>	JUAN MANUEL RODRIGUEZ
<b>SEGUNDO SUPLENTE:</b>	LIZ JANNET MEDINA REYES

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Centro A. F. De Estudios Tecnológicos

Departamento de Analítica

### **Asesor de Tesis:**

---

QFB. Myriam Cortés Fuentes

### **Sustentante:**

---

Nancy Monsalvo Martínez

*El alquimista piensa en las secretas leyes que unen planetas y metales. Y mientras cree tocar enardecido el oro aquél que matará la Muerte, Dios, que sabe de alquimia, lo convierte en polvo, en nadie, en nada y en olvido.*

*Jorge Luis Borges*

## ***Dedicatorias***

***A mi papi y mami:***

***Sin Ustedes nada sería, gracias.  
Los quiero mucho.***

## ***Agradecimientos***

***A mis padres por enseñarme que la cultura no te produce nada pero lo cambia todo, tú pensar y tú hacer, tu sentir y tu hablar. Toda tu vida. Los amo.***

***A mis hermanos Kary (Tika) y Rubén (Bibin) porque hemos logrado trascender apoyándonos y dando lo mejor de nosotros mismos, los amo.***

***A mis sobrinos pues me enseñaron que las personas alguna vez no tenemos malicia y con una sonrisa se cambia todo un entorno.***

***A ti Daniel por saber día a día enriquecer nuestro amor y deseo con el tiempo tengamos la fuerza para sobreponernos de cualquier circunstancia, gracias por acompañarme, estar conmigo y colaborar en la dicha de ser padres, en fin gracias totales. Te amo.***

***A mi bebecito Lenny quien me ha dado un sentimiento divino, una fuerza y alegría inigualable. Te amo amorcito.***

***A mis amigos Judith, Marcelino, Daniel, Erika, Adriana, Silvia y Helena, con quienes compartí los momentos más chidos, manchados y especiales de la carrera.***

***A la Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente a la Facultad de Química.***

## ABREVIATURAS

<b>CLAR</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>SAC</b>	Solución amortiguadora de citratos 750mM pH 2.5
<b>SPP</b>	Solución de ácido perclórico 40% V/V
<b>BR</b>	Blanco de reactivos
<b>BP</b>	Blanco de plasma
<b>SC1</b>	Solución concentrada de Cefaclor
<b>SC2</b>	Solución diluida de Cefaclor
<b>SA</b>	Solución de adecuación del sistema
<b>ng</b>	nanogramo
<b>mL</b>	mililitro
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>CV</b>	Coefficiente de Variación

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	5
<b>1. Introducción</b> .....	6
<b>2. Fundamentación Teórica</b> .....	8
2.1 Importancia del desarrollo analítico .....	8
2.2 Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos .....	8
2.3 Características de los fluidos biológicos.....	10
2.3.1 Sangre.....	10
2.3.2 Suero.....	10
2.3.3 Plasma.....	10
2.3.4 Fracción libre de proteínas .....	10
2.3.5 Orina.....	11
2.4 Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos .....	11
2.4.1 Precipitación de proteínas.....	12
2.4.2 Ultrafiltración.....	12
2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) .....	12
2.5.1 Campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución .....	14
2.5.2 Tipos de cromatografía líquida en columna .....	15
2.5.3 Teorías del fenómeno de separación .....	16
2.5.3.1 Teoría de platos.....	16
2.5.3.2 Teoría de la velocidad.....	17
2.5.3.2.1 Difusión de remolino.....	18
2.5.3.2.2 Difusión longitudinal .....	18
2.5.3.2.3 Resistencia a la transferencia de masa.....	19
2.5.3.3 Selectividad, factor de capacidad, eficiencia y resolución .....	19
2.5.4 Equipo utilizado en CLAR.....	22
2.5.4.1 Reservorio en fase móvil.....	22
2.5.4.2 Bombas.....	22
2.5.4.2.1 Clasificación de las bombas utilizadas en CLAR.....	23
2.5.4.3 Sistema de inyección de muestra .....	23
2.5.4.4 Columnas y fases estacionarias .....	23

2.5.4.4.1 Componentes de una columna.....	24
2.5.4.5 Detección .....	24
2.5.4.5.1 Detector UV.....	24
2.5.4.5.2 Detector de índice de refracción.....	25
2.5.4.5.3 Detector de fluorescencia.....	25
2.5.4.5.4 Detector de fluorescencia inducida por láser.....	25
2.5.4.5.5 Electroquímicos .....	25
2.6 Monografía del fármaco (Cefaclor) .....	26
2.6.1 Nomenclatura.....	26
2.6.1.1 Nombre químico.....	26
2.6.1.2 Nombre genérico.....	26
2.6.1.3 Nombres comerciales.....	26
2.6.1.4 Número de registro CAS.....	26
2.6.2 Fórmula, estructura y peso molecular.. ..	26
2.6.3 Propiedades físicas.....	27
2.6.3.1 Solubilidad.....	27
2.6.3.2 Constantes de disociación.....	27
2.6.3.3 Coeficiente de partición.....	27
2.6.3.4 Espectro UV .....	28
2.6.4 Estabilidad.....	28
2.6.5 Métodos de análisis.....	28
2.6.5.1 Métodos cromatográficos para cuantificar cefaclor en fluidos biológicos .....	28
2.6.6 Farmacología.....	29
2.6.6.1 Mecanismo de acción .....	29
2.6.6.2 Farmacocinética y biodisponibilidad .....	29
2.6.6.3 Reacciones secundarias y adversas.....	30
<b>3. Parte experimental .....</b>	<b>31</b>
3.1 Planteamiento del problema y justificación.....	31
3.2 Objetivo.....	31
3.3 Diseño experimental.....	32
3.3.1 Sustancia de referencia.....	32



3.3.2 Reactivos y equipos.....	32
<b>4. Metodología .....</b>	<b>33</b>
4.1 Diseño del procesamiento de la muestra.....	33
4.1.1 Elección del Agente de precipitación.....	34
4.1.2 Elección del amortiguador para el procesamiento de la muestra.....	34
4.2 Diseño del sistema cromatográfico.....	39
4.2.1 Elección de la fase estacionaria.....	39
4.2.2 Elección de la fase móvil.....	40
4.3 Descripción de la metodología propuesta .....	41
4.3.1 Soluciones.....	41
4.3.2 Equipo.....	43
4.3.3 Metodología analítica.....	43
4.3.4 Condiciones de trabajo.....	43
4.3. 5 Cálculos.....	43
4.3.6 Criterios de aceptación de la corrida analítica.....	44
5. Validación del método.....	44
5.1 Determinación, metodología y criterios de aceptación de los parámetros de validación .....	44
5.1.1 Selectividad.....	45
5.1.2 Recuperación absoluta.....	45
5.1.3 Exactitud, precisión y linealidad.....	46
5.1.4 Rango.....	47
5.1.5 Estabilidad de la muestra.....	47
5.1.5.1 Experimento A. En plasma sin la adición de ácido fosfórico al 85%, sin procesar, temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5 .....	49
5.1.5.2 Experimento B. En plasma sin la adición de ácido fosfórico al 85%, sin procesar, en refrigeración, pH de la muestra 5.0-6.5.....	49
5.1.5.3 Experimento C. En plasma sin la adición de ácido fosfórico al 85%, sin procesar a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.....	49
5.1.5.4 Experimento D. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5 .....	50
5.1.5.5 Experimento E. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación (-40° C), pH de la muestra 2.5-4.5.....	50
5.1.5.6 Experimento F. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.....	50

5.1.5.7 Experimento G. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85%, procesadas en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5.....	51
5.1.5.8 Experimento H. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85%, procesadas en ultracongelación (-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5.....	51
5.1.5.9 Experimento I. En plasma con la adición de ácido fosfórico al 85% y ciclos de congelación-descongelación, pH de la muestra 2.5-4.5.....	51
5.1.6 Límite de cuantificación.....	52
5.1.7 Límite de detección.....	52
5.1.8 Tolerancia.....	52
<b>6 Resultados</b> .....	<b>54</b>
<b>7 Análisis de resultados</b> .....	<b>79</b>
<b>8 Conclusiones</b> .....	<b>81</b>
<b>9 Bibliografía</b> .....	<b>82</b>

## RESUMEN

Se desarrolló un método para cuantificar Cefaclor (cefalosporina de segunda generación) en plasma para estudios de bioequivalencia, en el rango de trabajo de 400.0 a 50000.0 ng/mL. El método de procesamiento se diseñó con base a lo descrito por Granados Soto V. en el Journal Liq. Chromatography and Relat, Technol; Nov 2003; 26(19) pp. 3315-3323, donde se propone un intervalo de concentraciones de 500.0 a 30000 ng/mL.

El  $C_{máx}$  teórico reportado en bibliografía para la dosis de 1g es de 23000 ng/mL, en tanto el tiempo de vida media es de 0.5 a 1 h, por lo que para alcanzar a caracterizar las cuatro vidas medias se requirió una concentración mínima cuantificable de por lo menos 1437.5 ng/mL.

Debido a que la estabilidad máxima en solución del Cefaclor se encuentra reportada entre pH de 2.5 a 4.5 (Merck Index 12<sup>a</sup> Ed) se utilizó como anticoagulante una solución amortiguadora de citratos 0.75M a pH 2 (método interno de laboratorio CAFET). La muestra se sometió a una precipitación con ácido perclórico 40% v/v, enseguida se centrifugó a 15000rpm, durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido se analizó en un sistema cromatográfico que incluye, una columna analítica Ultrasphere XL, 3 $\mu$ , 4.6 x 70 mm, Beckman, C8, con detección U.V. a 265 nm. También se empleó una fase móvil constituida por Metanol HPLC, Agua HPLC y Ácido acético glacial (880: 120: 1).

Debido a que la manipulación de la muestra durante el procesamiento es mínima, no fue necesario el uso de un estándar interno para amortiguar los errores durante el procesamiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

En México la penicilina es el fármaco habitual de elección para el tratamiento y prevención de las infecciones causadas por estreptococos. Sin embargo, Cefaclor por lo general es efectivo en la erradicación de los estreptococos de la región nasofaríngea por lo que es utilizado con frecuencia en tratamientos para infecciones como lo son:

Otitis media, neumonía, bronquitis, exacerbaciones de la bronquitis crónica, faringitis, amigdalitis, pielonefritis, cistitis, infecciones en piel y estructuras cutáneas así como en el tratamiento de sinusitis (Alvin, 1995).

Al ser el Cefaclor un fármaco de gran uso en México cuenta con la categoría de genéricos que son únicamente las especialidades farmacéuticas que cumplen con las pruebas de intercambiabilidad, para establecer esta intercambiabilidad es necesario demostrar que los medicamentos son igualmente seguros y eficaces al medicamento de referencia dentro de un intervalo definido, entre las principales pruebas esta la bioequivalencia (estudios de bioequivalencia, 2006), que no puede modificarse durante el desarrollo y menos a raíz de los resultados obtenidos pues el estudio de bioequivalencia no pretende no encontrar diferencias, eso se conseguiría simplemente con un estudio de baja potencia estadística, sino demostrar un determinado grado de equivalencia, esto es que la diferencia máxima esperada no exceda de un valor determinado.

La validación de las metodologías, junto a otras actividades engloban el control de aseguramiento de calidad, que permite demostrar que un método analítico proporciona resultados fiables. Para soportar el proceso de validación se realiza el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterios que llevan a una correcta evaluación.

Dentro de las metodologías en la cuantificación de fármacos de fluidos biológicos actualmente la cromatografía de líquidos de alta resolución, es la más utilizada, por su maleabilidad en cuanto a la columna utilizada, fase móvil, detección y la posibilidad de automatización para el análisis rutinario. Estas

características permiten manejar un número considerable de muestras, en tiempos relativamente cortos (Estudios de bioequivalencia, 2006).

Debido a la complejidad de las matrices biológicas y a que los bajos niveles de concentración de los fármacos, que por lo regular son del orden de microgramos, nanogramos y picogramos por mililitro, es necesaria la utilización de metodologías que permitan concentrar la muestra y eliminar las sustancias que interfieran con el método de cuantificación.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un método analítico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, sencillo y específico para la determinación rápida de Cefaclor en plasma humano. El desarrollo del método presentado incluye las etapas de implementación del sistema cromatográfico, procesamiento de muestra y evaluación del método.

## **2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.**

### **2.1 Importancia del desarrollo analítico**

El desarrollo analítico se encarga de implementar estrategias metodológicas encaminadas a la creación, optimización, implementación y validación de un método analítico de una manera sistematizada, lo que se traduce en un ahorro de recursos y una mejora de la productividad. (Fritz 1999).

### **2.2 Importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos**

Hasta hace unos años, el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se aplicaba sólo a la medicina forense, pero en la actualidad las aplicaciones han crecido. Los métodos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se pueden encontrar en estudios de monitoreo en estudios clínicos, evaluación de equivalencia biológica entre productos genéricos y sobre todo en el desarrollo de nuevos fármacos, desde que es una nueva entidad química, hasta que finalmente se comercializa. De una manera sencilla, el análisis de fármacos consiste en presentar la muestra ante un dispositivo que la evaluará y posteriormente arrojará las respuestas "*que es*" y "*cuanto es*". Sin embargo, un fluido biológico no es una muestra simple, sino una mezcla muy compleja de lípidos, carbohidratos, proteínas, y otros componentes que pueden interactuar entre sí, interfiriendo con la determinación del analito, por ejemplo, elevando la respuesta, enmascarándola o alterando sus niveles debido a una degradación (factores de pH, enzimas, etc). Es en esta situación en donde el desarrollo analítico cobra una importancia relevante para implementar métodos que sean capaces de cuantificar fármacos de una forma confiable. La importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos se puede dividir en dos grandes aplicaciones, una cuando el medicamento de estudio se encuentra en la etapa de comercialización (en uso) y otra cuando dicho medicamento se encuentra en las etapas de investigación y desarrollo (Chamberlain, 1987). Esta división de acuerdo a los siguientes puntos:

## 1.-Medicamentos en etapa de comercialización

- Toxicología forense
- Sobredosificación
- Monitoreo de fármacos

## 2.-Medicamentos en investigación y desarrollo

- Farmacología
- Toxicología
- Pruebas clínicas de fase I
- Metabolismo
- Farmacocinética
- Pruebas clínicas de fase II
- Farmacodinamia
- Bioequivalencia

Los fluidos biológicos en los que generalmente se cuantifican los fármacos de interés, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de matrices biológicas (Fritz 1999).

MUESTRAS BIOLÓGICAS DE MENOR A MAYOR GRADO DE DIFICULTAD DE ANÁLISIS	
Líquidos	Líquido cerebroespinal Lagrimas Sudor Saliva Orina Bilis
Mezclas	Plasma, suero Sangre Heces
Sólidos	Cerebro Corazón, hígado, riñón, pulmón, músculo Huesos

## **2.3 Características de los fluidos biológicos**

### **2.3.1 Sangre**

La sangre es una de las matrices más complejas. Consiste en un fluido amortiguado que contiene proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Las células rojas son el principal componente de la sangre y pueden ser separadas del componente líquido por simple centrifugación. En general existen cuatro tipos de muestras que se pueden derivar de una muestra de sangre: sangre total, suero, plasma y fracción libre de proteínas.

Si el analito presenta gran afinidad por las membranas celulares de los eritrocitos, leucocitos o plaquetas, es inevitable el uso de sangre total como fluido de trabajo. Al analizar sangre total, los componentes celulares de la sangre deben ser lisados para que su contenido pueda formar una mezcla homogénea con la porción fluida de la sangre. Las células pueden ser lisadas utilizando ultrasonido o congelando las muestras por un tiempo y someténdolas a ultrasonido posteriormente (Fritz, 1999).

### **2.3.2 Suero**

El suero puede obtenerse a partir de la coagulación y posterior centrifugación de la sangre total, eliminando de esta forma las células y factores de coagulación presentes. La principal característica del suero es la presencia de grandes cantidades de proteínas.

### **2.3.3 Plasma**

El plasma es obtenido a partir de la centrifugación de sangre total a la que se le ha adicionado un anticoagulante. El plasma es suero que contiene fibrinógeno y factores de coagulación.

### **2.3.4 Fracción libre de proteínas**

La fracción libre de proteínas es la porción de la sangre que queda después de que los componentes celulares y las proteínas plasmáticas han sido



eliminados. Esta fracción contiene sustancias que no están unidas a proteínas plasmáticas y puede obtenerse mediante ultrafiltración.

### **2.3.5 Orina**

La orina a diferencia del suero o plasma, generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos. La orina es una mezcla constituida por sustancias solubles en agua. El rango de pH en el que se encuentra la orina es amplio ya que se trata de un fluido no amortiguado. El pH de la orina depende en gran medida de la dieta. La mayoría de los fármacos son solubles en disolventes orgánicos por lo tanto, pueden extraerse directamente de la orina. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puede excretar en un intervalo de tiempo fijo, es importante la cantidad de fármaco excretada y no la concentración (Connors, 1987).

## **2.4 Procesamiento de muestras biológicas para la cuantificación de fármacos.**

En los últimos años, los laboratorios analíticos se han preocupado por realizar análisis más rápidos y a un menor costo. Este aspecto recae sobre todo en la preparación de la muestra la cual, ocupa el mayor tiempo del análisis, en comparación con el que ocupa en realidad la medición de sus componentes.

El procesamiento de muestra, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, ya que debe ser de aplicación fácil, rápida, de bajo costo y debe eliminar a la fuente principal de interferencias.

Por esta razón es deseable que el procesamiento sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener de esta forma métodos rápidos, económicos y reproducibles.

Las técnicas tradicionalmente empleadas en el procesamiento de muestras son: precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y ultrafiltración.

### **2.4.1 Precipitación de proteínas**

Al ser las proteínas el constituyente más abundante en el plasma y suero, es recomendable su eliminación, para evitar que su presencia interfiera en la cuantificación del analito. El primer paso en el procesamiento del suero o plasma es la obtención de una solución acuosa libre de proteínas. La fracción libre de proteínas puede ser analizada o ser sometida a otros procesos de extracción. La desnaturalización de proteínas previa a la extracción no debe de considerarse una regla general; aunque los fármacos pueden estar firmemente unidos a proteínas plasmáticas, esta unión es reversible, por lo que a un pH adecuado la muestra puede ser extraída con un disolvente orgánico (Skoog, 1997).

### **2.4.2 Ultrafiltración**

Es una técnica simple y eficiente, usada principalmente para la investigación en muestras biológicas como suero y plasma que presentan una gran cantidad de proteínas. Esta técnica se basa en la diferencia existente entre los pesos moleculares de las proteínas y de las moléculas de los fármacos. En la ultrafiltración se utilizan microconos con filtros, que permiten la separación de las mismas.

### **2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

Pocos métodos aplicados al análisis químico son realmente específicos para un analito en particular y se torna más complicado cuando el analito de interés tiene que ser separado de una matriz compleja. Una de las herramientas más poderosas y útiles en este tipo de casos es la cromatografía.

La cromatografía se define como un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario (fase estacionaria), y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil).

La palabra cromatografía (*kromatos*, color y *graphos*, escrito) fue utilizada por vez primera por el botánico ruso M. Tswett en 1906 para designar una técnica empleada por él para separar pigmentos vegetales; Tswett hizo pasar por una columna de vidrio, rellena de carbonato cálcico, un extracto de hojas verdes en éter de petróleo. Adicionando posteriormente el disolvente puro por la parte superior de la columna, obtuvo una serie de bandas horizontales diversamente coloreadas, debido a la diferencia de adsorción por el carbonato cálcico de los colorantes de la planta. Actualmente se sabe que la separación no está condicionada por el color, sin embargo, se sigue utilizando el nombre de cromatografía por motivos históricos.

En la separación de pigmentos realizada por Tswett, la fase estacionaria es el relleno de carbonato cálcico, el éter de petróleo es la fase móvil y los pigmentos los componentes a separar que se encuentran sometidos a dos fuerzas contrarias: el disolvente tiende a arrastrar a los componentes hacia la salida de la columna y el carbonato cálcico, adsorbiéndolos, tiende a retenerlos; como estos efectos son de diferente intensidad para los distintos pigmentos el resultado es que se desplazan a distinta velocidad por la columna, pudiendo llegar a separarse (Connors, 1987).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), también conocida como cromatografía de líquidos de alta presión, es una técnica completamente instrumental de cromatografía líquida. La CLAR debe su éxito a la variedad de combinaciones de las condiciones de operación, es decir: el tipo de empaque de la columna, fase móvil, dimensiones de la columna, velocidad de flujo y sistema de detección.

La migración diferencial en la CLAR es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil hacia un detector donde se registra la señal generada, esta señal es transmitida después a un sistema de recolección de

datos donde se genera un cromatograma. En el cromatograma obtenido se observa el tiempo de retención característico para las condiciones empleadas. El cromatograma resultante puede ser empleado para determinar la concentración del analito (Skoog, 1997).

Es importante definir primero algunos parámetros importantes para después presentar las distintas teorías que define al fenómeno cromatográfico.

### **2.5.1 Campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución.**

Muchas clases de componentes son analizados por HPLC. Entre éstos se incluyen antibióticos, analgésicos, vitaminas, esteroides y tranquilizantes. Con el desarrollo de columnas en fase reversa y el uso de par iónico, el número de componentes farmacéuticos analizados ha aumentado.

Las aplicaciones típicas de HPLC se mencionan a continuación.

#### Química y bioquímica

- Análisis complejos.
- Purificación química de componentes.
- Desarrollo de procesos para síntesis de compuestos químicos.
- Aislamiento de productos naturales que tienen características biológicas benéficas.
- Predicción de propiedades físicas.

#### Control de calidad

- Aseguramiento de la pureza de materias primas.
- Prueba de control en proceso y mejoramiento del producto en Proceso.
- Ensayo cuantitativo de lo productos finales para asegurar conformidad a la especificación.
- Evaluación de la estabilidad al producto y monitoreo de su Degradación.

## Control ambiental

- Análisis de los contaminantes en aire y agua.
- Monitoreo de los niveles de pesticidas en el ambiente.
- Monitoreo para los materiales que pueden poner en peligro la seguridad ocupacional o salud.

## Agencias regulatorias federales y estatales

- Vigilancia de productos alimenticios y fármacos.
- Identificación de narcóticos.

### **2.5.2 Tipos de cromatografía líquida en columna**

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, pueden enumerarse cuatro tipos.

1) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción – desorción.

2) Cromatografía de partición. La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

3) Cromatografía de intercambio iónico. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más frecuentemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

4) Cromatografía de exclusión. Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida y filtrada según sea el tamaño molecular. Por razones fundamentalmente históricas, esta técnica se llama también filtración sobre geles o cromatografía sobre geles, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel.

### 2.5.3 Teoría del fenómeno de separación.

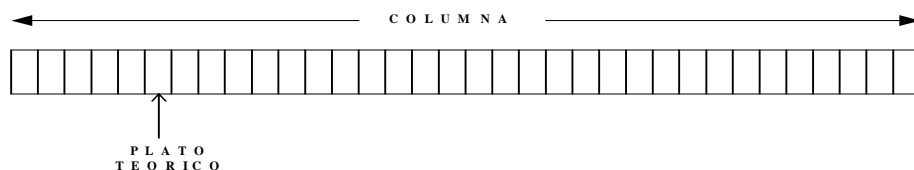
La cromatografía moderna se fundamenta principalmente en dos teorías desarrolladas a mediados del siglo XX cada una de las cuales tienen sus ventajas y limitantes. La primera es la Teoría de platos y la segunda es la teoría de velocidad.

#### 2.5.3.1 Teoría de platos

Esta teoría fue propuesta por Martín y Synge en 1941. Se fundamenta principalmente en una analogía que hacen de la extracción a contra corriente y la destilación.

En esta teoría, la columna se considera como un sistema estático en equilibrio. Para la separación se asume que la columna tiene una longitud y flujo constantes. A partir de esto se definen varios parámetros acerca del desempeño del sistema de separación.

El modelo del plato teórico supone que la columna cromatográfica consiste en un número de capas separadas llamadas platos teóricos. En estos “platos” ocurren equilibrios independientes de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. El analito se mueve a través de la columna debido a equilibrios de transferencia entre la fase móvil y el próximo plato.



Es importante remarcar que los platos teóricos realmente no existen como un aspecto físico, sólo son una convención que ayuda a comprender el proceso mediante el cual una columna realiza su función de separación. También sirven como una medida de la eficiencia de la columna. El número de platos teóricos es representado por la letra N, y evidentemente es deseable un mayor número de platos teóricos para obtener una separación más eficiente.

Esta teoría también define la *Altura Equivalente del Plato Teórico o HEPT* (H). A medida que el parámetro H es más pequeño, existe un mayor número de platos teóricos en la columna. Si la longitud de la columna es L, entonces la altura equivalente del plato teórico es:

$$H = \frac{L}{N}$$

El número de platos teóricos de una columna puede ser calculado mediante diversas expresiones matemáticas; sin embargo, la siguiente expresión evita el riesgo asociado al momento de dibujar las tangentes para la determinación del ancho en la base del pico:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde  $W_{1/2}$  es la distancia que se mide entre las líneas del pico a una altura del 50% del máximo.

Como se puede deducir de la explicación anterior, el desempeño de las columnas está directamente relacionado con el número de platos teóricos, es decir entre menor sea la altura del plato teórico, mayor será el número de ellos y por lo tanto la eficiencia será mayor.

### **2.5.3.2 Teoría de la velocidad**

Propuesta por J.J. Van Deemter en 1956, esta teoría se considera la dinámica de la separación.

Una descripción más real del proceso de separación dentro de la columna considera el tiempo tomado por el analito en los equilibrios que tiene entre la fase estacionaria y la fase móvil. La forma de la banda que resulta en un pico cromatográfico es afectada por la velocidad de elución. También es afectada por las distintas rutas disponibles por las cuales las moléculas de soluto pueden desplazarse dentro y entre las partículas que conforman la fase estacionaria.

Los distintos mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de la banda cromatográfica son descritos por la ecuación de Van Deemter. La ecuación de Van Deemter define a la altura del plato teórico ( $H$ )<sup>7</sup> como:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Dónde  $u$  es la velocidad linear promedio de la fase móvil.  $A$ ,  $B$  y  $C$  son factores que contribuyen al ensanchamiento de la banda.

#### 2.5.3.2.1 Difusión de remolino

La difusión de remolino corresponde al termino “A” de la ecuación de Van Deemter. La fase móvil se desplaza a través de la columna, la cual está empacada con la fase estacionaria. Las moléculas de analito tomarán distintas trayectorias (de manera aleatoria) a través de la fase estacionaria. Esto tiene como consecuencia que la banda se ensanche debido a que las distintas trayectorias son de diferente longitud. Este parámetro está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.

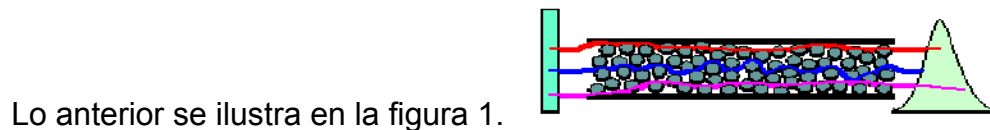


Figura 1. Variación de las zonas de flujo

#### 2.5.3.2.2 Difusión longitudinal

La difusión longitudinal corresponde al termino “B” de la ecuación de Van Deemter. La concentración del analito es menor al final de la banda que en el centro y esto se debe a que las moléculas del analito tienden a migrar desde la porción central concentrada de la banda, a las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este fenómeno ocurre tanto en la fase móvil como en la estacionaria, y su magnitud es inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, es decir, si la velocidad de la fase móvil es alta, los efectos de la difusión longitudinal decrecen (Skoog, 1997).



### 2.5.3.2.3 Resistencia a la transferencia de masa

La resistencia a la transferencia de masa se conoce también como el término “C” de la ecuación de Van Deemter. Al analito le toma un cierto tiempo alcanzar el equilibrio entre las fases, por lo tanto si la velocidad de la fase móvil es alta, no se logran verdaderos estados de equilibrio y el analito que está relativamente distante de la fase estacionaria, tenderá a desplazarse más rápido, lo que contribuye a que la banda cromatográfica se ensanche, sobre todo cuando la velocidad de la fase móvil es alta. Con la ecuación de Van Deemter se obtiene una gráfica que relaciona la altura del plato teórico (H) con el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil (Figura 2) (Skoog, 1997).

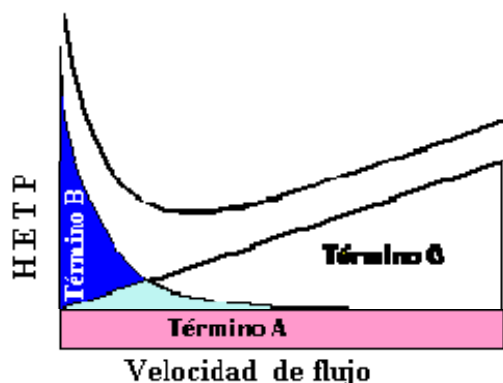


Figura 2. Gráfico típico de Van Deemter.

Este gráfico es sumamente útil en la determinación de la velocidad óptima de la fase móvil. Es importante recordar que mientras más pequeño sea el valor de la altura efectiva del plato teórico mejor será la separación.

### 2.5.3.3 Selectividad, factor de capacidad, eficiencia y resolución.

#### Selectividad

La selectividad es una medida de la retención relativa de dos componentes en una mezcla. La selectividad de la columna es una función del material de empaque y las condiciones de elución.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Donde:  $k_2$  y  $k_1$  son medidas de retención en la fase estacionaria.

### **Factor de capacidad**

Es una medida de cómo la muestra es retenida por la columna durante una separación isocrática. El factor de capacidad es afectado por el material de empaque de la columna y las condiciones de elución.

$$k = \frac{V_2 - V_0}{V_0}$$

Donde:  $V_2$  es el volumen de retención de un pico (fase estacionaria) y  $V_0$  es el volumen que requiere un compuesto no retenido, para eluir de la columna (fase móvil).

### **Eficiencia**

El número de platos teóricos se considera una medida de la eficiencia de la columna, sin embargo es una medida de la eficiencia del sistema HPLC, no solo de la columna.

$$N = 16 \left( \frac{V_2}{W_2} \right)^2 \text{ Tangente del método}$$

Donde:  $V_2$  es el volumen de retención de un pico (fase estacionaria),  $W_2$  es el ancho del pico (línea base).

### **Resolución**

Aunque la selectividad  $\alpha$  describe la separación de los centros de las bandas cromatográficas, no considera el ancho de las mismas. Otra medida de la eficiencia de la separación entre dos especies es el parámetro que se denomina Resolución (**R**). La resolución de dos especies, A y B está definida por la siguiente expresión:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Normalmente en la mayoría de las separaciones cromatográficas, una resolución adecuada se tiene con valores de  $R > 1.5$ .

Los parámetros hasta ahora revisados como la resolución, el número de platos teóricos, la selectividad y el factor de capacidad pueden ser relacionados de una manera sencilla mediante la siguiente expresión matemática:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

Para obtener alta resolución, los tres parámetros deben ser maximizados. Un incremento en  $N$ , el número de platos teóricos, mediante el empleo de una columna de longitud mayor, también provoca un incremento en el tiempo de retención, y por consecuencia la banda se ensancha, lo cual no es deseable. En lugar de incrementar de esta manera el número de platos teóricos, la altura equivalente de un plato teórico ( $H$ ) puede ser reducido mediante el empleo de columnas cuya fase estacionaria tenga un tamaño de partícula menor.

Es frecuente que controlando el factor de capacidad  $k$ , las separaciones mejoren notablemente. Este objetivo puede ser alcanzado cambiando la composición ya sea de la fase móvil, de la fase estacionaria o de ambas.

La selectividad puede ser manipulada para mejorar las separaciones. Cuando su valor se encuentra cercano a la unidad, la optimización de  $k$  y el incremento de  $N$  no es suficiente para proporcionar separaciones adecuadas en un tiempo razonable. En los casos en que  $k$  es optimizado en primera instancia, la selectividad puede ser incrementada mediante alguno de los siguientes procedimientos:

- Cambiar la composición de la fase móvil.
- Cambiar la composición de la fase estacionaria.
- Implementar reacciones de derivatización (como la incorporación de especies que complejen con el analito).

Los conceptos antes revisados son los más empleados en cromatografía porque describen cómo es que ocurre el proceso de separación y las condiciones que pueden ser manipuladas para obtener separaciones óptimas y con tiempos de elución mínimos (Florey, 1980).

#### **2.5.4 Equipo utilizado en CLAR**

El equipo requerido para la cromatografía de líquidos de alta resolución está constituido de forma general por un reservorio para la fase móvil, un sistema de bombeo, un sistema de inyección de muestra, un sistema de detección y un registrador o sistema de recolección de datos.

##### **2.5.4.1 Reservorio en fase móvil**

Es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los canales y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de la columna y produzcan inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0.45 a 0.22 $\mu$ m. Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de solvente por vacío. En caso de no contar con ellos, el solvente se debe desgasificar por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de usarlo como fase móvil.

##### **2.5.4.2 Bombas**

En general se considera que el componente más importante de un aparato de cromatografía líquida es la bomba. Se clasifican según dos tipos fundamentales: las bombas de presión constante y las de caudal constante.

Los requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo son: producir presiones estables hasta un máximo de 6000 psi, mantener el flujo libre de pulsaciones, generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 mL/min), controlar de manera reproducible el flujo de disolvente y resistir la corrosión.

#### **2.5.4.2.1 Clasificación de las bombas utilizadas en CLAR**

Las bombas que se usan en CLAR se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en:

##### **-De acuerdo a la velocidad del disolvente**

Según la velocidad del disolvente (o eluente) que puede suministrar la bomba:

Micro bore (1- 250  $\mu$ L/min)

Standard bore ( 100  $\mu$ L/min - 10 mL/min)

Preparativa (> 10 mL/min)

##### **-Según el tipo de material**

Según el tipo de material usado para la trayectoria del disolvente (o eluente):

Metálicas

No-Metálicas

##### **-Según el mecanismo de desplazamiento**

Según el mecanismo de desplazamiento del disolvente (o eluente):

Mecánicas

Reciprocantes

De desplazamiento continuo o de jeringa

Neumáticas

#### **2.5.4.3 Sistema de inyección de muestra**

Los sistemas de inyección han evolucionado con el desarrollo de nuevas tecnologías; en un principio se utilizaban jeringas de alta presión, las cuales se encuentran en desuso actualmente. En la actualidad los sistemas de inyección utilizan un conjunto de válvulas, ya sea de tipo neumático o mecánico.

#### **2.5.4.4 Columnas y fases estacionarias**

La constante innovación en el diseño de los materiales de empaque, ha sido uno de los factores determinantes para la utilización masiva de la CLAR.

#### **2.5.4.4.1 Componentes de la columna**

Básicamente la columna consta de dos elementos:

##### 1) Material de Empaque

Los materiales de empaque han tenido mejoras en dos sentidos: la primera basada en la naturaleza química de la partícula y la segunda basada en las características físicas de la partícula.

Actualmente las columnas analíticas cuentan con modificaciones químicas en sus materiales de empaque tales como mayores cargas de carbono, sello terminal, grupos polares insertados, bajo contenido de metales pesados, etc, que aunado a las modificaciones físicas tales como tamaños de partícula pequeños ( $< 5 \mu\text{m}$ ), alta porosidad y formas esféricas, dan como resultado columnas cada vez mas eficientes que pueden ser utilizadas bajo condiciones extremas que en el pasado se consideraban impensables ( $\text{pH} > 8$ , temperaturas  $> 60^\circ \text{C}$ , fases móviles 100% acuosas, etc).

##### 2) Contenedor del Empaque

Los contenedores de los empaques solo pueden variar en cuanto a: longitud, diámetro y material.

#### **2.5.4.5 Detección**

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación señal ruido que proporcione y de la capacidad para proporcionar señales reproducibles.

Los tipos de detectores en CLAR se clasifican en:

a) Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. Ejemplo: Detector de Índice de Refracción

b) Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta

##### **2.5.4.5.1 Detector UV**

Es uno de los detectores más utilizado en CLAR, pues resulta ser útil para compuestos aromáticos y otros tipos de compuestos no saturados, no destruye las muestras es relativamente insensible a cambios en el flujo del disolvente, a

la temperatura y a los cambios de composición en la fase móvil. Hay básicamente tres tipos:

- Detector de Longitud de Onda Fija
- Detector de Longitud de Onda Variable
- Detector de Arreglo de Diodos

#### **2.5.4.5.2 Detector de índice de refracción**

Se han diseñado muchos modelos de detectores de índice de refracción para CLAR, que proporcionan una medida diferencial de una propiedad gruesa que posee tanto el soluto como la fase móvil, estos detectores no son específicos pero responden a una amplia gama de compuestos. En la actualidad solamente existen dos tipos:

- Tipo Deflexión
- Tipo Fresnel

#### **2.5.4.5.3 Detector de fluorescencia**

Este detector es sumamente sensible teniendo el inconveniente de que solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.

#### **2.5.4.5.4 Detector de fluorescencia inducida por láser**

Los detectores de Fluorescencia Inducida por láser se clasifican según:

- La Fuente de Excitación
- El sistema óptico

#### **2.5.4.5.5 Electroquímicos**

Los detectores electroquímicos son una alternativa para la detección de moléculas que no presentan absorción de luz U.V. ni fluorescencia nativa.

## 2.6 MONOGRAFÍA DEL FÁRMACO (CEFACLOR)

### 2.6.1 Nomenclatura

#### 2.6.1.1 Nombre químico

3-cloro-7-d-(2-fenilglicinamido)-3-cefen-4-ácido carboxílico, monohidrato (Florey, 1980).

5-Tia-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-ene-2-ácido carboxílico, 7-[(aminofenilacetil)amino]-3-cloro-8-oxo-, monohidrato, [6R-[6 $\alpha$ ,7 $\beta$  (R)]]-(6R,7R)-7-[(R)-2-Amino-2-fenilacetamido]-3-cloro-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4,2,0]oct-2-ene-2-ácido carboxílico monohidrato.

#### 2.6.1.2 Nombre genérico

Cefaclor

#### 2.6.1.3 Nombres comerciales

Ceclor (suspensión y cápsulas), Ceflacid, Cefalan (Thompson, 2002).

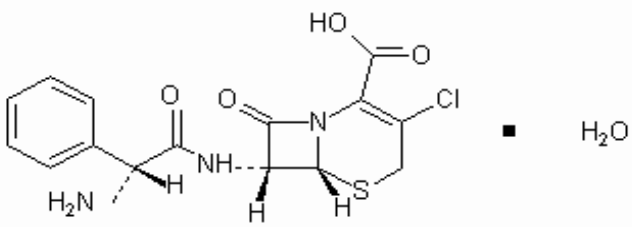
#### 2.6.1.4 Número de registro CAS

53994-73-3 (anhidro); 70356-03-5 (monohidrato).

### 2.6.2 Fórmula, estructura y peso molecular

La estructura, fórmula condensada y peso molecular de Cefaclor se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fórmula, estructura y peso molecular de Cefaclor (Clarks, 2005).


Estructura del Cefaclor
Formula condensada C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S, H <sub>2</sub> O
PM. 385.82 g/mol



### 2.6.3 Propiedades físicas

El cefaclor es un polvo de color blanco o crema y cristalino.

#### 2.6.3.1 Solubilidad

La solubilidad del Cefaclor se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Solubilidad de Cefaclor.

Disolvente	Solubilidad (en mg/mL)
Agua	10.0
pH 1.2	> 5 < 10
pH 4.5	4
pH 7.0	> 5 < 10
Metanol	< 0.5
Octanol	< 0.5
Isopropanol	< 0.5
Dietiléter	< 0.5
Acetato de etilo	< 0.5
Cloroformo	< 0.5
Benceno	< 0.5
Ciclohexano	< 0.5

#### 2.6.3.2 Constantes de disociación

Las constantes de disociación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes de disociación de Cefaclor.

Solvente	PKa	
	COOH	NH <sub>2</sub>
Agua	1.5+/- 0.2	7.17
66% DMF	4.33	7.34

#### 2.6.3.3 Coeficiente de partición

Log P (octanol/ agua), 0.35

### 2.6.3.4 Espectro UV

El espectro de absorción de luz ultravioleta de Cefaclor se encuentra en:

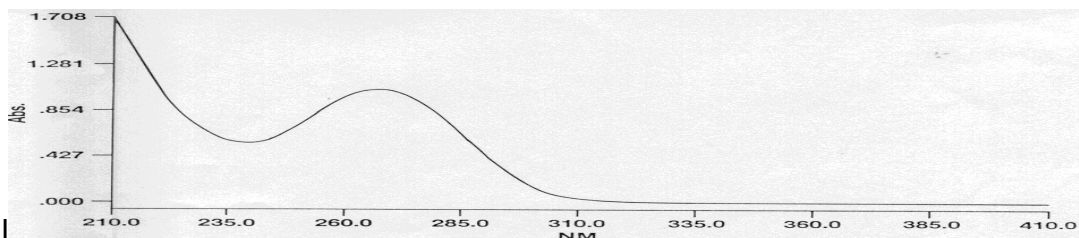


Figura 3. Espectro de absorción ultravioleta de Cefaclor en 0.1M de HCl

### 2.6.4 Estabilidad

#### En estado sólido

Cuando el Cefaclor se presenta como monohidrato en forma cristalina, puede tener estabilidad por dos años, pero se observa un pequeño decremento en su potencia.

#### En Solución

El Cefaclor es estable en solución a pH menores que 4.5. En soluciones preparadas de pH 2.5 y 4.5 (buffers) se obtiene por lo menos 90 por ciento de la actividad inicial después de 72 horas a 4° C. En soluciones neutras o alcalinas, el Cefaclor pierde rápidamente su actividad.

### 2.6.5 Métodos de análisis

Para el análisis de Cefaclor existen diversas metodologías reportadas, pero como el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método por CLAR en fluidos biológicos solo se incluirán los sistemas cromatográficos.

#### 2.6.5.1 Métodos cromatográficos para cuantificar cefaclor en fluidos biológicos

A continuación se presenta en la Tabla 5 un resumen de los sistemas cromatográficos reportados para la cuantificación de Cefaclor (Roschafer, 1982; Nahata; Flores Murrieta, 2001).

Columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Referencia
Li-Chrosorb C8, Altex	Fase móvil: Metanol y buffer de acetato de sodio 0.01M (30:70) Temperatura: 22 a 24°C	Plasma	13
μBondapak C-18, 30 cm X 3.9mm, 10μm.	Fase móvil: Ácido acético(0.5%), Metanol – agua (20:80)	Plasma y orina	14
Xterra RP-8 150 X 4.6mm, 5μm tamaño de partícula	Fase móvil: Acetonitrilo y fosfato monobásico de sodio 0.01M pH 6.5 (7: 93)	Plasma y orina	15

## 2.6.6 Farmacología

### 2.6.6.1 Mecanismo de acción

El Cefaclor es principalmente bactericida, sin embargo puede ser bacteriostático. Actúa adhiriéndose a las proteínas bacterianas fijadoras de penicilina, inhibiendo así la síntesis de la pared celular. El Cefaclor tiene el mismo espectro bactericida que las cefalosporinas de segunda generación, excepto que cuenta con mayor actividad contra *Haemophilus influenzae* y *Branhamella catarrhalis*, resistentes a la ampicilina o amoxicilina.

### 2.6.6.2 Farmacocinética y biodisponibilidad

El Cefaclor es bien absorbido después de su administración vía oral en ayuno. La absorción total no cambia en presencia de alimentos, sin embargo el nivel sérico máximo se reduce a la mitad y se retarda. Entre 30 y 60 minutos después de haber administrado dosis de 250mg, 500mg y 1g a pacientes en ayunas, se obtuvieron concentraciones séricas máximas promedio de aproximadamente 7, 13 y 23mg/L, respectivamente. La vida media en suero en individuos normales es de aproximadamente 1 h (de 0.6 a 0.9 horas).

El Cefaclor se une en 25% a las proteínas plasmáticas. Se excreta rápidamente por los riñones; aproximadamente el 85% es excretado inalterado en la orina dentro de 8 horas, siendo la mayor parte excretada en las dos primeras horas.

#### **2.6.6.3 Reacciones secundarias y adversas**

El Cefaclor presenta efectos secundarios frecuentes como son la anafilaxia, diarrea, vómito, náusea, fiebre, reacciones de hipersensibilidad y urticaria. Otros efectos secundarios menos frecuentes son: nefritis intersticial, artritis, angiodema, artralgia.

Rara vez presenta reacciones similares a la enfermedad del suero, caracterizada por erupción cutánea, típicamente urticaria o eritema multiforme. Así como linfadenopatía y afección renal.

**Contraindicaciones:** Hipersensibilidad a las cefalosporinas.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Planteamiento del problema y justificación**

Para realizar estudios de farmacocinética biodisponibilidad, toxicología, bioequivalencia, etc., es necesario contar con métodos analíticos capaces de cuantificar fármacos en matrices biológicas sin la interferencia de sustancias endógenas o fármacos administrados concomitantemente.

Debido a la diversidad de aplicación, condición del fármaco, metabolitos derivados de éstos y características de los fluidos biológicos, estos métodos no se encuentran al alcance de manera oficial, por lo que el desarrollo del método analítico se torna indispensable y relevante. Por lo tanto el desarrollo de un método analítico para la cuantificación de Cefaclor en plasma, debe ser un método con ventajas sobre métodos antes reportados para un uso posterior en estudios de Bioequivalencia.

La dosis que se administrara a los voluntarios en el estudio de bioequivalencia es de 500 mg y el rango de concentraciones esperado es de 400.0 – 50000.0 ng/mL.

#### **3.2 Objetivo**

Desarrollar un método analítico para cuantificar Cefaclor en plasma por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para un estudio de bioequivalencia en un intervalo de concentraciones de 400.0 – 50000.0 ng/mL, el cual presente ventajas sobre otros métodos antes reportados para la cuantificación

### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.3.1 Sustancia de referencia**

La sustancia de referencia utilizada es Cefaclor USP, lote H.

### 3.3.2 Reactivos y equipo

Tabla 6. Reactivos

REACTIVO	GRADO	MARCA
Agua	HPLC	-----
Ácido acético	RA ACS	Fermont
Metanol	HPLC	Fermont
Cafeína *	USP	-----
Ácido salicílico*	COSUFAR	-----
Acetaminofen	Materia prima	-----
Ácido Cítrico Monohidrato	RA	J. T. Baker
Ácido perclórico 70%	RA	Fermont
Hidróxido de sodio	RA	Fermont
Ácido fosfórico 85 %	RA	Fermont

\*Sustancias de prueba

Tabla 7. Equipo

-Equipo de cromatografía líquida de alta resolución equipado con lo siguiente:

NOMBRE	MARCA	MODELO
Bomba	Waters	600
Detector	Waters	2487
Automuestreador	Waters	717PLUS
Controlador	Waters	600
COLUMNA	MARCA	TIPO
Ultrasphere XL 3mc 4.6 x 70 mm	Beckman	C8

Tabla 8. Otros equipos

EQUIPO	MARCA	NO. DE SERIE
Balanza	Mettler AE 260	H97800
Ultramicrocentrifuga Mikro 22	Hettich	0003436-05-00
Pipeta automática	Labsystems	D64503
Pipeta de descargas múltiples	Eppendorf	3286482
Ultracongelador	Nuaire y Harris	50603905, -----
Refrigerador	Revco	REC5004A18
Centrífuga	Sorvall	9302721

## 4. METODOLOGÍA .

Durante el desarrollo del método se propusieron y estudiaron diferentes alternativas para el sistema cromatográfico, el procesamiento y estabilidad de la muestra. Una vez concluida la etapa del desarrollo del sistema cromatográfico, procesamiento y estabilidad de la muestra se realizó una verificación del método.

#### **4.1 Diseño del procesamiento de la muestra**

Con los elementos anteriores y con el sistema cromatográfico establecido se ensayó un método de extracción del analito. El tipo de extracción que se ensayó fue: Precipitación Selectiva, este método permite eliminar proteínas y otros componentes de elevado peso molecular de la muestra biológica. Además es una técnica sencilla y con un tiempo de ejecución relativamente corto.

El agente precipitante utilizado fue: ácido perclórico.

La metodología que se desarrolló para la extracción del analito y su justificación es la siguiente:

Transferir 200  $\mu\text{L}$  de la muestra a un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL.

Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico (se probó la cantidad mínima para llevar a cabo la precipitación). Agitar con agitador tipo vórtice durante 1 minuto. Esto permite eliminar una gran cantidad de proteínas y otros componentes de elevado peso molecular.

Centrifugar a 15000 r.p.m. durante 5 minutos, a 4°C. De ésta manera se separan los componentes precipitados y los que aún están en disolución.

Transferir el sobrenadante a un vial de vidrio con inserto.

Inyectar 10  $\mu\text{L}$  al sistema cromatográfico. Inicialmente se plantea inyectar el volumen más pequeño de muestra en el sistema cromatográfico. Posteriormente con la fase móvil de elución la muestra pasa a la columna analítica donde propiamente ocurre la separación.

##### **4.1.1 Elección del agente para precipitación**

Debido a las características fisicoquímicas del Cefaclor que requiere un pH menor de 4.5 (a pH mayor es inestable) se elige el ácido perclórico como reactivo de precipitación, el cual permite que la mayoría de los analitos se extraigan fácilmente. Al compararlo con otros métodos de precipitación se tiene la siguiente tabla consultada en (Bonazzi, 1997).

Tabla 9. Métodos empleados para desnaturalizar proteínas séricas y plasmáticas.

Método	Comentario
Calentamiento a 90 °C durante 5 – 15 min.	Puede provocar la descomposición del analito.
Ciclos de congelación – descongelación	Tiempo requerido muy elevado.
Saturación con sulfato de amonio ( <i>salting out</i> )	Sobrenadante con alta concentración de sales, pH final cercano a 7.0
Sulfato de Zinc / NaOH	Precipitado fino con pH final cercano a 7.0, mejora la eficiencia si se realiza a bajas temperaturas.
Ácido metafosfórico	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0. El analito puede descomponerse
Ácido Perclórico	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0. El analito puede descomponerse. La mayoría de los analitos básicos se extraen muy bien.
Ácido tricloroacético	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0. El analito puede descomponerse y presentar dificultad para separar el reactivo del analito.
Etanol – Metanol	Se requieren dos volúmenes del disolvente por cada volumen de fluido. Recomendable si el analito es ácido – sensible.
Acetonitrilo	Se requieren 1.5 volúmenes del disolvente por cada volumen de fluido. Recomendable si el analito es ácido – sensible. El precipitado pastoso minimiza la coprecipitación del analito.
Cloruro de Aluminio	Más eficiente que el sulfato de amonio o ácido tungstico para compuestos básicos.

Con el método de procesamiento propuesto se observó degradación del analito por lo que se pensó en el efecto del pH y se decidió buscar un amortiguador que permitiera la estabilidad de la muestra.

#### 4.1.2 Elección de la solución amortiguadora para el procesamiento de las muestras.

Debido a que la estabilidad en solución del Cefaclor se encuentra reportada entre pH de 2.5 a 4.5 (Merck Index 12<sup>a</sup> Ed) durante el desarrollo del método se estudiaron diferentes alternativas para mantener la muestra plasmática en este



rango.

### Prueba I

Soluciones Amortiguadoras empleadas para ajustar el pH del cefaclor adicionado en plasma. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10. Resultados de las soluciones amortiguadoras para ajustar pH.

Número de buffer	mM	Composición	pH en plasma
1	750	Ácido cítrico + citrato de sodio tribásico dihidratado + agua	5
2	600	800µL de Sol. Amortiguadora 1 + 200µL de agua	6
3	500	800µL de Sol. Amortiguadora 1 + 400µL de agua	6
4	300	400µL de Sol. Amortiguadora 1 + 600µL de agua	7
5	200	400µL de Sol. Amortiguadora 1 + 1.1mL de agua	8
6	100	200µL de Sol. Amortiguadora 1 + 1.3mL de agua	Se perdió la muestra

De acuerdo a esto, se consideran las soluciones amortiguadoras para posteriores determinaciones.

#### *-Preparación de muestras*

Se preparó una curva estándar a partir de pesada independiente para cada día de análisis y las muestras se prepararon adicionadas con Cefaclor, a una concentración de 4000.0 ng /mL, empleando la solución amortiguadora 1, 4 y 5, para obtener el pH de 5, 7 y 8 respectivamente. Las muestras procesadas y analizadas se mantuvieron en ultracongelación a -40° C, durante 0, 3 y 6 horas.

#### *- Cálculos*

Por nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la concentración interpolada.

#### *-Criterio de aceptación*

El porcentaje de recobro no debe variar en  $\pm 15\%$  entre las muestras evaluadas.

### Prueba II

Se probaron los siguientes anticoagulantes con la finalidad de conocer cual permite que la muestra permanezca estable.

Tabla 11. Resultados de los anticoagulantes probados.

Identificación	Composición	pH de la muestra plásmatica
A	2mL plasma (K <sub>3</sub> EDTA) + 100μL de SC2	9
B	2mL plasma (Sodio-Heparina)+100μL SC2	9
C	2mL plasma (Na <sub>3</sub> Citr-Buffered) + 100μL SC2	9

La solución diluida de cefaclor (SC2) se lleva a volumen (10 mL) con una solución amortiguadora de citratos 0.75M (ácido cítrico, citrato de sodio tribásico dihidratado y agua) y tiene una concentración de 80.0μg/mL.

*-Preparación de muestras*

Se preparó una curva a partir de pesada independiente y muestras sanguíneas adicionadas con Cefaclor, a una concentración de 4000.0 ng /mL, empleando los siguientes anticoagulantes: A) K<sub>3</sub>EDTA, B) Sodio-Heparina y C) Na<sub>3</sub>Citr-Buffered. Las muestras procesadas y analizadas se mantuvieron en ultracongelación a -40° C, durante 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Se midió el pH con papel indicador.

*-Cálculos*

Por nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la concentración interpolada.

*-Criterio de aceptación*

El porcentaje de recobro no debe variar en ± 15% entre las muestras evaluadas.

Con los resultados obtenidos se diseñó un plan para evaluar la estabilidad del Cefaclor en plasma (pH fisiológico), así como una nueva solución amortiguadora de citratos 0.75M.

**Prueba III**

Se realizaron los experimentos de estabilidad de la muestra estableciendo ciertas condiciones (indicadas en las tablas de la parte correspondiente a resultados).

La solución amortiguadora de citratos que se utilizó fue la siguiente:

Se transfirieron 15.75 g de Ácido Cítrico monohidrato a un vaso de precipitados de 100 mL adicionar 80 mL de agua HPLC, agitar hasta disolución completa,

ajustar el pH a  $2.5 \pm 0.05$  con la solución de hidróxido de sodio 5N y llevar a 100 mL.

Para las muestras en plasma se adicionó ácido fosfórico para que la muestra tenga un pH final entre 2.5-4.5.

#### *-Preparación de muestras*

Se preparó una curva a partir de pesada independiente para cada día de análisis y se tomaron muestras sanguíneas de tres sujetos, antes y después de tomar cefaclor, adicionándoles el 5% del buffer preparado al volumen total de la muestra, así como 20 $\mu$ L de ácido fosfórico. Las muestras procesadas y analizadas se mantuvieron a ciertas condiciones (indicadas en las tablas de la parte correspondiente a resultados).

#### *-Cálculos*

Por nivel de concentración, se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la concentración interpolada.

#### *-Criterio de aceptación*

Se consideró que la muestra procesada es estable durante el almacenamiento, si el promedio de las concentraciones interpoladas no difería en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones interpoladas al tiempo cero.

De las pruebas I, II y III se obtuvo lo siguiente:

Las muestras en plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5 son estables por lo menos 7 horas.

Las muestras en plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5 son estables por lo menos 24 horas.

Las muestras en plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación( $-40^{\circ}\text{C}$ ), pH de la muestra 2.5-4.5 son estables por lo menos 14 días.

Las muestras en plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5 son estables por lo menos 3 horas.

Las muestras en plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas

en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5 son estables por lo menos 48 horas y 14 días.

De acuerdo a esto para llevar a cabo la validación se utilizó como anticoagulante una solución amortiguadora de citratos 0.75M a pH 2.5 (SAC), la proporción de esta solución en la toma de muestras fue de 5% v/v. Ya que las muestras del estudio de bioequivalencia se diluyeron 5% con solución amortiguadora de citratos 0.75M a pH 2.5 (SAC), durante la validación y el análisis de las muestras las curvas y puntos control utilizados se diluyeron 5% con solución amortiguadora de citratos 0.75M a pH 2.5 (SAC). Adicionalmente se ajusto el pH entre 2.5-4.5 agregando 20.0 µL de ácido fosfórico al 85% por cada mililitro de plasma recién obtenido, esta misma acción se realizó con la curva y puntos control.

Dentro de las pruebas realizadas se observó que en los sistemas cromatográficos existía gran variación en los tiempos de retención de Cefaclor, lo cual originaba problemas en la reproducibilidad del método. Esto fue porque el Cefaclor es un analito inestable (debido al pH) por ello se tuvo cuidado también en el control de temperatura del inyector (4° C).

Por lo que el sistema cromatográfico con el que se consiguió la cuantificación de Cefaclor en el intervalo establecido, es el siguiente:

Flujo: 1.0 mL/min	Volumen de Inyección: 10 µL
Temperatura de la columna: 30°C	Temperatura del inyector: 4°C
Integración:	Áreas
Respuesta:	Áreas
Longitud de onda de detección:	265 nm (lamda máxima de absorción)

## 4.2 Diseño del sistema cromatográfico

#### 4.2.1 Elección de la fase estacionaria (columna)

**Columna C8.** Durante la revisión bibliográfica se observó el uso de columnas C8 para la separación de Cefaclor, por lo que inicialmente se tomo en cuenta la columna Ultrasphere XL 3 $\mu$  4.6 x 70 mm, Marca Beckman, Tipo C8, fase reversa (Tabla 5).

La solubilidad que presenta el Cefaclor en agua es alta (Tabla 3).

Las columnas Ultrasphere XL presentan actividad del grupo silanol, lo cual ocasiona que los compuestos polares, principalmente los que contiene grupos funcionales amino sean retenidos a mayor intensidad a pH cercanos a 3. Esto se da principalmente por la interacción de las cargas generadas por los grupos silanoles residuales (carga negativa) y la de los grupos funcionales amino (carga positiva). Es por ello que se utiliza la columna C8 pues el equilibrio secundario que está llevando acabo el grupo silanol (columna) y el amino de la molécula de Cefaclor no afectan la eficiencia de la columna, asimismo no producen problemas respecto al coleo de los picos que pueden causar errores al llevar a cabo la integración de los mismos.

La columna presenta entre otras características lo siguiente; el rango de pH en el que opera es de 2.5-7.5, temperatura de 0°C a 45°C, presión máxima de 50000psi, flujo de 1.0mL/ min. El disolvente orgánico utilizado es el metanol.

**Detección UV.** La molécula de cefaclor, presenta en su estructura química con dobles enlaces conjugados, lo cual permite que pueda ser detectado a través de espectrofotometría UV sin necesidad de implementar reacciones de derivatización. Los máximos de absorción se presentan a 260 nm.

#### **Sistema cromatográfico:**

Flujo: 1.0 mL/min (Flujo máximo que soporta la columna).

Integración: Áreas (cuantificación del analito).

Volumen de Inyección: 10  $\mu$ L (menor cantidad de muestra que se puede inyectar).

Respuesta: Áreas

Longitud de onda de detección: 265 nm (longitud máxima de absorción).

#### 4.2.2 Elección de la fase móvil

Para poder plantear un sistema cromatográfico fue necesario que la fase móvil tuviera una proporción de disolvente orgánico y una de agua de tal manera que proporcionen una resolución adecuada para el pico de Cefaclor. Por lo que se probaron las siguientes fases móviles.

Fase Móvil I:

Metanol HPLC.....	90%
Agua HPLC.....	10%

Se observaron picos coleados y no se permitió una buena resolución.

Fase Móvil II:

Metanol HPLC.....	88%
Agua HPLC.....	12%
Ácido acético glacial.....	0.1%

Al cambiar la fase móvil se tuvo cuidado con la temperatura de la columna, para saber si influía en el tiempo de retención del pico.

Tomando en cuenta éstas condiciones, se encontraron resultados adecuados con la fase II, pues se tuvo un tiempo de retención para el Cefaclor de alrededor de 5 minutos, y una señal cromatográfica bien definida cuando se realizaron muestras en solución acuosa. (Esto puede observarse en la parte de resultados de los parámetros de validación).

### 4.3 Descripción de la metodología propuesta

Con los elementos anteriores y con el sistema cromatográfico establecido se ensayó el método de Precipitación selectiva por ser el más sencillo, con un tiempo de ejecución relativamente corto, el cual permite eliminar proteínas y otros componentes de elevado peso molecular de la muestra biológica. Como agente precipitante se utilizó el ácido perclórico al 40 % v/v.

#### **4.3.1 Soluciones**

##### **-Solución de hidróxido de sodio 5N**

Pesar 10.0 g de hidróxido de sodio, disolver en 35 mL de agua, pasar a un matraz de 50 mL y llevar a volumen.

##### **-Solución amortiguadora de citratos 0.75M pH 2.5 (SAC)**

Transferir 15.75 g de Ácido Cítrico monohidrato a un vaso de precipitados de 100 mL adicionar 80 mL de agua HPLC, agitar hasta disolución completa, ajustar el pH a  $2.5 \pm 0.05$  con la solución de hidróxido de sodio 5N y llevar a 100 mL.

**Nota:** Esta solución se puede utilizar como anticoagulante.

##### **-Solución de Ácido Perclórico 40% V/V (SPP)**

Transferir lentamente y con agitación suave 57 mL de Ácido perclórico al 70 % a un vaso de precipitados de 100 mL conteniendo previamente 43 mL de agua HPLC.

##### **-Fase móvil**

Mezclar 880 partes de la agua con 120 partes de metanol HPLC y adicionar una parte de Ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar con agitación suave y vacío a través de una membrana de 0.45 micras, millipore tipo HVLP ó equivalente.

##### **-Blanco de reactivos (BR)**

Utilizar la solución amortiguadora de citratos (SAC), procesar igual que las muestras.

##### **-Blanco de plasma (BP)**

Utilizar plasma blanco, a 1 mL de plasma adicionar 50.0  $\mu$ L de SAC y 20.0  $\mu$ L de ácido fosfórico 85%, preparar igual que las muestras.

**- Solución concentrada de cefaclor (SC1)**

Transferir el equivalente a 10.0 mg de Cefaclor, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 10-mL. Disolver y llevar a volumen con SAC. Concentración final de Cefaclor de 1000.0  $\mu$ g/mL.

**- Solución diluida de cefaclor (SC2)**

Transferir 0.800 mL de SC1 a un matraz volumétrico de 10-mL, llevar a volumen con SAC y homogeniza. Concentración final de Cefaclor de 80.0  $\mu$ g/mL.

**- Solución de adecuación del sistema (SA)**

Transferir una alícuota de 200.0  $\mu$ L de la solución SC2 a un matraz volumétrico de 10-mL disolver y llevar a volumen con SAC. Dividir en alícuotas de 1 mL y descongelar cada día de análisis. Concentración final de Cefaclor de 1600 ng/mL.

**- Preparación de la curva**

Transferir las alícuotas de las soluciones que se indican en la tabla I a un tubo eppendorf conteniendo previamente 1.0 mL de plasma y 20  $\mu$ L de ácido fosfórico al 85%. Procesar la curva igual que las muestras.

Tabla 12. Curva de calibración

Identificación	Volumen de SAC ( $\mu$ L)	Solución	Alícuota de solución ( $\mu$ L)	Concentración final(ng/mL)
C1	45.0	SC2	5.0	400.0
C2	40.0	SC2	10.0	800.0
C3	30.0	SC2	20.0	1600.0
C4	0.0	SC2	50.0	4000.0
C5	40.0	SC1	10.0	10000.0
C6	30.0	SC1	20.0	20000.0
C7	20.0	SC1	30.0	30000.0
C8	0.0	SC1	50.0	50000.0

**4.3.2 Equipo**



Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a detector UV, horno para columna, inyector con capacidad para controlar la temperatura entre 4 y 8 °C y una columna Ultrasphere XL C8 de 4.6 X 70 mm con tamaño de partícula de 3 µm.

#### **4.3.3 Metodología analítica**

Transferir 200 µL de la muestra a un tubo eppendorf, adicionar 10 µL de la solución SPP agitar en vortex por 1 minuto. Centrifugar a 15000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Transferir el sobrenadante a un vial de vidrio con inserto.

#### **4.3.4 Condiciones de trabajo**

Se emplean las condiciones mencionadas en el punto 4.2.2 para el sistema cromatográfico.

#### **4.3.5 Cálculos**

##### **Curva**

El intervalo de trabajo que abarca la curva es de 400.0 a 50000.0 ng/mL. Realizar un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, utilizando el Log de la concentración de Cefaclor como “x” y el Log de la respuesta como “y”. Obtener la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

##### **Muestras**

Interpolar las respuestas de las muestras en la curva y calcular la concentración de Cefaclor en las muestras mediante la fórmula siguiente

$$\text{Concentrac ión de Cefaclor} = 10^{\frac{\text{Log}Y - b}{m}}$$

y = respuesta de la muestra, m = pendiente de la curva y b = ordenada al origen

#### **4.3.6 Criterios de aceptación de la corrida analítica**

- Las soluciones BR y BP no presenta señales que interfieran con el pico del compuesto de interés.
- La respuesta de 5 inyecciones sucesivas de la solución SA tiene un CV menor o igual a 2.0%.
- El porcentaje de la diferencia de los puntos de la curva, con respecto a la concentración nominal, al interpolar la respuesta en la curva generada, no es mayor al 15% ni mayor al 20% para el punto más bajo de la curva (400.0 ng/mL).

### **5. Validación del método**

Los métodos analíticos empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos ocupan un lugar importante en la generación de resultados reproducibles y seguros, que son utilizados durante la evaluación e interpretación confiable de la biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética. Dada la trascendencia de los resultados, es esencial el uso de métodos analíticos completamente bien caracterizados y validados que proporcionen resultados confiables que puedan ser satisfactoriamente interpretados.

La validación del método analítico incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular, para la determinación cuantitativa de un compuesto, en una matriz biológica determinada cumple con la finalidad para la que fue desarrollado.

#### **5.1 Determinación, metodología y criterios de aceptación de los parámetros de validación.**

Los parámetros esenciales para asegurar la aceptabilidad de un método analítico son exactitud, precisión, especificidad (selectividad), sensibilidad, estabilidad del fármaco en la matriz de estudio bajo condiciones de almacenamiento y reproducibilidad. Por lo que estos son los parámetros a evaluar.

### **5.1.1 Selectividad**

#### *Preparación de las muestras*

Se preparan 6 blancos con diferentes plasmas de la siguiente manera; a 1 mL de plasma adicionar 50.0  $\mu\text{L}$  de SAC y 20.0  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico 85%, preparar igual que las muestras.

#### *Criterio de aceptación*

Los lotes probados no deben presentar interferencia en el tiempo de retención del Cefaclor.

### **5.1.2 Recuperación Absoluta**

#### *Preparación de muestras*

Se prepararon muestras plasmáticas a las concentraciones de 1200, 5000 y 40000 ng /mL, y soluciones acuosas a las mismas concentraciones. Las concentraciones de las soluciones acuosas corresponden a las concentraciones teóricas de las muestras, después de ser procesadas. Las disoluciones acuosas se inyectan directamente en la columna analítica.

#### *Cálculos*

Se obtuvo el promedio y el coeficiente de variación del área del Cefaclor para cada nivel de concentración de las muestras acuosas y en plasma. Así como el recobro absoluto. Con los resultados, se determinó el porcentaje de recobro para todas las concentraciones probadas, así como el promedio global.

#### *Criterio de aceptación*

El porcentaje de recobro no debe variar en  $\pm 15\%$  entre los niveles evaluados. El CV del área para cada nivel no debe ser mayor al 15%.

### **5.1.3 Exactitud, precisión y linealidad**

Se prepararon curvas a partir de pesadas independientes para cada día de análisis y muestras adicionadas con Cefaclor, a concentraciones de 1200, 5000 y 40000 ng /mL.

Las muestras y las curvas se prepararan diario, debido a la inestabilidad del cefaclor.

Se evaluaron conjuntamente la linealidad, exactitud y precisión del método durante un periodo de 3 días de la siguiente manera:

Linealidad: Se analizó una curva por día de trabajo durante 3 días.

Precisión y exactitud: Analizar durante los tres días las muestras adicionadas por quintuplicado.

#### *Cálculos*

##### ***Linealidad***

De las curvas generadas, obtener la ecuación de la recta por el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (x) al logaritmo de la concentración y como variable dependiente (y) al logaritmo de la respuesta, de manera individual y considerando los datos de la curvas generadas de manera global.

Obtener la ordenada al origen (A), pendiente (B) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para cada curva individual y para la curva global de los tres días.

Se estimó la calidad de ajuste, por la interpolación de la concentración de los puntos de la curva en la ecuación de la recta generada, determinando el porcentaje de la concentración cuantificada respecto a la concentración teórica adicionada. Realizar esto para cada curva independiente y para la global.

#### *Criterios de aceptación*

El coeficiente de determinación para las curvas individuales y para la global debe de ser mayor a 0.98.

El porcentaje de diferencia relativa con respecto al valor nominal debe ser menor o igual a 15% a excepción del punto C1 que debe ser menor o igual al 20%, tanto para las curvas individuales como para la global.

##### ***Exactitud***

Para cada día de análisis, se obtuvo la concentración interpolada de las muestras en la curva correspondiente.

Por nivel, se calculó el porcentaje de diferencia relativa del promedio de las concentraciones interpoladas respecto a la concentración adicionada de las muestras adicionadas en los tres días consecutivos de reproducibilidad.

#### *Criterio de aceptación*

En todos los casos el porcentaje de diferencia relativa promedio, por concentración, no debe ser mayor al 15 % respecto al valor nominal.

#### ***Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)***

Con las concentraciones de las muestras interpoladas en la curva, durante los tres días de este experimento, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) para cada nivel probado. También se calculó el CV por día (repetibilidad) y global (reproducibilidad).

#### *Criterios de aceptación*

Cualquier valor de coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 %.

### **5.1.4 Rango**

Se considero como el rango de este método analítico a aquel intervalo de concentraciones a lo largo del cual se demuestre linealidad, exactitud y precisión.

### **5.1.5 Experimento de aplicación del método para estabilidad de la muestra.**

Se realizan de acuerdo a lo descrito en cada experimento A, B, C, D, E, F, G, H, I.

#### *Cálculos para todos los experimentos de estabilidad*

Se obtiene la concentración interpolada de Cefaclor de acuerdo al método. Interpolar la respuesta de la muestra en una curva recién preparada.

Se obtiene el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la concentración interpolada para cada nivel evaluado, así como el porcentaje de diferencia relativa respecto a la concentración inicial.

*Criterios de aceptación para todos los experimentos de estabilidad*

Considerar la muestra estable durante el almacenamiento si para cada nivel de concentración el promedio de las concentraciones obtenidas a cada tiempo de análisis no difieren en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero, y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

**Nota:** Considerar como la concentración inicial a la concentración obtenida en el 1er día de Linealidad, Exactitud y Precisión.

#### **5.1.5.1 Experimento A. En plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85% a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5.**

##### *Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras procesadas se mantuvieron en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante 4 y 8 horas, se inyectaron. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

#### **5.1.5.2 Experimento B. En plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85% en refrigeración, pH de la muestra 5.0-6.5.**

##### *Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras sin procesar se almacenaron en refrigeración (4-8°C) durante 4 y 8, se inyectaron. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

#### **5.1.5.3 Experimento C. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.**

##### *Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras sin procesar se mantuvieron en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante 4 y 8 horas, se inyectaron. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

**5.1.5.4 Experimento D. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras sin procesar se almacenaron en refrigeración (4-8°C) durante 4, 8 y 24 horas, se inyectaron y las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

**5.1.5.5 Experimento E. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación (-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras sin procesar se mantuvieron previamente almacenadas a -40° C y se analizaron a los 2, 4, 7, 14, 21 y 28 días. Se inyectaron y las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

**5.1.5.6 Experimento F. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras procesadas se mantuvieron en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante 1 y 2 horas, se inyectaron. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.



**5.1.5.7 Experimento G. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras procesadas se mantuvieron en el automuestreador (4-8° C) y se reinyectaron después de 24 y 48 horas. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente

**5.1.5.8 Experimento H. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras procesadas se mantuvieron previamente almacenadas a -40° C y se analizaron a los 2, 4, 7, 14, 21 y 28 días. Se inyectaron y las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

**5.1.5.9 Experimento I. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85% y ciclos de congelación-descongelación, pH de la muestra 2.5-4.5.**

*Parte experimental*

Se utilizaron las mismas muestras del experimento de exactitud y precisión del primer día (tiempo cero). Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Cefaclor; las muestras sin procesar se mantuvieron previamente almacenadas a -40° C y se analizaron primero, segundo y tercer ciclo de congelación, el tiempo en que permanecieron las muestras descongeladas fue por lo menos de 4 horas. Se inyectaron y las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente.

### **5.1.6 Límite de cuantificación**

#### *Parte experimental*

Se analizó por sextuplicado el punto C1 (400 ng/mL) de la curva del primer día de linealidad, exactitud y precisión.

#### *Cálculos*

Se calculó la concentración de Cefaclor en las seis réplicas y se determinó la exactitud y precisión para esta concentración.

#### *Criterio de aceptación*

La exactitud debe ser menor o igual al  $\pm 20\%$  de la concentración adicionada y el coeficiente de variación menor o igual al 20%.

### **5.1.7 Límite de detección**

#### *Preparación de muestras.*

Se realizó una dilución 1:1 con plasma a partir de una muestra adicionada de plasma a la concentración mínima cuantificable (LC). Procesar por sextuplicado.

#### *Cálculos*

Se obtuvieron los cromatogramas y se calculó la relación señal / ruido para el pico de Cefaclor.

#### *Criterio de aceptación*

Se consideró que 200.0 ng /mL era el límite de detección si la relación señal / ruido se encontraba entre 2:1 a 4:1.

### **5.1.8 Tolerancia**

#### *Parte experimental*

Se prepararon curvas a partir de pesadas independientes para cada condición de análisis y muestras adicionadas con Cefaclor, a concentraciones de 1200, 5000 y 40000 ng /mL. De acuerdo a las siguientes condiciones:

Condición	Tipo de Modificación	Observaciones
1	Ninguna.	Condición original
2	Cambio de columna.	Columna Clave CA 2005 002
3	Cambio de proporción del modificador orgánico.	Cambio de 1% más de Metanol en la fase móvil (Agua : Metanol : Ácido acético 870:130:1).
4	Número de inyecciones que es capaz de soportar el sistema cromatográfico.	Se evaluara realizando 160 inyecciones en las condiciones iniciales.
5	Procesamiento de muestra.	Se cambia la centrifugación de 15000 rpm a 4°C durante 5 min. en CEN006 a centrifugación a 3600 rpm a 4°C durante 15 min. en CEN005

Tabla 13. Condiciones para tolerancia.

#### *Cálculos*

Obtener la concentración interpolada para Cefaclor.

Obtener el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la concentración interpolada a cada condición de análisis, así como el porcentaje de diferencia respecto a la concentración cuantificada en la condición original.

#### *Criterios de aceptación*

Se considerará que el sistema es tolerante a cambios del sistema cromatográfico (condiciones 2-3), si el promedio de las concentraciones obtenidas no difieren en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas en la condición original, y si el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resultados de la elección del amortiguador para el procesamiento de las muestras.

*Resultados la prueba 1*

Tabla 14. Resultado de la estabilidad de las muestras a pH 5, 7 y 8.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	3 HORA	6 HORAS
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
4000.0 (pH 5)	2841.7	2771.4	2763.8
4000.0 (pH 7)	3552.3	3545.8	3480.8
4000.0 (pH 8)	3427.5	2727.2	1925.6
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
4000.0 (pH 5)		-2.47	-2.74
4000.0 (pH 7)		-0.18	-2.01
4000.0 (pH 8)		-20.43	-43.82

En esta tabla se puede observar que para las muestras a pH 5 y 7, el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor del To no fue mayor al 15 %, cuya concentración es de 4000.0 ng /mL. Mientras que para el pH de 8 el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor inicial es mayor al 15%, por lo que se considera a la muestra inestable en este pH.

*Resultados prueba II*

Tabla 15. Resultado de la estabilidad de las muestras.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	3 HORA	6 HORAS	9 HORAS	12 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)					
4000.0 (Heparina)	38735	29795.5	20422.5	1771. 7	1177.4
4000.0 (Na <sub>3</sub> CitrBuffered)	3399.2	----	2576.8	2178. 4	1625.9
4000.0(EDTA)	4401.2	2697.1	2814.9	2131. 5	1221.1
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To					
4000.0 (Heparina)		23.07	47.27	95.40	96.96
4000.0 (Na <sub>3</sub> CitrBuffered)		----	24.2	35.9	52.2
4000.0 (EDTA)		38.7	36.0	51.6	72.3

En esta tabla se puede observar que para todas las muestras, el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor inicial es mayor al 15 %. Por lo que se considera a la muestra inestable en los anticoagulantes probados.

*Resultados del Experimento III.*

Condición A (En plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5. 4 y 7 horas).

Tabla 16. Resultado de la estabilidad de las muestras para la condición A

<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>4HORA</b>	<b>7 HORAS</b>
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
Sujeto 1	9393.3	9220.5	9303.4
Sujeto2	18842.1	18187.5	18453.2
Sujeto3	14909.9	14390.4	14677.1
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
Sujeto 1		1.8	0.9
Sujeto2		3.6	2.1
Sujeto3		3.6	1.6

En esta tabla se puede observar que para las muestras en la condición A, son estables 4 y 8 horas ya que el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero no fue mayor al 15 %.

Condición B (En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5. 7 y 24 horas)

Tabla 17. Resultado de la estabilidad de las muestras para la condición B.

<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>7 HORA</b>	<b>24 HORAS</b>
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
Sujeto 1	9393.3	9572.8	9632.3
Sujeto2	18842.1	18807.2	17196.3
Sujeto3	14909.9	14683.8	17254.4
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
Sujeto 1		1.9	2.5
Sujeto2		0.2	8.7
Sujeto3		1.5	13.5

En esta tabla se puede observar que para las muestras en la condición B, son estables 7 y 24 horas ya que el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero no fue mayor al 15 %.

Condición C (En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5. 2, 7 y 14 días)

Tabla 18. Resultado de la estabilidad de las muestras para la condición C.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	2 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/ML)			
Sujeto 1	9393.3	9994.0	9710.0	9413.1
Sujeto2	18842.1	18901.2	18471.6	17817.9
Sujeto3	14909.9	15070.6	14502.6	14187.4
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To			
Sujeto 1		6.4	3.4	39.0
Sujeto2		0.3	1.9	20.6
Sujeto3		1.1	2.7	5.1

En esta tabla se puede observar que para las muestras en la condición C, son estables 2 y 7 días ya que el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero no fue mayor al 15 %.Excepto para los 14 días.

Condición D (En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5. 3 horas).

Tabla 19. Resultado de la estabilidad de las muestras para la condición D.

<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>3 HORAS</b>
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)	
Sujeto 1	9393.3	8896.4
Sujeto2	18842.1	18267.8
Sujeto3	14909.9	14722.1
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To	
Sujeto 1		5.2
Sujeto2		3.1
Sujeto3		1.2

En esta tabla se puede observar que para las muestras en la condición D, son estables 3 horas ya que el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero no fue mayor al 15 %.

Condición E (En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5. 48 y 96 horas, 7 y 14 días).

Tabla 20. Resultado de la estabilidad de las muestras para la condición E.

<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>48 HORAS</b>	<b>14 DIAS</b>
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
Sujeto 1	9393.3	9869.9	9798.2
Sujeto2	18842.1	20451.0	18140.3
Sujeto3	14909.9	15563.3	14592.1
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
Sujeto 1		5.0	4.3
Sujeto2		8.8	3.7
Sujeto3		4.1	2.1



En esta tabla se puede observar que para las muestras en la condición E, son estables por lo menos 14 días ya que el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero no fue mayor al 15 %.

## 6.2 Resultados del método cromatográfico

En las figuras 4 se presenta el cromatograma representativo de una muestra en plasma donde se ha aplicado el método de la precipitación con ácido perclórico.

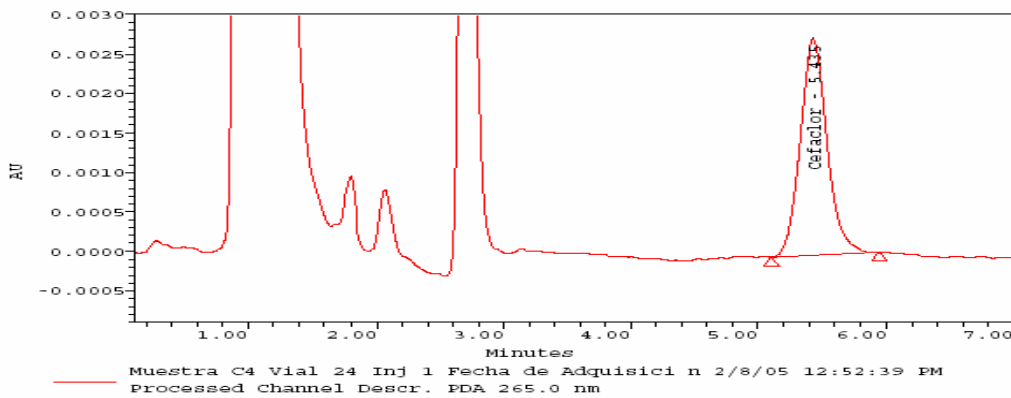


Figura 4. Cromatograma representativo de Cefaclor en plasma (4000.0 ng/mL). De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos plantear las siguientes consideraciones:

- La precipitación selectiva es un método sumamente sencillo y rápido, donde la limpieza es efectiva, pues no existen señales que interfieren con el pico del cefaclor.

Además no se emplean gran cantidad de disolventes.

Tabla 21. Tratamiento de una muestra plasmática.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PLASMÁTICA	FASE MÓVIL	RESULTADOS
<b>PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS</b>		
1000 µL plasma + 20 µL+ 50.0 µL SC2 Tomar 200 µL y adicionar 10 µL de SPP. Vortex 1' y centrifugación a 15000 r.p.m. 5'a 4° C . Transferir sobrenadante a vial de vidrio con inserto.	Agua HPLC .....88 % MeOH.....12% Ácido acético glacial.....0.1%	- No se presentan señales que interfieren con la señal del Cefaclor.  - El Cefaclor tuvo un $t_r =$ 5 min., se observa buena eficiencia de la columna.

### 6.3 Resultados de los Parámetros de Validación Determinados

#### 6.3.1 Resultados de selectividad

En la Figura 5 se muestra el cromatograma que corresponde a uno de los 6 lotes diferentes de plasma probados. En esta figura se puede apreciar que no se presentan interferencias al tiempo de retención del Cefaclor, cuando se realiza la lectura a una longitud de onda de 265nm.

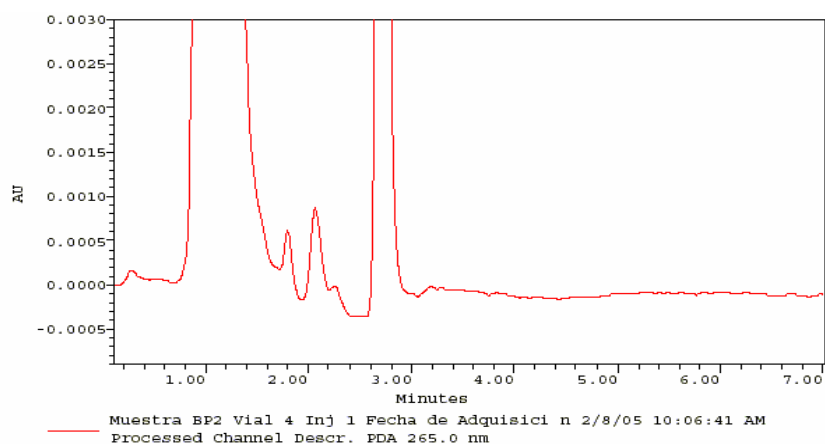


Figura 5. Cromatograma de un blanco de plasma

### 6.3.2 Recuperación absoluta

En la Tabla 22 se presentan los resultados del experimento de recuperación absoluta. En esta tabla se puede observar que el promedio del porcentaje de recobro para Cefaclor es de aproximadamente 73.36%. También se puede observar que el porcentaje de recobro absoluto para Cefaclor no varía  $\pm 15\%$  del promedio en todos los niveles.

<b>RECOBRO DE CEFACLOR</b>			
<b>MUESTRAS ACUOSAS</b>			
<b>CONCENTRACIÓN (ng/mL)</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Promedio de la respuesta</b>	<b>N</b>
Bajo (AC1)	1200.0	15910	3
Medio (AC2)	5000.0	67006	3
Alto (AC3)	40000.0	551390	3
<b>MUESTRAS PLASMÁTICAS</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Promedio de la respuesta</b>	<b>N</b>
Bajo (M1)	1200.0	11617	5
Medio (M2)	5000.0	50334	5
Alto (M3)	40000.0	396755	5
<b>PROMEDIO DE % DE RECOBRO</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>% Recobro absoluto</b>	<b>% De diferencia respecto al promedio</b>
Bajo (M1)	1200.0	73.02	-0.47
Medio (M2)	5000.0	75.12	2.39
Alto (M3)	40000.0	71.96	-1.92
<b>Promedio</b>		73.36	
<b>D.E.</b>		1.61	
<b>C.V.</b>		2.2	

### 6.3.3 Exactitud, precisión y linealidad

#### Linealidad del método

En la tabla 23 y 24 se muestra un resumen de los resultados de la linealidad del método y en la tabla 25 se resumen los estadísticos de regresión de las curvas obtenidas durante los tres días de análisis.

Tabla 23. Linealidad del método.

LINEALIDAD PRIMER DÍA						
IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN CEFACLOR (ng/mL)	RESPUESTA	LOGARITMO CONCENTRACIÓN (µg/mL)	LOGARITMO RESPUESTA	CONC. INTERPOLADA	% DE DIFERENCIA
C1	400.0	3509	2.6021	3.5452	364.0	-9.00
C2	800.0	7696	2.9031	3.8863	799.8	-0.02
C3	1600.0	17416	3.2041	4.2409	1813.6	13.35
C4	4000.0	39628	3.6021	4.5980	4134.8	3.37
C5	10000.0	93550	4.0000	4.9710	9781.4	-2.19
C6	20000.0	188768	4.3010	5.2759	19770.9	-1.15
C7	30000.0	279239	4.4771	5.4460	29274.2	-2.42
C8	50000.0	473579	4.6990	5.6754	49711.5	-0.58

LINEALIDAD SEGUNDO DÍA						
IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN CEFACLOR (ng/mL)	RESPUESTA	LOGARITMO CONCENTRACIÓN (µg/mL)	LOGARITMO RESPUESTA	CONC. INTERPOLADA	% DE DIFERENCIA
C1	400.0	3392	2.6021	3.5305	365.7	-8.56
C2	800.0	8103	2.9031	3.9086	857.7	7.21
C3	1600.0	15912	3.2041	4.2017	1660.3	3.77
C4	4000.0	39489	3.6021	4.5965	4041.5	1.04
C5	10000.0	99999	4.0000	5.0000	10034.3	0.34
C6	20000.0	200756	4.3010	5.3027	19848.5	-0.76
C7	30000.0	301582	4.4771	5.4794	29560.2	-1.47
C8	50000.0	511535	4.6990	5.7089	49579.3	-0.84

LINEALIDAD TERCER DIA						
IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN CEFACLOR (ng/mL)	RESPUESTA	LOGARITMO CONCENTRACIÓN (µg/mL)	LOGARITMO RESPUESTA	CONC. INTERPOLADA	% DE DIFERENCIA
C1	400.0	3838	3.5305	3.5841	401.1	0.28
C2	800.0	7665	3.9086	3.8845	790.2	-1.22
C3	1600.0	15995	4.2017	4.2040	1625.3	1.58
C4	4000.0	40096	4.5965	4.6031	4001.0	0.03
C5	10000.0	100827	5.0000	5.0036	9879.9	-1.20
C6	20000.0	207227	5.3027	5.3164	20019.5	0.10
C7	30000.0	314006	5.4794	5.4969	30087.5	0.29
C8	50000.0	528152	5.7089	5.7228	50090.5	0.18

Tabla 24. Linealidad del método.

CURVA GLOBAL						
CONCENTRACIÓN CEFACLOR (ng/mL)	DIA	LOGARITMO CONCENTRACIÓN CEFACLOR	LOGARITMO RESPUESTA	CONC. INTERPOLADA (ng/mL)	%DE DIFERENCIA	% DE DIFERENCIA PROMEDIO
400.0	1	2.6021	3.5841	404.0	1.00	-5.71
400.0	2	2.6021	3.5452	369.8	7.55	
400.0	3	2.6021	3.5305	357.6	10.59	
800.0	1	2.9031	3.8845	799.7	0.04	1.97
800.0	2	2.9031	3.8863	802.9	0.36	
800.0	3	2.9031	3.9086	844.8	5.60	
1600.0	1	3.2041	4.2040	1652.9	3.31	6.15
1600.0	2	3.2041	4.2409	1797.8	12.36	
1600.0	3	3.2041	4.2017	1644.4	2.78	
4000.0	1	3.6021	4.6031	4094.4	2.36	1.46
4000.0	2	3.6021	4.5980	4047.2	1.18	
4000.0	3	3.6021	4.5965	4033.2	0.83	
10000.0	1	4.0000	5.0036	10173.5	1.73	-0.96

10000.0	2	4.0000	4.9710	9448.4	5.52	
10000.0	3	4.0000	5.0000	10091.0	0.91	
20000.0	1	4.3010	5.3164	20714.9	3.57	-0.53
20000.0	2	4.3010	5.2759	18892.5	5.54	
20000.0	3	4.3010	5.3027	20076.3	0.38	
30000.0	1	4.4771	5.4969	31220.1	4.07	-1.08
30000.0	2	4.4771	5.4460	27805.7	7.31	
30000.0	3	4.4771	5.4794	30000.5	0.00	
50000.0	1	4.6990	5.7228	52158.8	4.32	-0.31
50000.0	2	4.6990	5.6754	46835.5	6.33	
50000.0	3	4.6990	5.7089	50538.7	1.08	

En estas tablas se puede observar que en los tres días de análisis, el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero fue no mayor al 15 % y no mayor al 20% para el punto más bajo de la curva, cuya concentración es de 400.0 ng /mL.

### **Exactitud y Precisión**

En la tabla 26 se muestran los resultados de los experimentos de exactitud y precisión. Se puede observar que tanto en los resultados globales como en los tres días de análisis, para los tres niveles de concentración evaluados, la diferencia del promedio no es más del 15 % respecto a la concentración adicionada de Cefaclor.

Tabla 26. Exactitud y precisión del método.

		IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		
		M1	M2	M3
		CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE CEFACLOR (ng/mL)		
		1200.0	5000.0	40000.0
		CONC. CUANTIFICADA DE CEFACLOR		
DIA 1		1196.0	5045.1	37936.0
		1142.1	4989.2	37624.9
		1186.8	4960.6	37624.2
		1221.1	4994.7	38054.9
		1193.3	5011.2	37968.7
	N PROMEDIO D.E. C.V. % DIFERENCIA	5	5	5
		1187.9	5000.2	37841.7
		2.870E+01	3.105E+01	2.030E+02
		2.4	0.6	0.5
		1.01	0.00	5.40
DIA 2		1237.5	4853.8	39547.7
		1260.8	5137.9	41599.2
		1280.3	5239.6	41963.9
		1243.5	5265.0	42103.6
		1275.3	5255.0	41843.1
	N PROMEDIO D.E. C.V. % DIFERENCIA	5	5	5
		1259.5	5150.3	41411.5
		1.887E+01	1.733E+02	1.058E+03
		1.5	3.4	2.6
		5.0	3.0	3.5
DIA 3		1166.7	5095.2	39988.6
		1168.0	5047.6	40150.5
		1225.0	5093.7	39964.7
		1106.2	5179.2	40136.8
		1124.7	5170.0	40712.9
	N PROMEDIO	5	5	5
		1158.1	5117.1	40190.7

	D.E.	4.598E+01	5.593E+01	3.038E+02
	C.V.	4.0	1.1	0.8
	% DIFERENCIA	3.5	2.3	0.5
RESULTADOS GLOBALES	N	15	15	15
	PROMEDIO	1201.8	5089.2	39814.6
	D.E.	5.367E+01	1.191E+02	1.646E+03
	C.V.	4.5	2.3	4.1
	% DIFERENCIA	0.2	1.8	0.5

### 6.3.4 Rango

Se estableció como rango para este método analítico, de 400.0 a 50000.0 ng /mL de Cefaclor ya que se demostró que en este intervalo de concentraciones el método es lineal, exacto y preciso.

### 6.3.5 Estabilidad de la muestra

#### 6.3.5.1 Experimento A. En plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85% a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5.

Los resultados de la estabilidad de la muestra sin la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5, se muestran en la Tabla 27 y 28. En estas tablas se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 4 y 8 horas ya que el promedio de las concentraciones obtenidas a las 4 y 8 horas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 27. Resultado de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente 4 horas.



<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>4 HORAS</b>
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
1200.0	1187.9	1091.0
5000.0	5000.2	4618.5
40000.0	37841.7	38905.0
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
1200.0		-8.16
5000.0		-7.63
40000.0		2.81

Tabla 28. Resultado de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente 8 horas.

<b>CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)</b>	<b>To</b>	<b>8 HORAS</b>
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
1200.0	1126.4	1173.4
5000.0	5379.1	5003.2
40000.0	38529.2	38820.8
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
1200.0		4.17
5000.0		-6.99
40000.0		0.76

**6.3.5.2 Experimento B. En plasma sin la adición del ácido fosfórico al 85% en refrigeración, pH de la muestra 5.0-6.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra sin la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, en refrigeración (4-8° C), pH de la muestra 5.0-6.5, se muestran en la Tabla 29. En esta tabla se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 4 y 8 horas ya que el promedio de las concentraciones obtenidas a las 4 y 8 horas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 29. Resultados de la estabilidad de las muestras en refrigeración 4 y 8 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	4 HORAS	8 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)			
1200.0	1187.9	1223.1	1156.5
5000.0	5000.2	5069.8	4956.9
40000.0	37841.7	38581.0	38212.9
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To			
1200.0		2.96	-2.64
5000.0		1.39	-0.87
40000.0		1.95	0.98

**6.3.5.3 Experimento C. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 30 y 31. En estas tablas se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 4 y 8 horas ya que el promedio de

las concentraciones obtenidas a las 4 y 8 horas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 30. Resultados de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente 4 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	4 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
1200.0	1187.9	1218.8
5000.0	5000.2	5055.6
40000.0	37841.7	38247.4
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
1200.0		2.60
5000.0		1.11
40000.0		1.07

Tabla 31. Resultados de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente 8 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	8 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)		
1200.0	1126.4	1142.6
5000.0	5379.1	5173.2
40000.0	38529.2	39461.1
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To		
1200.0		1.44
5000.0		-3.83
40000.0		2.42

**6.3.5.4 Experimento D. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 32. En esta tabla se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 4, 8 y 24 horas ya que el promedio de las concentraciones

obtenidas a las 4, 8 y 24 horas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 32. Resultados de la estabilidad de las muestras en refrigeración las 4, 8 y 24 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	4 HORAS	8 HORAS	24 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)				
1200.0	1187.9	1212.2	1162.2	1300.9
5000.0	5000.2	4979.6	4986.1	5298.5
40000.0	37841.7	37905.1	37650.5	41742.8
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To				
1200.0		2.05	-2.16	9.51
5000.0		-0.41	-0.28	5.97
40000.0		0.17	-0.51	10.31

**6.3.5.5 Experimento E. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación (-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación (-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 33. En esta tabla se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 2, 4, 7, 15, 21 y 29 ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 33. Resultados de la estabilidad de las muestras en ultracongelación a los 2,4,7,15,21,29 días.

CONCENTRACIÓN	To	2 DIAS				29 DIAS
---------------	----	--------	--	--	--	---------

TEÓRICA (ng/mL)			7 DIAS	15 DIAS	21 DIAS	
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)						
1200.0	1187.9	1334.1	1307.4	1275.2	1094.9	1142.8
5000.0	5000.2	5315.4	5508.3	5427.0	4941.0	5164.2
40000.0	37841.7	40506.0	38863.2	42089.2	37159.7	42315.6
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL T <sub>0</sub>						
1200.0		12.31	10.06	7.35	-7.83	-3.80
5000.0		6.30	10.16	8.54	-1.18	3.28
40000.0		7.04	2.70	11.22	-1.80	11.82

**6.3.5.6 Experimento F. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 34. En esta tabla se puede apreciar que las muestras procesadas son estables durante 1 y 2 horas ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 34. Resultados de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente las 1 y 2 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	T <sub>0</sub>	1 HORA	2 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)			
1200.0	1187.9	1206.6	1164.9
5000.0	5000.2	5072.4	5081.7

40000.0	37841.7	37751.3	38430.7
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL T <sub>0</sub>			
1200.0		1.57	-1.94
5000.0		1.44	1.63
40000.0		-0.24	1.56

**6.3.5.7 Experimento G. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 35. En esta tabla se puede apreciar que las muestras procesadas son estables durante 24 y 48 horas ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 35. Resultados de la estabilidad de las muestras en refrigeración (automuestreador) 24 y 48 horas.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	T <sub>0</sub>	24 HORAS	48 HORAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)			
1200.0	1187.9	1277.5	1313.7

5000.0	5000.2	5369.9	5325.4
40000.0	37841.7	41963.2	41010.8
% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To			
1200.0		7.54	10.59
5000.0		7.39	6.50
40000.0		10.89	8.37

**6.3.5.8 Experimento H. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas y almacenadas en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 36. En esta tabla se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante 2, 4, 7, 15, 21 y 29 ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 36. Resultados de la estabilidad de las muestras en ultracongelación 2, 4 y 7 días.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	2 DIAS	4 DIAS	7 DIAS
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)				
1200.0	1187.9	1285.3	1518.6	1310.1
5000.0	5000.2	5416.1	5901.7	5751.2
40000.0	37841.7	41697.6	40634.4	38813.1

% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To				
1200.0		8.20	27.84	10.29
5000.0		8.32	18.03	15.02
40000.0		10.19	7.38	2.57

**6.3.5.9 Experimento I. En plasma con la adición del ácido fosfórico al 85% y ciclos de congelación-descongelación, pH de la muestra 2.5-4.5.**

Los resultados de la estabilidad de la muestra con la adición del ácido fosfórico, pH de la muestra 2.5-4.5, se muestran en la Tabla 37. En esta tabla se puede apreciar que las muestras sin procesar son estables durante dos ciclos de congelación descongelación, ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero.

Tabla 37. Resultados de la estabilidad de las muestras en ciclos.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	To	PRIMER CICLO	SEGUNDO CICLO	TERCER CICLO
PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)				
1200.0	1187.9	1274.7	1234.2	982.3
5000.0	5000.2	5018.1	4582.9	4198.6
40000.0	37841.7	41800.1	38397.0	37927.5



% DE DIFERENCIA RESPECTO AL To				
1200.0		7.31	3.90	17.31
5000.0		0.36	8.35	16.03
40000.0		10.46	1.47	0.23

### 6.3.6 Límite de cuantificación

En la tabla 38 se muestran los resultados de la evaluación del límite de cuantificación.

Tabla 38. Resultados de determinación de límite de cuantificación.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE CEFACLOR (ng/mL)	
400.0	
CONCENTRACIÓN CUANTIFIC. DE CEFACLOR (ng/mL)	
	468.0
	448.1
	463.4
	467.0
	433.8
	417.6
N	6
PROMEDIO	449.7
D.E.	20.5
C.V.	4.6, 12.42% de dif.

En esta tabla se puede apreciar que la diferencia del promedio de la concentración interpolada no es mayor del 20 % respecto a la concentración adicionada de Cefaclor (400.0 ng /mL) y que el coeficiente de variación de las 6 réplicas analizadas no es mayor a 20%.

### 6.3.7 Límite de detección

En la figura 6 se muestra el cromatograma de una solución de Cefaclor en plasma a una concentración de 400.0 ng/ mL. En esta figura se puede observar

que la señal de Cefaclor presenta una relación con respecto al ruido entre 1:2 y 1:4. Dado lo anterior, puede considerarse 400.0 ng /mL como el límite de detección para este método.

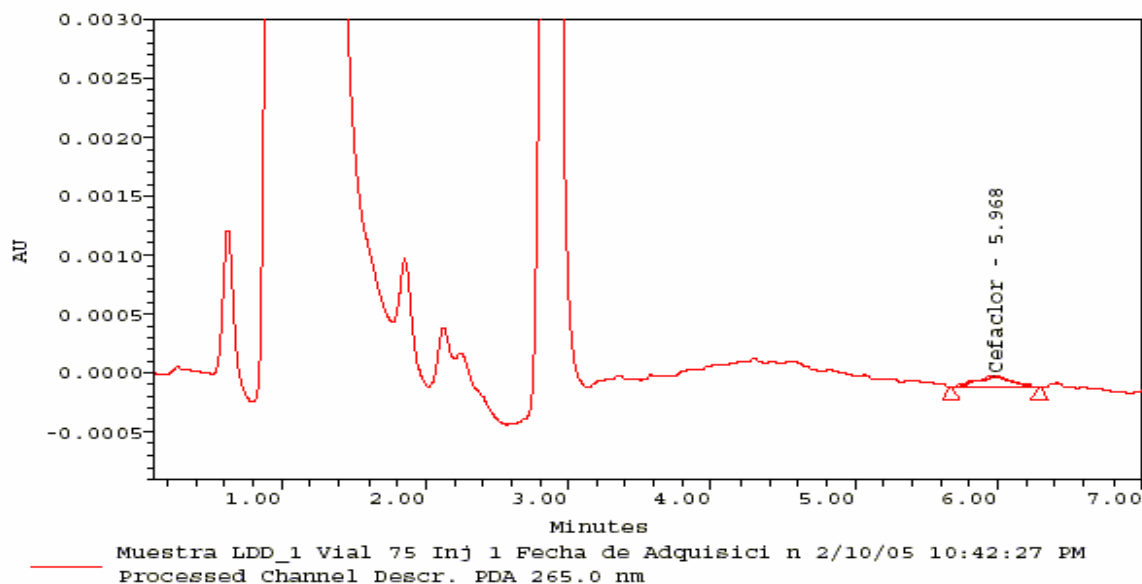


Figura 6. Resultado de la determinación del límite de detección.

### 6.3.8 Tolerancia

Los resultados de las modificaciones se muestran en las tablas 39, 40, 41 y 42. En estas tablas se puede apreciar que las muestras son estables en las condiciones propuestas, ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en  $\pm 15\%$ , del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero y el coeficiente de variación no es mayor al 15% en los niveles probados.

Tabla 39. Tolerancia a cambio en el procesamiento de muestra.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	Condiciones de centrifugación de las muestras	
	15,000 rpm 5 minutos, 4°C	3,600 rpm 15 minutos, 4°C
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)	
1200.0	1151.8	1128.4
5000.0	4513.1	4538.3

40000.0	42289.6	41637.0
	% DE DIFERENCIA RESPECTO A LA CONDICIÓN ORIGINAL	
1200.0		-2.03
5000.0		0.56
40000.0		-1.54

Tabla 40. Tolerancia a cambio de columna (C2) y número de inyecciones que es capaz de soportar el sistema cromatográfico (C4).

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	CONDICIÓN ORIGINAL	CONDICIÓN 2 Y CONDICIÓN 4
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)	
1200.0	1151.8	1171.0
5000.0	4513.1	4747.0
40000.0	42289.6	41582.7
	% DE DIFERENCIA RESPECTO A LA CONDICIÓN ORIGINAL.	
1200.0		1.67
5000.0		5.18
40000.0		-1.67

Condición 2: Cambio de columna.

Condición 4: Resultados de una corrida de 160 inyecciones de muestras en plasma.

Tabla 41. Tolerancia a cambio de proporción en el modificador orgánico de la fase móvil.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	CONDICIÓN ORIGINAL	CAMBIO DE PROPORCIÓN DE MODIFICADOR ORGÁNICO
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)	

1200.0	1151.8	1200.7
5000.0	4513.1	4852.2
40000.0	42289.6	42556.7
% DE DIFERENCIA RESPECTO A LA CONDICIÓN ORIGINAL		
1200.0		4.25
5000.0		7.51
40000.0		0.63

Tabla 42. Tolerancia a cambio de analista y equipo.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	ANALISTA 4 (Condición de referencia)	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 3
	PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA (ng/mL)			
1200.0	1218.5	1140.6	1288.6	1180.9
5000.0	5287.7	5201.6	5292.4	5353.9
40000.0	37348.3	39403.4	39694.3	39827.1
	% DE DIFERENCIA RESPECTO AL $T_0$			
1200.0		6.39	-5.75	3.09
5000.0		1.63	-0.09	-1.25
40000.0		-5.50	-6.28	-6.64

## 7 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

- Linealidad del método, precisión y exactitud.

De los resultados obtenidos en la tabla 25 se deduce que el método es lineal en el rango de concentración de 400.0 ng/mL a 50000.0 ng/mL, se estimó la calidad de ajuste, por la interpolación de la concentración de los puntos de la curva en la ecuación de la recta generada, determinando el porcentaje de la

concentración cuantificada respecto a la concentración teórica adicionada. Al realizar esto para cada curva independiente y para la global, se obtuvo que los coeficientes de correlación de las tres curvas estándar cargadas en tres días diferentes y la global fueran mayores a 0.99.

El sistema de cromatografía empleado proporciono parámetros cromatográficos adecuados, lo cual trae como consecuencia que los criterios de validación determinados muestren que el método desarrollado cumpla con los requerimientos de sensibilidad, exactitud y precisión, para ser empleado en el análisis de muestras de estudios de bioequivalencia.

- Estabilidad de las muestras.

De acuerdo a los datos obtenidos de las pruebas de estabilidad en las condiciones anteriormente descritas (tablas 27 a 37) se encontró que las muestras de Cefaclor en plasma:

1. Sin la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, a temperatura ambiente, pH de la muestra 5.0-6.5, son estables por lo menos 8 horas en la mesa de trabajo.
2. in la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar, en refrigeración, pH de la muestra 5.0-6.5, son estables por lo menos 8 horas.
3. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5, son estables por lo menos 8 horas en la mesa de trabajo.
4. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5, son estables por lo menos 24 horas.
5. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, sin procesar en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5, son estables después de descongelar por lo menos 29 días.
6. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas a temperatura ambiente, pH de la muestra 2.5-4.5, son estables por lo menos 2 horas en la mesa de trabajo.

7. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas en refrigeración, pH de la muestra 2.5-4.5, son estables por lo menos 48 horas.
8. Con la adición del ácido fosfórico al 85%, procesadas y almacenadas en ultracongelación(-40°C), pH de la muestra 2.5-4.5, son estables por 2 días.
9. Con la adición del ácido fosfórico, pH de la muestra 2.5-4.5, son estables después de ser sometidas a dos ciclos de congelación-descongelación.

Lo que permitió seleccionar las mejores condiciones para llevar a cabo el estudio de Cefaclor.

- Tolerancia

El sistema es tolerante a cambio de columna, ligeros cambios en la composición de la fase móvil (Agua : Metanol : Ácido acético 870:130:1) y cambio en la velocidad y tiempo de centrifugación de las muestras. Adicionalmente el sistema cromatográfico es capaz de soportar 162 inyecciones de muestras de plasma procesadas con el método propuesto. Así mismo el método es tolerante a cambios de analista y de equipo cromatográfico.

## **8 CONCLUSIONES**

Se establecieron las condiciones experimentales necesarias para cuantificar de manera rápida, robusta, sensible, selectiva, exacta y precisa Cefaclor en plasma utilizando CLAR en un intervalo de concentración de 400.0 ng/mL a 50000.0 ng/mL.

El tratamiento de la muestra propuesto fue sencillo en términos de manipulación y tiempos de ejecución.

Para que el método pueda emplearse en estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia se deberá realizar la validación formal del método.

## **9 BIBLIOGRAFÍA**

<sup>1</sup> Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids en Analysis of Drugs in Biological Fluids. USA. CRC Press. 1987: 25-31.

<sup>2</sup> NOM-177-SSA1-1998. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es

intercambiable. Requisitos a los que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial 05-07-1999.

<sup>3</sup> Fritz J. Introduction and principles y Practical considerations en Analytical Solid Phase Extraction. USA. John Wiley & Sons Inc. 1999:1-14 y 63-87.

<sup>4</sup> Weston A. Instrumentation for high performance liquid chromatography en HPLC and CE principles and practice. USA. Academic Press. 1997:116-118.

<sup>5</sup> Connors K. Liquid chromatography en A textbook of pharmaceutical analysis. New York. John Wiley & Sons Inc. 3<sup>a</sup> ed. 1987:373.

<sup>6</sup> Skoog D. Introducción a las separaciones analíticas en Fundamentos de química analítica. Barcelona. Ed. Reverté S.A. 4<sup>a</sup> ed. 1997:667-686.

<sup>7</sup> Florey editor Cefaclor en Analytical profiles of drug substances and excipients- vol. 9:107-123 1980.

<sup>8</sup> Bonazzi D, Gotti R. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1997 Nov 16(3):431-438.

<sup>9</sup> Anthony C Moffat. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Great Britain. Pharmaceutical Press.Vol 2. Third edition.2004:761-762.

<sup>10</sup> Thomson PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. México. PLM 48<sup>a</sup> ed. 2002:1866-1867.

<sup>11</sup> Harris D. Introducción a las separaciones analíticas en Análisis químico cuantitativo. México. Grupo editorial Iberoamérica. 1992:604-607.

<sup>12</sup> Clarke's. Analysis of Drugs in pharmaceuticals, body fluids and Poisons. London. Chicago. Pharmaceutical Press. 3a. Edition. 2005:761-762

<sup>13</sup> Roschafer C. John, Crossley B. Kent, and Miller Kenneth. Cefaclor Pharmacokinetic Parameters: Serum Concentrations Determined by a New High-performance Liquid Chromatographic Technique. Antimicrobial agents chemotherapy, Jan.1982. p. 170-172.

<sup>14</sup>Nahata C. Milap. Determination of cefaclor by high-performance liquid chromatography. College of pharmacy, Ohio State University, 500 West 12 th Avenue, Columbus, OH 43210.1157.



<sup>15</sup>Flores-Murrieta J. Francisco, Aguilar-Cota María E., et al. Oral Pharmacokinetics of Cefaclor in Mexican Subjets. Pharmacology. Soc. 44: 71-72 (2001).

<sup>16</sup> Alvin N. Eden, Dr. Philips Fireman, Dr. Sylvan E. Otitis Media Aguda: más común y resistente, Pediatr Infect Dis J 1995; 14: 178-183.

<sup>17</sup> Estudios de Bioequivalencia, 2006,  
<http://www.normon.es/media/docs/ACF1F15.htm>.