



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR SIMULTÁNEAMENTE RIFAMPICINA Y
ETAMBUTOL EN PLASMA MEDIANTE CLAR ACOPLADO A UN
DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MASAS**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

ARACELI PÉREZ ZAVALA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **PROFESOR:** **INÉS FUENTES NORIEGA**

VOCAL: **PROFESOR:** **HELGI HELENE JUNG COOK**

SECRETARIO: **PROFESOR:** **LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE**

1ER. SUPLENTE: **PROFESOR:** **MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ**

2° SUPLENTE: **PROFESOR:** **LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFARMACÉUTICA S.A. DE C.V.

ASESOR DEL TEMA: **LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE**

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO : **OMAR EMMANUEL HERNÁNDEZ PIÑA**

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): **ARACELI PÉREZ ZAVALA**

(nombre (s) y firma (s))

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS.....	12
1. RESUMEN.	15
2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	16
3. GENERALIDADES.....	18
3.1. Micobacterias.....	18
3.1.1. Clasificación.	18
3.2. Tuberculosis.	20
3.3. Mycobacterium tuberculosis.	20
3.3.1. Aspectos bacteriológicos.....	20
3.3.2. Constituyentes del bacilo tuberculoso.	22
3.4. Patogenia.....	23
3.5. Diagnóstico.	25
3.5.1. Prueba de la tuberculina.	25
3.5.2. Diagnóstico de laboratorio.....	25
3.6. Tratamiento.....	27
3.7. Epidemiología de la tuberculosis.	27
3.7.1. La tuberculosis en el mundo.....	28
3.7.2. La tuberculosis en México.	33
3.8. Medidas de prevención.....	39
3.9. Etambutol.....	41
3.9.1. Propiedades fisicoquímicas.....	41
3.9.2. Propiedades farmacológicas.	41
3.9.3. Farmacocinética.	42
3.9.4. Indicaciones terapéuticas.....	42
3.9.5. Contraindicaciones.....	43
3.9.6. Precauciones generales.....	43
3.9.7. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.....	43
3.9.8. Reacciones adversas.	43
3.10. Rifampicina.	44

3.10.1. Propiedades fisicoquímicas.....	44
3.10.2. Propiedades farmacológicas.	45
3.10.3. Propiedades farmacocinéticas.	45
3.10.4. Indicaciones terapéuticas.	46
3.10.5. Contraindicaciones.	46
3.10.6. Precauciones generales.	46
3.10.7. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.....	47
3.10.8. Reacciones adversas.	47
3.11. Cromatografía.....	49
3.11.1. Clasificación de los métodos cromatográficos.....	49
3.11.2. Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de espectrometría MS-MS.	50
3.12. Validación de métodos analíticos.....	56
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	69
4.1. Material, equipos e instrumentos.....	69
4.1.1. Material.....	69
4.1.2. Equipos e instrumentos.	69
4.1.3. Reactivos y sustancias de referencia.	71
4.1.4. Sustancias de Referencia.....	71
4.1.5. Matriz biológica.	71
4.2. Desarrollo del método analítico.	72
4.2.1. Condiciones del detector y elección del estándar Interno.....	72
4.2.2. Condiciones cromatográficas.	72
4.2.2.1. Fase móvil.	72
4.2.2.2. Fase estacionaria.....	73
4.2.2.3. Volumen de inyección, velocidad de flujo y temperatura de la columna.....	73
4.2.3. Método de extracción.....	74
4.3. Validación del método.....	76
4.3.1. Preparación de soluciones.	76
4.3.2. Preparación de muestras de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.	79
4.3.3. Adecuabilidad del sistema.....	87
4.3.4. Selectividad del sistema.....	87
4.3.5. Selectividad a la matriz biológica.	87

4.3.6. Selectividad a fármacos de uso común.....	88
4.3.7. Selectividad del sistema (cross-talk o respuesta cruzada).....	88
4.3.8. Linealidad.....	90
4.3.9. Repetibilidad de la curva de calibración.....	91
4.3.10. Precisión del método.....	92
4.3.10.1. Repetibilidad muestras control de calidad.....	92
4.3.10.2. Reproducibilidad muestras control.....	92
4.3.11. Exactitud del método.....	93
4.3.12. Efecto matriz.....	93
4.3.13. Recobro.....	93
4.3.14. Límite de detección y límite inferior de cuantificación.....	97
4.3.15. Estabilidad.....	97
4.3.15.1. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	98
4.3.15.2. Estabilidad a temperatura ambiente (15–30 °C).....	98
4.3.15.3. Estabilidad en refrigeración (2–8 °C).....	98
4.3.15.4. Estabilidad de la muestra procesada.....	98
4.3.15.5. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 336 días.....	99
4.3.15.6. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 281 días, en presencia de isoniazida y pirazinamida a concentraciones de 8750 y 1500 ng/mL respectivamente.....	99
4.3.16. Integridad de la dilución.....	99
4.3.16.1. Concentración dentro de la curva de calibración 5000 ng/mL de rifampicina y 2000 ng/mL de etambutol (IDD).....	99
4.3.16.2. Concentración fuera de la curva de calibración 10000 ng/mL de rifampicina y 4000 ng/mL de etambutol (IDF).....	100
4.3.17. Tolerancia del método analítico.....	102
4.3.17.1. Tolerancia a plasma lipémico.....	102
4.3.17.2. Tolerancia a plasma hemolizado.....	102
4.3.17.3. Tolerancia al cambio en la temperatura de la columna cromatográfica 50 °C.....	102

4.3.17.4. Tolerancia a la presencia de isoniazida y pirazinamida.	103
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	105
5.1. Desarrollo del método analítico.	105
5.1.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno.	105
5.1.2. Condiciones cromatográficas.	106
5.1.3. Método de extracción.	106
5.2. Resultados de validación.	108
5.2.1. Adecuabilidad del sistema.	108
5.2.2. Selectividad del sistema.	111
5.2.3. Selectividad a la matriz biológica y fármacos de uso común.	111
5.2.4. Respuesta cruzada de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.). .	116
5.2.5. Linealidad del método para rifampicina.	123
5.2.6. Linealidad del método para etambutol.	126
5.2.7. Repetibilidad de la curva de calibración para rifampicina.	129
5.2.8. Repetibilidad de la curva de calibración para etambutol.	130
5.2.9. Precisión.	132
5.2.9.1. Repetibilidad de rifampicina.	132
5.2.9.2. Repetibilidad de etambutol.	134
5.2.10. Reproducibilidad y exactitud de rifampicina	136
5.2.11. Reproducibilidad y exactitud del método de etambutol.	137
5.2.12. Efecto matriz de rifampicina, etambutol y memantina.	138
5.2.13. Recobro de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.).	144
5.2.14. Límite de detección y Límite inferior de cuantificación para rifampicina.	147
5.2.15. Límite inferior de cuantificación y Límite de detección para etambutol.	149
5.2.16. Estabilidad.	151
5.2.16.1. Ciclos de congelación-descongelación para rifampicina y etambutol.	151
5.2.16.2. Estabilidad a temperatura ambiente para rifampicina y etambutol.	154
5.2.16.3. Estabilidad en refrigeración para rifampicina y etambutol.	157
5.2.16.4. Estabilidad de la muestra procesada para rifampicina y etambutol.	160

5.2.16.5. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 336 días.....	163
5.2.16.6. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 281 días, en presencia de isoniazida y pirazinamida a concentraciones de 1500 y 8750 ng/mL respectivamente.	168
5.2.17. Integridad de la dilución para rifampicina y etambutol.....	173
5.2.17.1. Concentración dentro de la curva de calibración 5000 ng/mL de rifampicina y 2000 ng/mL de etambutol (IDD).....	173
5.2.17.2. Concentración fuera de la curva de calibración 10000 ng/mL de rifampicina y 4000 ng/mL de etambuto (IDF).....	174
5.2.18. Tolerancia del método analítico.....	177
5.2.18.1. Tolerancia a plasma lipémico.	177
5.2.18.2. Tolerancia a plasma hemolizado.	178
5.2.18.3. Tolerancia al cambio en la temperatura de la columna cromatográfica 50 °C.....	181
5.2.18.4. Tolerancia a la presencia de isoniazida y pirazinamida.	183
6. CONCLUSIONES.....	187
7. BIBLIOGRAFÍA.	188

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Micobacterias de mayor importancia clínica. ^a	19
Tabla 2. Estimaciones de la carga de tuberculosis en México 2012.	34
Tabla 3. Notificaciones de casos de TB en México 2012.	34
Tabla 4. Estadística en México de pacientes con TB/VIH 2012.	36
Tabla 5. Estimaciones de la carga de TB-MDR en México 2012.	36
Tabla 6. Casos notificados de TB-MDR en México 2012.	37
Tabla 7. Tasa de éxito de tratamiento de TB en México 2011.	37
Tabla 8. Laboratorios existentes para el diagnóstico de TB en México 2012...	38
Tabla 9. Financiación del control de la TB en México.	38
Tabla 10. Clasificación de métodos cromatográficos.	50
Tabla 11. Modos de operación de un triple cuadrupolo.....	56
Tabla 12. Comparación de NOM-177-SSA-1998, FDA, EMA y ANVISA.	60
Tabla 13. Preparación de la curva de calibración en sistema.	80
Tabla 14. Preparación de las muestras control de calidad en sistema.....	81
Tabla 15. Preparación de la curva de calibración en plasma.	82
Tabla 16. Preparación de las muestras control de calidad en plasma	83
Tabla 17. Preparación de las muestras LIC en sistema para etambutol.	84
Tabla 18. Preparación de las muestras LIC en plasma para etambutol.	84
Tabla 19. Preparación de las muestras LIC en sistema para rifampicina.....	85
Tabla 20. Preparación de las muestras LIC en plasma para rifampicina.	85
Tabla 21. Preparación de las muestras control de calidad en sistema en presencia de pirazinamida e isoniazida.....	86
Tabla 22. Preparación de las muestras control de calidad en plasma en presencia de pirazinamida e isoniazida.....	86
Tabla 23. Preparación de muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro.	94
Tabla 24. Preparación muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro (concentraciones reales).	95
Tabla 25. Preparación muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro (simulación de dilución post-precipitación).....	96
Tabla 26. Preparación de muestras para evaluar integridad de la dilución en sistema con un factor de dilución de 2.	101
Tabla 27. Preparación de muestras para evaluar integridad de la dilución en plasma con un factor de dilución de 2.	101
Tabla 28. Condiciones finales de detección.	105
Tabla 29. Condiciones cromatográficas finales.	106

Tabla 30. Resultados de la adecuabilidad del sistema para las corridas de validación de rifampicina.	109
Tabla 31. Resultados de la adecuabilidad del sistema para las corridas de validación de etambutol.....	110
Tabla 32. Resultados de la linealidad del método para cuantificar rifampicina en plasma (concentración recuperada).	124
Tabla 33. Parámetros de linealidad del método para cuantificar rifampicina en plasma.....	125
Tabla 34. Resultados de la linealidad del método para cuantificar etambutol en plasma (concentración recuperada).	127
Tabla 35. Parámetros de linealidad del método para cuantificar etambutol en plasma.....	128
Tabla 36. Repetibilidad de las curvas de calibración para cuantificar rifampicina en plasma (concentración recuperada).	129
Tabla 37. Parámetros de linealidad del método (repetibilidad de las curvas de calibración para rifampicina).....	130
Tabla 38. Repetibilidad de las curvas de calibración para cuantificar etambutol en plasma (concentración recuperada).	131
Tabla 39. Parámetros de linealidad del método (repetibilidad de las curvas de calibración para etambutol).	132
Tabla 40. Repetibilidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.....	133
Tabla 41. Repetibilidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.....	135
Tabla 42. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.....	136
Tabla 43. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.....	137
Tabla 44. Evaluación del efecto matriz para rifampicina.	139
Tabla 45. Evaluación del efecto matriz para etambutol.	140
Tabla 46. Evaluación del efecto matriz para memantina (E.I.).	141
Tabla 47. Evaluación del efecto matriz relativo para rifampicina/memantina (E.I.).	142
Tabla 48. Evaluación del factor matriz normalizado para rifampicina/memantina E.I. (FMI).	142
Tabla 49. Evaluación del efecto matriz relativo para etambutol/memantina E.I. (FMI).....	143
Tabla 50. Evaluación del factor matriz normalizado para etambutol/memantina E.I. (FMI).	143
Tabla 51. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.....	145

Tabla 52. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.....	146
Tabla 53. Recobro absoluto de memantina (E.I.) en plasma.	147
Tabla 54. Evaluación del límite de detección y del límite inferior de cuantificación para rifampicina.	148
Tabla 55. Evaluación del límite de detección e inferior de cuantificación de etambutol.....	150
Tabla 56. Estabilidad de rifampicina en plasma (CICLO 4).....	152
Tabla 57. Estabilidad de etambutol en plasma (CICLO 4).	153
Tabla 58. Estabilidad de rifampicina en plasma 24 horas (temperatura ambiente 15-30°C).....	155
Tabla 59. Estabilidad de etambutol en plasma 24 horas (temperatura ambiente 15-30°C).....	156
Tabla 60. Estabilidad de rifampicina en plasma 24 horas (refrigeración 2-8°C).	158
Tabla 61. Estabilidad de etambutol en plasma 24 horas (refrigeración 2-8°C).	159
Tabla 62. Estabilidad de rifampicina en muestra procesada 31.5 horas (automuestreador a 8°C).....	161
Tabla 63. Estabilidad de etambutol en muestra procesada 12.0 horas (automuestreador a 8 °C).....	162
Tabla 64. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C durante 336 días (concentración plasmática).....	164
Tabla 65. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C durante 336 días (% de recuperación).	165
Tabla 66. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C durante 336 días (concentraciones plasmáticas).	166
Tabla 67. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C durante 336 días (% de recuperación).	167
Tabla 68. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.	169
Tabla 69. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida (% de recuperación).	170
Tabla 70. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.	171
Tabla 71. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida (% recuperación).	172
Tabla 72. Integridad de la dilución dentro del rango de cuantificación de rifampicina.	173
Tabla 73. Integridad de la dilución dentro del rango de cuantificación de etambutol.....	174

Tabla 74. Integridad de la dilución fuera del rango de cuantificación de rifampicina.	175
Tabla 75. Integridad de la dilución fuera del rango de cuantificación de etambutol.....	176
Tabla 76. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma lipémico.....	177
Tabla 77. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma lipémico.	178
Tabla 78. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma hemolizado.	179
Tabla 79. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma hemolizado.....	180
Tabla 80. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma, modificación en la temperatura de la columna.....	181
Tabla 81. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma, modificación en la temperatura de la columna.	182
Tabla 82. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en presencia de isoniazida y pirazinamida.....	183
Tabla 83. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en presencia de isoniazida y pirazinamida.....	184
Tabla 84. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.	185
Tabla 85. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida.....	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>M. tuberculosis</i> : muestra teñida con la técnica de Ziehl Neelsen.....	21
Figura 2. <i>M. tuberculosis</i> : coloración con el colorante fluorescente auramina O.	21
Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	23
Figura 4. Fotografía de rayos X, de pulmones sanos y de un caso de tuberculosis pulmonar.	25
Figura 5. Estimado de nuevos casos de tuberculosis en 2012. ⁽³⁾	29
Figura 6. Estimados de nuevos casos por regiones de la OMS, 1990-2012....	29
Figura 7. Estimado absoluto de casos de tuberculosis en millones, 1990- 2012. ⁽³⁾	30
Figura 8. Estimados de la prevalencia de TB 1990-2012 y aproximación de la prevalencia de TB para 2013-2015, para las regiones de la OMS.	31
Figura 9. Estimados de la mortalidad por TB de 1990-2012 y aproximación de la mortalidad por TB de 2013-2015, para las regiones de la OMS.....	32
Figura 10. Estimado absoluto de muertes (millones) por TB de 1990-2012. ⁽³⁾ 32	
Figura 11. Progreso global en la obtención de datos sobre resistencia a fármacos, 1994-2013. ⁽³⁾	33
Figura 12. Estimados de la mortalidad por TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾	35
Figura 13. Estimados de la prevalencia de TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾	35
Figura 14. Estimados de la incidencia de TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾	35
Figura 15. Estadística gráfica de pacientes en México con TB/VIH, 2003-2012. ⁽¹⁰⁾	36
Figura 16. Tasa de éxito en el tratamiento de TB en México, 1995-2011. ⁽¹⁰⁾ ..	37
Figura 17. Representación gráfica del financiamiento para el control de la TB en México (2006-2013). ⁽¹⁰⁾	38
Figura 18. Estructura química de Etambutol.	41
Figura 19. Estructura química de rifampicina.	44
Figura 20. Sitio de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. ⁽¹⁹⁾	48
Figura 21. Fuente de ionización por electrospray (ESI). ⁽²³⁾	52
Figura 22. Fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI). ⁽²⁴⁾	53
Figura 23. Fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI). ⁽²⁵⁾	54
Figura 24. Diagrama de la estructura de un filtro de masas cuadrupolo. ⁽²⁶⁾	55
Figura 25. Evaluación de la técnica de precipitación de proteínas, para la extracción de RIF, ETA y el posible E. I. en plasma.....	75

Figura 26. Diagrama del método de extracción para rifampicina y etambutol en plasma.....	107
Figura 27. Selectividad del método para fármacos de uso común, concomitantes, plasma lipémico y hemolizado para rifampicina, etambutol y memantina (E.I.).....	115
Figura 28. Respuesta cruzada (RC) para rifampicina, etambutol, memantina (E.I.).	122
Figura 29. Linealidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.....	125
Figura 30. Linealidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.....	128
Figura 31. Límite de Detección (LD) e Inferior de Cuantificación (LIC) para rifampicina.	149
Figura 32. Límite de Detección (LD) e Inferior de Cuantificación (LIC) para etambutol.....	151

ABREVIATURAS.

±	Más menos
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ARN	Ácido ribonucleico
C. V.	Coeficiente de variación
CC	Muestra control de calidad
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
CP	Concentración plasmática
Desv. Abs.	Desviación absoluta
DOTS	Paquete básico que sustenta la estrategia alto a la tuberculosis
E. I.	Estándar Interno
EMA	European Medicines Agency
ESI	Ionización por electrospray
ETA	Etambutol
FDA	Food & Drug Administration
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O	Agua
IDD	Integridad de la dilución dentro de la curva
IDF	Integridad de la dilución fuera de la curva
ISO	Isoniazida

IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kg	Kilogramos
L	Litros
LAM	Lipoarabinomanano
LC-MS	Cromatografía líquida por espectrometría de masas
LC-MS-MS	Cromatografía líquida por espectrometría de masas-masas
LD	Límite de detección
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
m/z	Relación masa-carga
mAGP	Ácido micólico-arabinogalactano-peptidoglucano
MDR-TB	Tuberculosis resistente a múltiples fármacos
MEM	Memantina
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRM	Multi reaction monitoring
ng	Nanogramo
nm	Nanometros
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
p/v	Relación peso/volumen
pH	Potencial de hidrógeno
PIR	Pirazinamida
PNS	Programa Nacional de Salud

ABREVIATURAS

PPD	Derivado de proteína purificada
psi	Unidad de presión (libra por pulgada cuadrada)
Q1	Cuadrapolo 1
q2	Cuadrapolo 2
Q3	Cuadrapolo 3
r	coeficiente de correlación
RC	Respuesta cruzada
RIF	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
TARV	Tratamiento anti-retro viral
TB	Tuberculosis
TB/VIH	Tuberculosis/Virus de inmunodeficiencia humana positivo
TPC	Tratamiento preventivo con co-trimazol
UT	Unidades de tuberculina
UV-Vis	Detector de espectrofotometría ultravioleta-visible
v/v	Relación volumen/volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN.

Rifampicina y etambutol, son dos de los fármacos de primera línea utilizados en la farmacoterapia de la tuberculosis, los cuales se administran de forma concomitante con isoniazida y pirazinamida.

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la cuantificación simultánea de rifampicina y etambutol, empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de espectrometría de masas-masas.

El método se validó de acuerdo a los lineamientos de la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, así como con los parámetros establecidos para LC-MS/MS en guías internacionales (FDA, ANVISA, EMA). La validación se realizó mediante la obtención de los analitos por precipitación de proteínas con una mezcla de solventes orgánicos, utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm 5 μ m, en un rango de concentración de 100-6000 ng/mL para rifampicina y 20-2250 ng/mL para etambutol.

Los parámetros determinados fueron: selectividad, respuesta cruzada, acarreamiento, linealidad, precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recobro, efecto matriz, límite inferior de cuantificación (LIC), límite de detección (LD), tolerancia del método, integridad de la dilución y estabilidad de la muestra en diferentes condiciones de almacenamiento tales como: temperatura ambiente, refrigeración, ciclos de congelación-descongelación a -70°C , largo plazo en congelación a -70°C y muestra procesada en automuestreador a 8°C .

El método analítico demostró ser confiable para la cuantificación de rifampicina y etambutol.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La tuberculosis es una de las enfermedades reconocidas desde la antigüedad, la cual alcanzó proporciones epidémicas en el mundo occidental durante los siglos XVIII y XIX, ganándose el calificativo de “peste blanca”. Esta enfermedad aún afecta grandes grupos de población, en especial en áreas marginadas y grupos donde predomina la pobreza, la desnutrición y el hacinamiento, sin embargo, todos los sectores de la sociedad se encuentran en riesgo. ⁽¹⁾

Los conocimientos actuales sobre la causa, transmisión y el tratamiento de la enfermedad, permiten que la tuberculosis se encuentre bajo control en forma paulatina en países desarrollados, sin embargo, en países en desarrollo los niveles de mortalidad y morbilidad siguen siendo preocupantes a pesar de los extensos programas nacionales e internacionales de control. ^{(1), (2)} Como resultado, la tuberculosis fue declarada por la OMS como un problema de salud pública a nivel mundial, y nuestro país no está exento de la enfermedad. ⁽³⁾ El reto de erradicar la tuberculosis, se ve afectado por la asociación de la enfermedad con el VIH y a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos. Otros factores importantes en la erradicación de la tuberculosis son: los altos costos para llevar a cabo la prevención y control de la enfermedad que deben llevar las instituciones y el que las familias y personas que la padecen puedan solventar el gasto del tratamiento. ⁽²⁾

La rifampicina y el etambutol son dos de los cuatro fármacos administrados para el tratamiento primario de la tuberculosis. Existen diversas circunstancias en las cuales se requiere monitorear las concentraciones de un fármaco o sustancia después de su administración, por ejemplo: cuando el paciente requiera un monitoreo terapéutico individual (por presentar falla renal o hepática), cuando el fármaco presenta una ventana terapéutica estrecha, en la obtención del perfil farmacocinético de un fármaco y en la aplicación de un estudio de biodisponibilidad o de un estudio de bioequivalencia. Lo anterior implica contar con una metodología analítica confiable, que cumpla con tales fines.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue:

- ✓ Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas para cuantificar simultáneamente rifampicina y etambutol en plasma.

3. GENERALIDADES.

3.1. Micobacterias.

El género *Mycobacterium* pertenece al grupo de bacilos grampositivos que manifiestan la característica principal denominada ácidorresistencia. El patógeno de mayor importancia para el ser humano es *Mycobacterium tuberculosis*. Una segunda micobacteria de importancia es *Mycobacterium leprae* (causante de la lepra). Otro número de especies menos patógenas, consideradas de manera colectiva como “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas” pueden producir enfermedades en el ser humano, por ejemplo *Mycobacterium avium-intracellulare*. Con frecuencia las micobacterias son patógenos oportunistas, infectando a pacientes con sistema inmunitario suprimido, como por ejemplo, pacientes que sufren del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o virus de inmunodeficiencia humana (SIDA/VIH). En ocasiones producen enfermedad en pacientes con sistema inmunitario normal. Existen más de 125 especies de *Mycobacterium*, las cuales incluyen muchas que son saprofitas. ^{(1), (4)}

3.1.1. Clasificación.

La clasificación de micobacterias se basa en sus características fenotípicas, entre las cuales se destacan necesidades nutricionales y de temperatura, tasas de crecimiento, pigmentación en las colonias desarrolladas bajo luz o en oscuridad, pruebas bioquímicas claves, abundancia celular de ácidos grasos libres y límites de patogenicidad en animales de experimentación. Actualmente se emplean técnicas moleculares, por ejemplo: la identificación de las secuencias de rRNA y ADN. ⁽¹⁾

A continuación se muestra una tabla con las principales características de las micobacterias de mayor importancia clínica. ⁽¹⁾

Tabla 1. Micobacterias de mayor importancia clínica.^a

Especie	Características							
	Reservorio	Virulencia para el hombre	Enfermedad causada	Transmisión de persona a persona	Tasa de crecimiento ^b	Temperatura óptima de crecimiento	Producción de pigmento ^c	Producción importante de niacina ^d
<i>M. tuberculosis</i>	Hombre	+++	Tuberculosis	Sí	L	37°C	-	+
<i>M. bovis</i>	Animales	+++	Tuberculosis	Rara	L	37°C	-	-
<i>M. kansasii</i>	Ambiental	±	Del tipo de la tuberculosis	No	L	37°C	Fotocromogéno	-
<i>M. scrofulaceum</i>	Ambiental	+	Linfadenitis	No	L	37°C	Escotocromogéno	-
<i>M. avium-intracellulare</i>	Ambiental, aves	+	Del tipo de la tuberculosis	No	L	37°C	±	-
<i>M. fortuitum</i>	Ambiental	±	Absceso local	No	R	37°C	±	-
<i>M. ulcerans</i>	Puede ser ambiental; tropical	+	Ulceración cutánea grave	No	L	30°C	-	-
<i>M. leprae</i>	Hombre	+++	Lepra	Sí	NC	NC	NC	NC

^a Existen numerosas micobacterias ambientales no patógenas que pueden contaminar las muestras humanas.

^b L= Lento (desarrollo de colonias en 10 días o más); R= Rápido (desarrollo de colonias en 7 días o más); NC= no hay crecimiento.

^c Pigmento amarillo anaranjado. Fotocromogéno: pigmento producido bajo luz. Escotocromogéno: pigmento producido en la oscuridad o bajo la luz.

^d Se emplean también otras pruebas bioquímicas diferenciales, por ejemplo: reducción de nitrato, producción de catalasa, hidrólisis con Twen 80.

3.2. Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una infección sistémica que suele afectar a los pulmones y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), la bacteria fue aislada, descrita y responsabilizada de la tuberculosis en 1882 por el famoso microbiólogo alemán Robert Koch. La tuberculosis se manifiesta por pruebas de una reacción inmunitaria en la mayoría de los individuos expuestos, en algunas personas la enfermedad progresa o se reactiva después de un periodo asintomático el cual puede ser de años. La reactivación más frecuente es una neumonía crónica con fiebre, tos, esputo sanguinolento y pérdida de peso. Puede ocurrir diseminación hacia otros sitios además del pulmón, y es devastadora cuando llega al sistema nervioso central. ^{(1), (5)}

3.3. Mycobacterium tuberculosis.

3.3.1. Aspectos bacteriológicos.

Los bacilos tuberculosos son finas estructuras rectas cilíndricas que miden 0.4 x 3 µm aproximadamente y son gram positivos. En medios artificiales se les identifica por ser formas cocoides y filamentosas. Para la tinción e identificación de *M.tuberculosis* se emplea la técnica de Ziehl- Neelsen, debido a la propiedad de acidorresistencia que las caracteriza. En extensiones de esputo o cortes de tejido se demuestra la presencia de micobacterias por la fluorescencia amarillo-naranja después de aplicar los colorantes fluorocrómicos (auramina, rodamina). ^{(1), (4)}

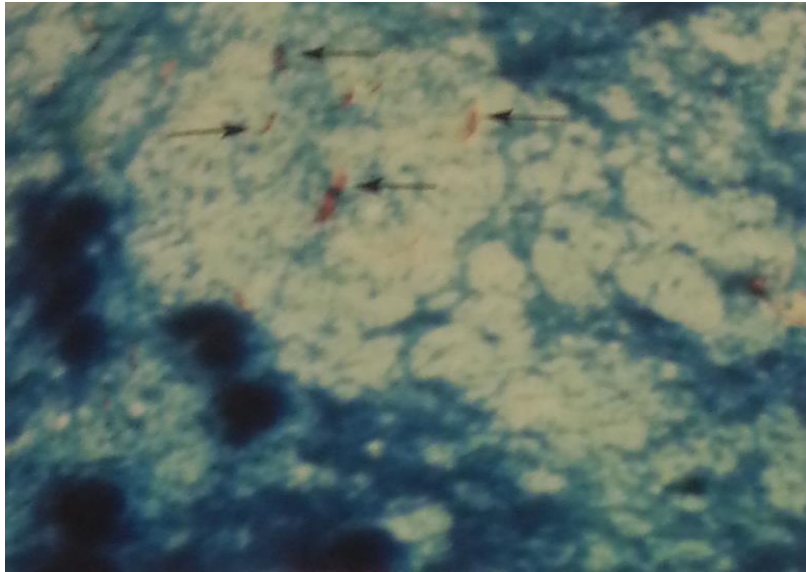


Figura 1. *M. tuberculosis*: muestra teñida con la técnica de Ziehl Neelsen.

Se presenta una muestra de esputo teñida con la técnica de Ziehl-Neelsen, donde la micobacteria se observa de color rojo, destacando del fondo azul.⁽⁴⁾



Figura 2. *M. tuberculosis*: coloración con el colorante fluorescente auramina O.

Se utilizó el colorante fluorescente auramina O para teñir una muestra de esputo, donde se destacan dos micobacterias fluorescentes.⁽⁴⁾

3.3.2. Constituyentes del bacilo tuberculoso.

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja, la cual está constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática.

La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos (por ejemplo, resistencia a la mayor parte de desinfectantes, ácidos e incluso a la desecación). Esta tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Sus principales componentes son el ácido micólico y glicolípidos; los glicolípidos en conjunto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria.

La pared celular de las micobacterias se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido en lípidos (entre 50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico, haciéndola resistente a la hidrólisis enzimática. Su principal constituyente es el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP). Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos, tienen de 70 a 80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura, característica que actúa como una barrera efectiva frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales.

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, sin embargo, en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, formando moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis. ⁽⁶⁾

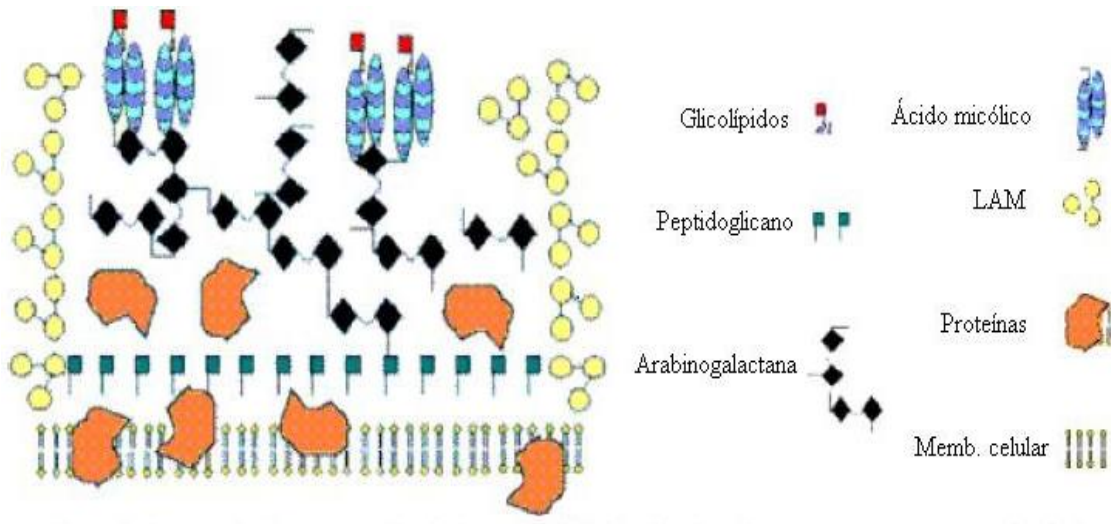


Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.

La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentran en asociación con PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas.⁽⁶⁾

3.4. Patogenia.

La interacción entre *M. tuberculosis* y las células del hospedero es compleja, siendo determinada en parte por la virulencia de la cepa, pero también por la resistencia específica y no específica del hospedero. La inmunidad mediada por células tiene importancia particular en el desarrollo de los síntomas presentados de la enfermedad. Se conocen dos tipos de infecciones tuberculosas: *primaria* y *postprimaria* (o *reinfección*).⁽⁵⁾

La infección primaria es causada por la inhalación de pequeñas gotitas de líquido contaminadas con las bacterias viables y provenientes de un individuo con una infección pulmonar activa. También se puede deber a la inhalación de partículas de polvo contaminadas por esputos de individuos tuberculosos. Una vez inhalada, la bacteria se ubica principalmente en los alveolos de los pulmones donde se multiplica. Una reacción de hipersensibilización retardada resulta de la formación de agregados de macrófagos activados, llamados *tubérculos*, los cuales son característicos de la tuberculosis. Las micobacterias son capaces de sobrevivir y multiplicarse en cierta medida en el interior de los

macrófagos. Esta infección primaria permanece localizada y sin manifestaciones, pero hipersensibiliza al individuo frente a la bacteria o a sus productos. La prueba diagnóstica llamada **test de la tuberculina**, es usada para medir dicha hipersensibilidad, un individuo que presenta reacción a la prueba de tuberculina se le considera *tuberculina positivo*; muchos adultos resultan positivos a esta prueba como resultado de una infección previa no manifestada, pero no significa que se encuentren enfermos, si no que el individuo ha estado expuesto al microorganismo en el pasado y ha generado una respuesta inmunitaria mediada por células. ^{(1), (5)}

La inmunidad generada es protectora y dura de por vida para la mayoría de los individuos. Ciertos pacientes tuberculina positivos desarrollan tuberculosis postprimaria debido a una reinfección proveniente de fuentes exógenas o por reactivación de bacterias que han permanecido quiescentes dentro de los macrófagos pulmonares. Factores como envejecimiento, malnutrición, estrés, agitación y desordenes hormonales juegan un papel importante en la predisposición de los individuos a la reinfección, dichos factores disminuyen la efectividad del sistema inmunitario que ocasionan la reactivación de infecciones latentes. ⁽⁵⁾

Las infecciones pulmonares secundarias a menudo se vuelven infecciones crónicas que destruyen los tejidos pulmonares, seguidas de una cicatrización y calcificación parcial en los sitios de infección. Por lo tanto, la tuberculosis postprimaria crónica frecuentemente resulta en un esparcimiento gradual de las lesiones a lo largo de los pulmones. ⁽⁵⁾



Figura 4. Fotografía de rayos X, de pulmones sanos y de un caso de tuberculosis pulmonar.

- (a) Radiografía torácica normal. Las líneas blancas poco intensas son arterias y otros vasos sanguíneos. El corazón es visible como un bulto blanco en el cuadrante inferior derecho. (b) Un caso avanzado de tuberculosis pulmonar, los parches blancos (flechas) indican áreas enfermas. Estos parches o tubérculos, pueden contener bacterias de *M. tuberculosis* vivas. Los tejidos y la función pulmonar son permanentemente destruidos por estas lesiones. ⁽⁵⁾

3.5. Diagnóstico.

3.5.1. Prueba de la tuberculina.

La prueba de la tuberculina mide la hipersensibilidad retardada causada por la tubérculo-proteína presente en la bacteria causante de la tuberculosis. El PPD se estandariza contra un preparado internacional de referencia, y su actividad se expresa en unidades de tuberculina (UT), en la mayor parte de las pruebas cutáneas iniciales se emplean 5 UT (potencia intermedia).

La prueba consiste en una inyección intradérmica que se interpreta 48 a 72 horas después. La reacción se caracteriza por la aparición de un eritema y el endurecimiento en la zona, si el diámetro de este es de 10 mm o más, se concluye que es una reacción positiva, aunque las zonas más pequeñas de endurecimiento y eritema indican un grado menor de sensibilización a las proteínas micobacterianas. La falta de endurecimiento indica reacción negativa. La prueba PPD positiva indica que el individuo resultó infectado alguna vez por *M. tuberculosis*. ^{(1), (5)}

3.5.2. Diagnóstico de laboratorio.

Si se encuentran en suficiente cantidad, las micobacterias de *M. tuberculosis* (bacilos acidorresistentes) se pueden identificar al microscopio en frotis

directo de muestras clínicas o en frotis concentrado proveniente de cultivo. Los frotis se tiñen por la técnica de Zhiel- Neelsen o con una de sus modificaciones, que incluye el método de coloración fluorescente. ⁽¹⁾

La confirmación del diagnóstico de tuberculosis se realiza mediante cultivo y pruebas bioquímicas, siendo necesario el aislar al microorganismo para su identificación y para efectuar las pruebas de susceptibilidad a fármacos, sin embargo, el proceso suele requerir varias semanas. Se pueden utilizar técnicas cromatográficas en la identificación de *M. tuberculosis* como: cromatografía en capa fina, cromatografía de gas de alta resolución y cromatografía líquida de alta presión, identificando los ácidos grasos contenidos en las colonias de micobacterias o mediante prueba de homología entre sondas genéticas de ADN micobacteriano y ARN ribosómico marcados extraídos de la cepa bajo prueba. En la actualidad se dispone en el comercio de sondas específicas para identificar a *M.tuberculosis*. ⁽¹⁾

Las pruebas de susceptibilidad son importantes, ya que tener una cepa resistente implica mayor gravedad de la enfermedad, considerando cambios en el tratamiento, tanto en el número y tipo de fármacos, como en el período de administración. Presentar una cepa resistente disminuye la garantía de curación y aumenta la posibilidad de efectos adversos y de secuelas. La OMS denomino 2 tipos de resistencia: resistencia en casos nuevos y resistencia en casos previamente tratados. La resistencia en casos nuevos sería debida a mutaciones espontáneas en el mismo paciente o al contagio a partir de cepas resistentes, la resistencia en casos previamente tratados es debida a deficiencias en el control de la enfermedad en un área determinada, como por ejemplo el abandono del tratamiento. ^{(1), (7)}

Para los casos recién diagnosticados, las pruebas de susceptibilidad se realizan con los fármacos de primera línea. Cuando se observan en los frotis directos números suficientes de bacilos acidorresistentes, se puede sembrar de manera directa en un medio conteniendo los antimicrobianos para las pruebas de susceptibilidad, con lo que se ahorra tiempo; si los números son escasos, se debe esperar al aislamiento primario para la realización de las pruebas. Si se encuentra resistencia a los fármacos de primera línea, se debe determinar la

sensibilidad a los fármacos de segunda línea. Los fármacos que se estudian en la mayoría de los casos son etionamida, kanamicina, cicloserina, capreomicina.⁽⁷⁾

3.6. Tratamiento.

El tratamiento de infecciones por micobacterias se ha vuelto un problema cada vez más importante y difícil, esto debido a la aparición de microorganismos resistentes a múltiples fármacos y por la pandemia del SIDA, que se ha acompañado de un incremento extraordinario en la frecuencia de tuberculosis y otras infecciones causadas por el complejo *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium leprae*.⁽⁸⁾

Los medicamentos para tratar la tuberculosis se dividen en dos grandes categorías. Los compuestos de “primera elección o línea”, que combinan el máximo nivel de eficacia con un grado aceptable de toxicidad; donde se incluyen isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, siendo la mayor parte de los pacientes con tuberculosis tratados con ellos. En zonas donde ha surgido resistencia primaria a isoniazida, esta se sigue incluyendo dentro del tratamiento hasta que se obtienen los estudios de sensibilidad (antibiogramas). Sin embargo, por la aparición de resistencia microbiana o por factores propios del paciente como infección por VIH o SIDA, a veces se necesita recurrir a fármacos de “segunda elección o línea”, iniciando la terapéutica con cinco o seis productos como ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina.^{(8), (9)}

3.7. Epidemiología de la tuberculosis.

La tuberculosis fue la enfermedad infecciosa más relevante, debido a la tasa de mortalidad tan alta que presentó en los siglos XVIII y XIX, actualmente la tasa de mortalidad es menor, sin embargo, sigue siendo un problema de salud pública.⁽¹⁾

3.7.1. La tuberculosis en el mundo.

A nivel mundial se estima que una tercera parte de la población del mundo está infectada por *M. tuberculosis* y aproximadamente 30 millones de personas experimentan la enfermedad activa.⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la tuberculosis como una emergencia mundial de salud pública en 1993 y hasta hoy en día es considerada una epidemia. A continuación se presentan las estadísticas presentadas para casos de incidencia, prevalencia, mortalidad y casos de resistencia, que la OMS presentó en su último informe del 2012.⁽³⁾

a) Incidencia.

En 2012 se estimaron casi 8.6 millones de casos nuevos de tuberculosis (rango de 8.3 a 9.0 millones), equivalente a 122 casos por cada 100 000 habitantes. El mayor número de casos estimados en 2012 ocurrió en Asia (58%) y África (27%), en menor proporción ocurrió en la Región oriental del Mediterráneo (8%), la Región Europea (4%) y la Región de América (3%). De los 8.6 millones de casos, un estimado de 0.5 millones fueron niños y 2.9 millones (en un rango de 2.7-3.1 millones) fueron mujeres.

Los cinco países con el mayor número de casos en 2012 fueron India (2.0-2.4 millones), China (0.9-1.1 millones), Sudáfrica (0.4-0.6 millones), Indonesia 0.4-0.5 millones) y Pakistán (0.3-0.5 millones). Siendo que India y China por si solos presentan el 26% y 12 % de los casos globales respectivamente.

De los 8.6 millones de casos nuevos en 2012, entre 1.0-1.2 millones (12-14%) fueron personas coinfectadas con VIH o SIDA, presentándose en la región africana la mayor proporción de casos de TB/VIH (aproximadamente un 37%).

Globalmente, el radio de incidencia fue relativamente estable desde 1990 a 2001, y después comenzó a caer. Entre 2011 y 2012 la tasa de disminución fue del 2%, y si esta tendencia se mantiene, el objetivo que la OMS fijo al año 2015 se alcanzará.⁽³⁾

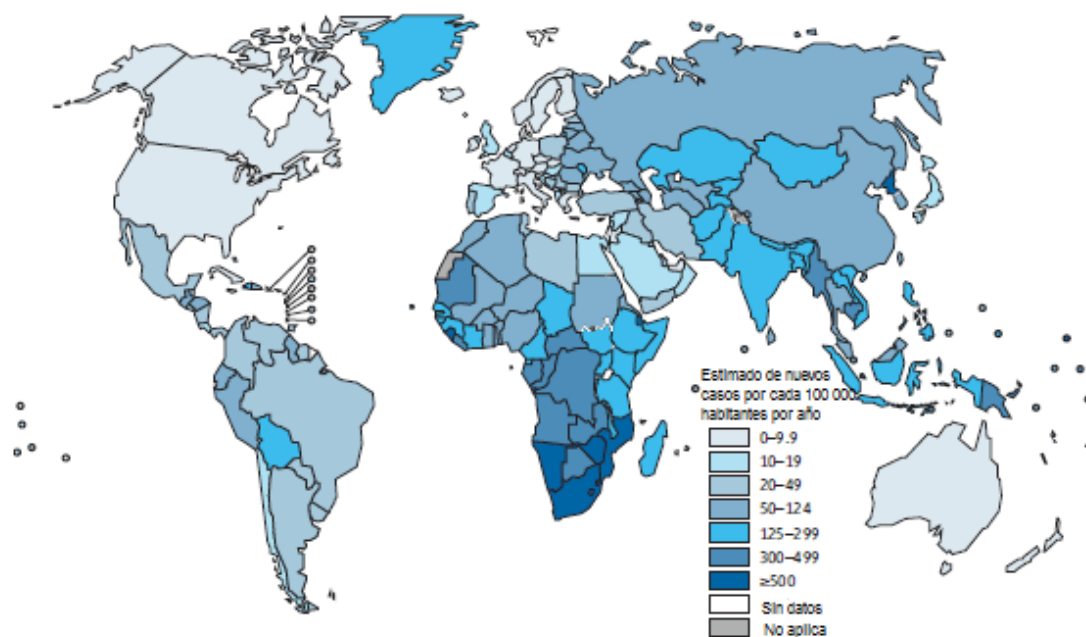


Figura 5. Estimado de nuevos casos de tuberculosis en 2012. ⁽³⁾

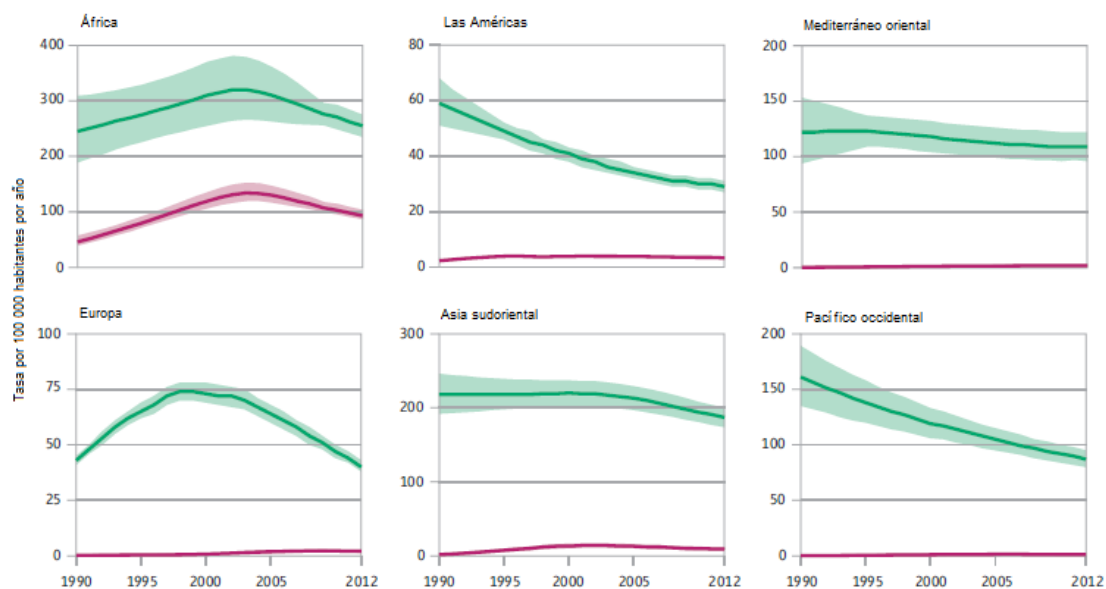


Figura 6. Estimados de nuevos casos por regiones de la OMS, 1990-2012.

En cada región se muestra el estimado de nuevos casos de TB (verde) y el estimado de nuevos casos de TB-VIH positivo (rojo). ⁽³⁾

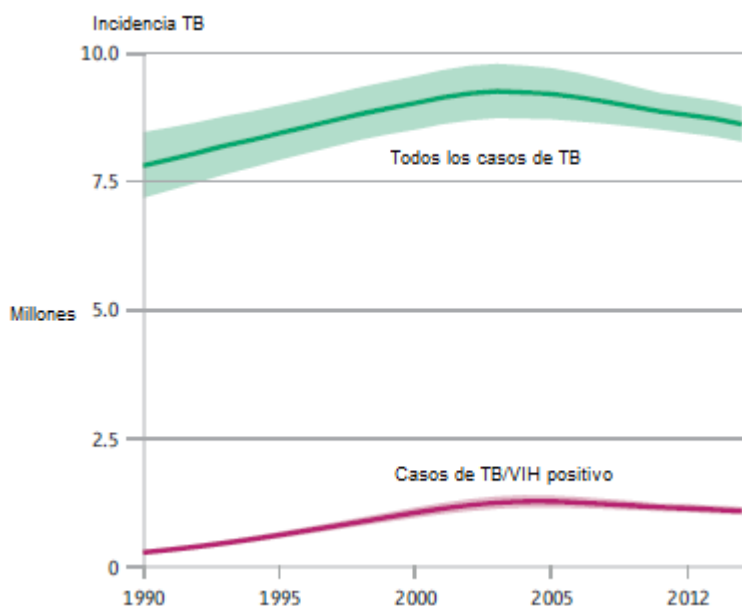


Figura 7. Estimado absoluto de casos de tuberculosis en millones, 1990-2012. ⁽³⁾

b) Prevalencia.

La prevalencia de la tuberculosis, puede ser medida directamente en encuestas basadas en la población de un país. Se calcula un estimado de 12 millones de casos prevalentes (rango de 11 a 13 millones) de tuberculosis en 2012, equivalente a 169 casos por cada 100 000 habitantes. La tasa de prevalencia se ha reducido en un 37% a nivel mundial desde 1990. Las tasas de prevalencia están disminuyendo en las 6 regiones de la OMS. En la Región de las Américas el nivel de prevalencia de tuberculosis disminuyó a la mitad en el año 2004, esto con respecto a la presentada en el año 1990, mucho antes del año 2015, y la Región del Pacífico Occidental se encuentra cerca de hacerlo. Lograr el objetivo de reducción del 50% en 2015 parece factible en las regiones de Asia Sudoriental y Europa, pero no en las Regiones de África y del Mediterráneo Oriental. ⁽³⁾

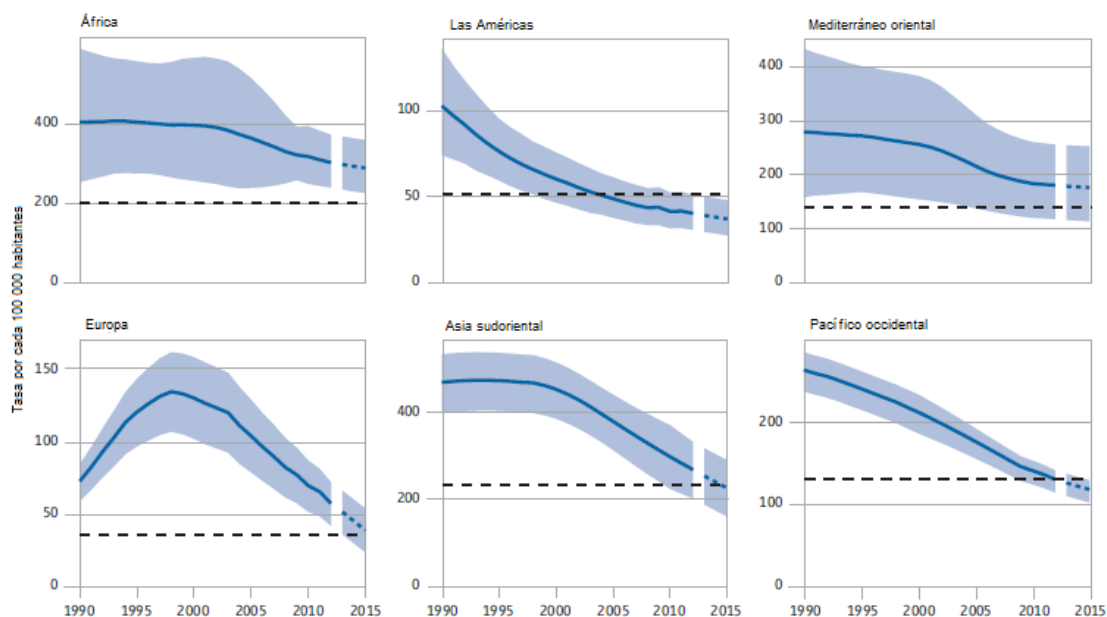


Figura 8. Estimados de la prevalencia de TB 1990-2012 y aproximación de la prevalencia de TB para 2013-2015, para las regiones de la OMS.

En cada región se muestra la prevalencia de TB de 1990-2012 (azul). La línea horizontal punteada representa la reducción al 50% de la prevalencia de casos de TB prevista para 2015 en comparación a 1990. ⁽³⁾

c) Mortalidad.

El estimado que realizó la OMS, de número de muertes por tuberculosis en 2012 fue de 940 000 muertes de personas no coinfectadas con VIH y 320 000 muertes por TB/VIH. Considerando los datos anteriores, se tiene un estimado aproximado de muertes por tuberculosis de 1.3 millones de personas en 2012, de las cuales 410 000 son mujeres y 74 000 son de niños ⁽³⁾

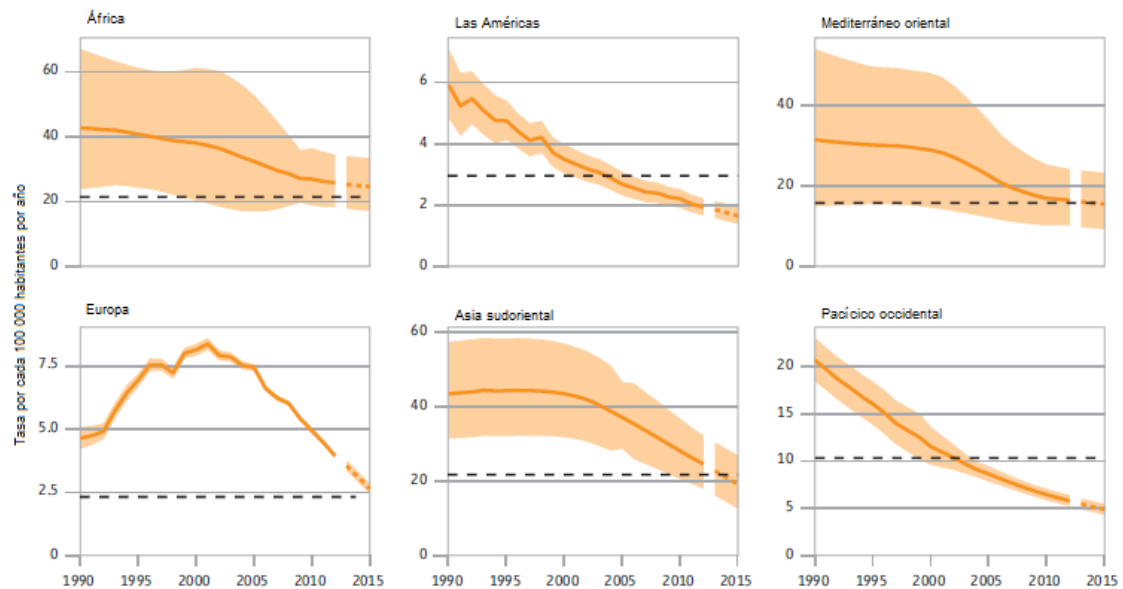


Figura 9. Estimados de la mortalidad por TB de 1990-2012 y aproximación de la mortalidad por TB de 2013-2015, para las regiones de la OMS.

En cada región se muestra la mortalidad estimada por TB de 1990-2012 (naranja). La línea horizontal punteada, representa la reducción de mortalidad por TB a un 50% prevista para el 2015 en comparación a 1990. ⁽³⁾

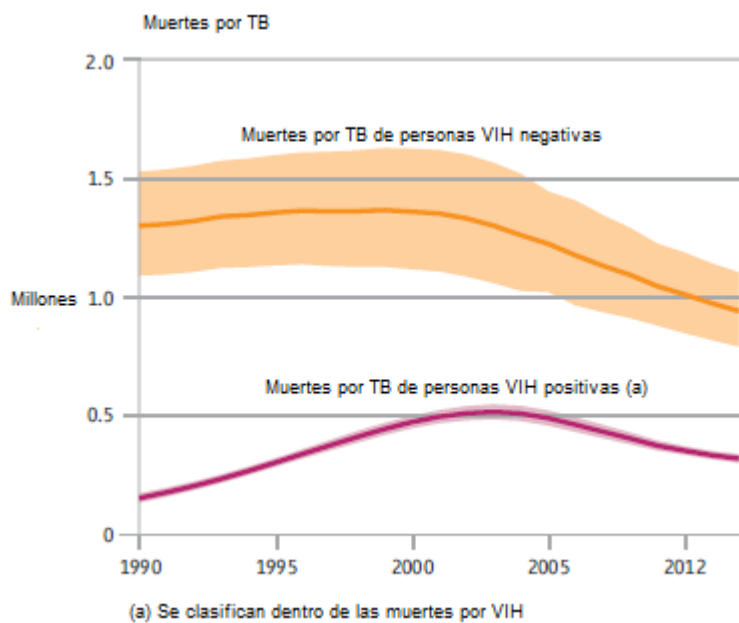


Figura 10. Estimado absoluto de muertes (millones) por TB de 1990-2012.

(3)

d) Tuberculosis resistente a múltiples fármacos.

La OMS definió como cepas de *M. tuberculosis* resistentes, a aquellas resistentes a isoniazida y a rifampicina, a cualquier fluoroquinolona y cuando menos a tres medicamentos inyectables de segunda línea. En los últimos reportes de la OMS (2012), se estimaron 450 000 casos de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (TB-MDR), en un rango de 300 000- 600 000 entre los 12 millones de casos prevalentes a nivel mundial, lo cual representa aproximadamente el 3.6% de casos nuevos. ⁽³⁾

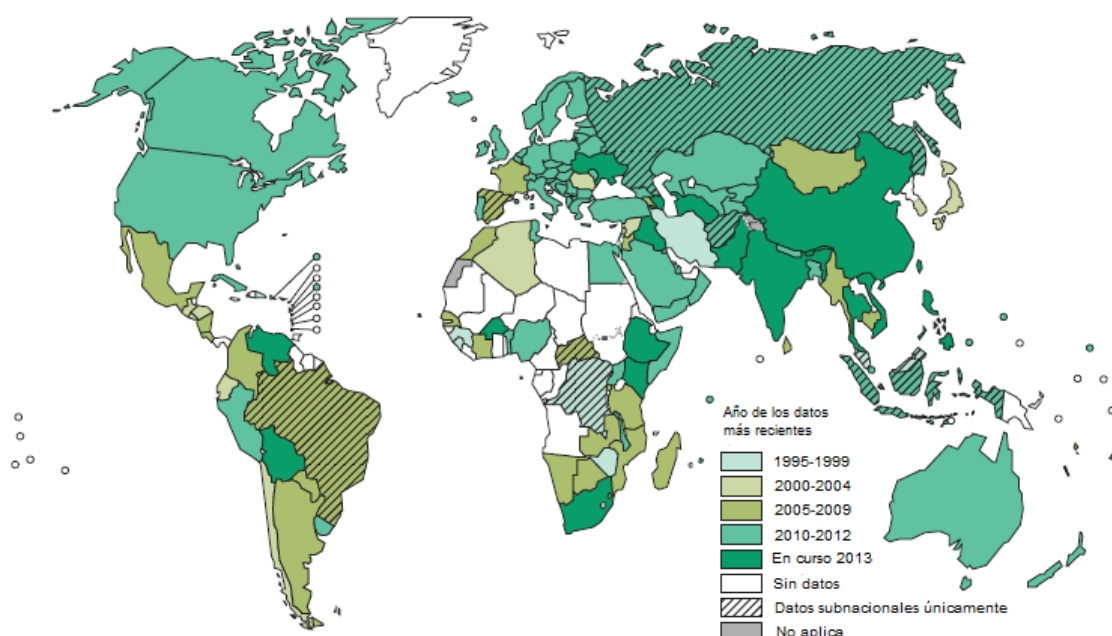


Figura 11. Progreso global en la obtención de datos sobre resistencia a fármacos, 1994-2013. ⁽³⁾

3.7.2. La tuberculosis en México.

De acuerdo a los reportes generados por la OMS, en México, en el año 2012, se diagnosticaron alrededor de 19 697 de casos nuevos de tuberculosis, y casi 2 mil defunciones. En las Tabla 2, Tabla 3 y Figura 12, Figura 13 y Figura 14 se muestran las estimaciones y estadísticas correspondientes a la incidencia, prevalencia y mortalidad en México. ⁽¹⁰⁾

Tabla 2. Estimaciones de la carga de tuberculosis en México 2012.

Estimaciones de la carga de TB 2012	Número (miles)	Tasa por 100 000 habitantes
Mortalidad (no incluye TB/VIH)	2.2 (2.1–2.3)	1.8 (1.7–1.9)
Mortalidad (VIH/TB únicamente)	0.31 (0.25-0.39)	0.26 (0.21-0.32)
Prevalencia (incluye TB/VIH)	40 (19–69)	33 (16–57)
Incidencia (incluye TB/VIH)	27 (23–32)	23 (19–26)
Incidencia (TB/VIH únicamente)	1.6 (1.4–1.8)	1.3 (1.1–1.5)
Detección de casos, todas las formas (%)	75 (64–87)	-

Tabla 3. Notificaciones de casos de TB en México 2012.

Notificaciones de casos de TB 2012					
Casos nuevos		(%)	Casos de retratamiento		(%)
Baciloscopia positiva	13 038	66	Recaídas	773	47
Baciloscopia negativa	757	4	Tratamiento tras fracaso	116	7
Baciloscopia desconocida/ no efectuada	1924	10	Tratamiento tras abandono	272	16
Extrapulmonares	3 839	19	Otros	490	30
Otros	139	<1			
Total casos nuevos	19 697	-	Total retratamientos	1 651	
Otros (antecedentes desconocidos)			0		
Total casos nuevos y recaídas	20 470		Total casos notificados	21 348	

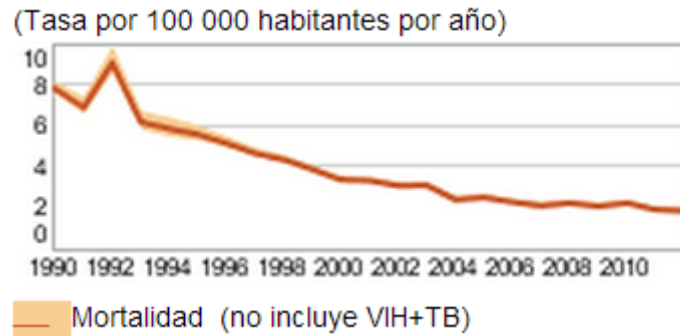


Figura 12. Estimados de la mortalidad por TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾

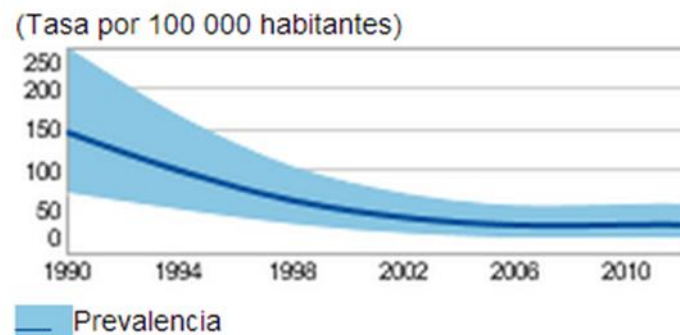


Figura 13. Estimados de la prevalencia de TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾

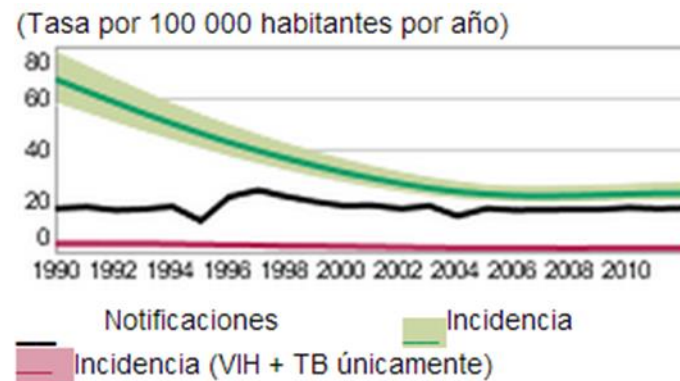


Figura 14. Estimados de la incidencia de TB en México, 1990-2012. ⁽¹⁰⁾

De la misma manera que en otros países, el VIH/SIDA, la diabetes, la desnutrición y las adicciones agravan el panorama epidemiológico de la tuberculosis en México. Sin embargo se observa un mayor impacto en los pacientes con VIH, a continuación se muestran las estadísticas correspondientes. ^{(2), (10)}

Tabla 4. Estadística en México de pacientes con TB/VIH 2012.

TB/VIH 2012	Número	(%)
Pacientes de TB con estatus de VIH conocido	15 005	70
Pacientes TB/VIH	1 233	8
Pacientes TB/VIH en tratamiento preventivo con co-trimoxazol	863	70
Pacientes TB/VIH que reciben TARV	298	24

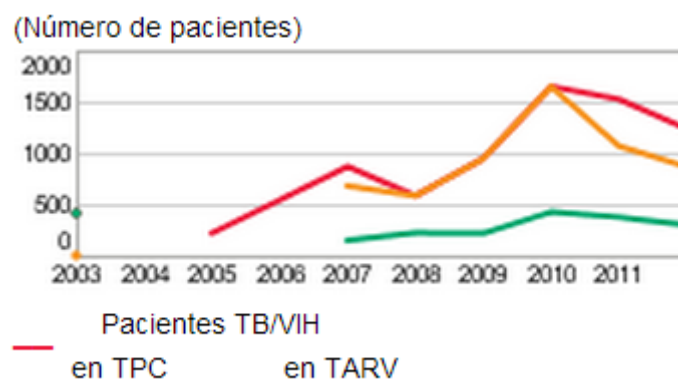


Figura 15. Estadística gráfica de pacientes en México con TB/VIH, 2003-2012. ⁽¹⁰⁾

En México la tuberculosis resistente a múltiples fármacos representa una mínima proporción del total de pacientes, siendo en el 2012 del 2.4% del total de casos nuevos presentados en el mismo año, no deja de ser un problema de salud permanente, ya que se deben tener en cuenta los múltiples factores que la condicionan y al problema terapéutico que representa. En las siguientes tablas se muestran las estadísticas correspondientes a TB-MDR en México. ⁽⁹⁾, ⁽¹⁰⁾

Tabla 5. Estimaciones de la carga de TB-MDR en México 2012.

Estimaciones de la carga de TB-MDR 2012*	Nuevos	Retratamiento
% de los casos de TB con TB-MDR	2.4 (2.1–2.8)	6.3 (5.1–7.8)
Casos de TB-MDR entre los casos notificados de TB pulmonar	380 (330–440)	100 (84–130)

Tabla 6. Casos notificados de TB-MDR en México 2012.

Casos notificados de TB-MDR 2012	Nuevos	Retratamiento	Total
Casos con pruebas para TB-MDR	13 (<1%)	148 (9%)	161
Casos de TB-MDR confirmados por laboratorio	5	136	114
Pacientes que iniciaron tratamiento para TB-MDR	-	-	115

El tratamiento de un paciente de tuberculosis debe ser supervisado para garantizar la curación y prevenir la resistencia a los fármacos antituberculosos. En la Tabla 7 se muestra la tasa de éxito en el tratamiento de tuberculosis en México en 2011, así mismo en la fFigura 16 se muestra la estadística de tasa de éxito en el tratamiento de tuberculosis en los últimos años en el país. ^{(9), (10)}

Tabla 7. Tasa de éxito de tratamiento de TB en México 2011.

Tasa de éxito de tratamiento 2011	(%)
Casos nuevos baciloscopia positiva y/o cultivo positivo	86
Casos nuevos baciloscopia negativa/extrapulmonar	72
Retratamiento	61
Se utiliza rifampicina para pacientes nuevos durante todo el tratamiento	Sí

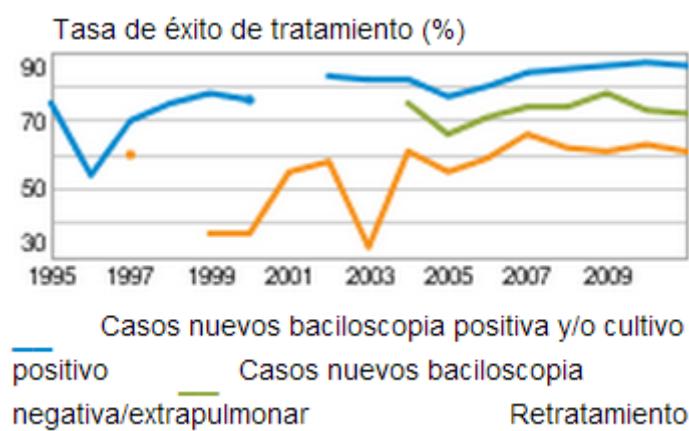


Figura 16. Tasa de éxito en el tratamiento de TB en México, 1995-2011. ⁽¹⁰⁾

En México, se cuenta con los recursos para la detección, prevención y tratamiento oportuno en las áreas de mayor riesgo. En la Tabla 8, Tabla 9 y Figura 17 se presentan los datos correspondientes a los recursos existentes en el país, para cumplir con los puntos anteriormente mencionados. ^{(9), (10)}

Tabla 8. Laboratorios existentes para el diagnóstico de TB en México 2012.

Laboratorios	2012
Baciloscopia (por 100 000 habitantes)	1.0
Cultivo (por 5 millones de habitantes)	2.7
Pruebas de sensibilidad a fármacos (por 5 millones de habitantes)	0.6
¿Están disponibles las pruebas de sensibilidad a fármacos de segunda línea?	Sí, dentro y fuera del país

Tabla 9. Financiación del control de la TB en México.

Financiación del control de la tuberculosis	2013
Presupuesto total (Millones de dólares americanos)	20
% Financiamiento interno	100%
% Financiamiento externo	0%
% Déficit	0%



Figura 17. Representación gráfica del financiamiento para el control de la TB en México (2006-2013). ⁽¹⁰⁾

3.8. Medidas de prevención.

México forma parte de los países que conforman la Región de las Américas, la cual es una de las regiones perteneciente a la OMS y participa directamente en el programa: Alto a la Tuberculosis, el cual está dirigido a disminuir la frecuencia de la tuberculosis mediante medidas de orden público y privado en los ámbitos nacional y local. Por ejemplo:

- a) Impulsar la ampliación y el mejoramiento de la estrategia DOTS de gran calidad, que incluye cinco puntos, a saber:
 - i. Lograr el apoyo político, con una financiación suficiente y perdurable.
 - ii. Efectuar la detección y el diagnóstico tempranos con ayuda de medios bacteriológicos con garantía de calidad.
 - iii. Proporcionar tratamiento estandarizado con supervisión y apoyo del paciente.
 - iv. Mantener un suministro constante de medicamentos y gestionarlos correctamente.
 - v. Seguir de cerca y evaluar el desempeño y los efectos logrados.
- b) Ocuparse de la infección mixta por el VIH y el bacilo de la tuberculosis, y atender las necesidades de los grupos pobres y vulnerables.
- c) Contribuir a fortalecer los sistemas de salud que se basan en la atención primaria de salud.
- d) Involucrar a todos los prestadores de servicios asistenciales.
- e) Procurar que los enfermos tuberculosos y las comunidades adquieran de decisión mediante las alianzas.
- f) Propiciar y promover las investigaciones. ⁽¹¹⁾

En México, el Programa Nacional de Salud (PNS), se basa en el principio de que la salud es condición indispensable para alcanzar la auténtica igualdad de

oportunidades. Asimismo, se constituye como la guía para construir un sistema de salud que propicie la protección financiera, el bienestar social, la estabilidad política y la seguridad integral de la población. En el marco del PNS, la tuberculosis se considera un problema de salud pública del país, que requiere atención prioritaria.

El 26 de enero de 1995 se publicó en el Diario Oficial de la Federación, la NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. En el mismo año se llevó a cabo la evaluación anual conjunta del Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis con participación del Gobierno de México y de la OPS/OMS. Como resultado, se recomendó la instrumentación de la Estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) para mejorar las tasas de curación, reducir la morbilidad, la mortalidad y la transmisión de la enfermedad.

La estrategia TAES requiere de la participación de las distintas instituciones del sector salud y de la sociedad, de garantizar todos los insumos necesarios para el diagnóstico, tratamiento, de la existencia de laboratorios para la realización de dichas actividades y de un sistema de información.⁽¹²⁾

En la NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis, el principal punto a considerar como medida de prevención es la “promoción de la salud”, la cual se realiza bajo los siguientes criterios:

- a) Educación para la salud.
- b) Participación social.
- c) Comunicación educativa.

La vacunación de la población mexicana, es otra medida de prevención, siendo llevada a cabo bajo los lineamientos de la NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.⁽⁹⁾

3.9. Etambutol.

3.9.1. Propiedades fisicoquímicas.

- ✓ Estructura química:

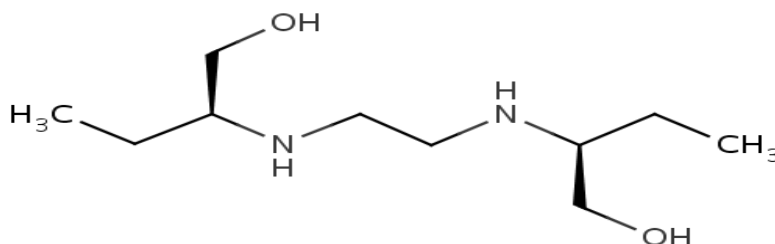


Figura 18. Estructura química de Etambutol.

- ✓ Nombre IUPAC:
(2S)-2-[(2-[[[(2S)-1-hidroxibutan-2-il]amino]etil]amino]butan-1-ol
- ✓ Número CAS: 74-55-5
- ✓ Formula condensada: C₁₀H₂₄N₂O₂
- ✓ Peso Molecular: 204.31 g/mol
- ✓ pka: 15.42
- ✓ Solubilidad: soluble en cloroformo, cloruro de metileno, menos soluble en benceno y escasamente soluble en agua.
- ✓ Punto de fusión: 87.5- 88.8°C.
- ✓ Forma y color: Polvo cristalino de color blanco.
- ✓ Máximo UV: 265 nm.
- ✓ Estabilidad y manejo: Estable a la luz y calor, pero es higroscópico cuando es expuesto a humedades relativas altas. ^{(13), (14)}

3.9.2. Propiedades farmacológicas.

Agente antituberculoso, que inhibe la transferencia del ácido micólico dentro de la pared celular del bacilo tuberculoso, puede también inhibir la síntesis de

espermidina en la micobacteria, ver Figura 20. Su acción es bactericida, puede penetrar la membrana celular humana, ejerciendo un efecto letal. Los ácidos micólicos son constituyentes esenciales y específicos para las micobacterias, de ahí que etambutol carezca de efectos sobre otros microorganismos. Sólo es activo sobre células en fase reproductiva y no en formas latentes. Se utiliza en combinación con isoniazida, pirazinamida, rifampicina y/o estreptomina en el tratamiento de la tuberculosis cuando se sospecha cierto grado de resistencia a isoniazida.

3.9.3. Farmacocinética.

- ✓ *Absorción.*- La biodisponibilidad oral es del 75- 80 %, alcanzando los niveles plasmáticos máximos ($2.4 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ para una dosis de 800 mg) al cabo de 3.5 horas. La absorción no se ve afectada por la ingesta conjunta de alimentos.
- ✓ *Distribución.*- Es ampliamente distribuido por el organismo, especialmente en pulmones, saliva y riñones, siendo concentrado en los eritrocitos. Difunde a través de la placenta y es excretado con la leche materna en cantidades apreciables, pero difunde muy poco al líquido cefalorraquídeo en ausencia de inflamación meníngea. Se une en un 10% a las proteínas plasmáticas. El volumen de distribución es de unos 20 L.
- ✓ *Metabolismo.*- Es parcialmente metabolizado en el hígado, originando hasta un 15% de metabolitos inactivos.
- ✓ *Eliminación.*- A las 24 horas de la administración el 50% se excreta con la orina en forma inalterada y el 8-15% metabolizado. Del 20 al 25% se excreta con las heces. Su tiempo de vida media de eliminación es de 3.5 horas (hasta 17 horas en pacientes con insuficiencia renal grave), puede ser eliminado por diálisis peritoneal, y en menor cantidad por hemodiálisis.

3.9.4. Indicaciones terapéuticas.

Tratamiento de la tuberculosis asociado a otros antituberculosos, en todas sus localizaciones, pulmonar o extrapulmonar.

3.9.5. Contraindicaciones.

Hipersensibilidad al etambutol, retinopatía diabética y neuritis óptica.

3.9.6. Precauciones generales.

En pacientes con insuficiencia renal se puede producir acumulación, por lo que la dosis de etambutol se debe ajustar de acuerdo al aclaramiento de creatinina.

En alteraciones oculares como cataratas, retinopatía diabética o neuropatía óptica, el etambutol puede dar lugar a alteraciones visuales.

En pacientes con gota, hiperuricemia, pueden aumentar las concentraciones de ácido úrico, pudiendo precipitar un ataque de artritis gotosa, si esta apareciera, el tratamiento deberá interrumpirse.

3.9.7. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.

No se han registrado efectos adversos en el feto con etambutol. La asociación etambutol - isoniazida se considera de elección en el tratamiento de la tuberculosis en mujeres embarazadas.

La Academia Americana de pediatría considera el uso de etambutol compatible con la lactancia, aunque se recomienda tener precaución.

3.9.8. Reacciones adversas.

El paciente puede experimentar confusión, desorientación, alucinaciones, vértigo, malestar y alteraciones visuales (visión borrosa, ceguera de color rojo-verde, pérdida de visión) que puedan afectar la capacidad del paciente para conducir o utilizar maquinaria, esto debido a la neuritis óptica relacionada con la dosis y duración del tratamiento. (15), (16)

3.10. Rifampicina.

3.10.1. Propiedades fisicoquímicas.

- ✓ Estructura química:

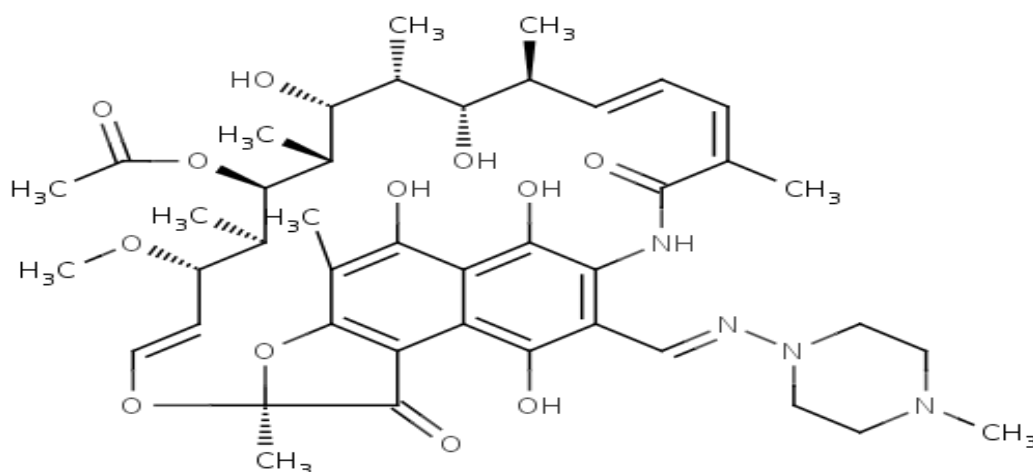


Figura 19. Estructura química de rifampicina.

- ✓ Nombre IUPAC: (7S,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S)-2,15,17,27,29-pentahidroxi-11-metoxi-3,7,12,14,16,18,22-heptametil-26-[(E)-N-(4-metilpiperazin-1-il)carboximidoil]-6,23-dioxo-8,30-dioxa-24-azatetraciclo[23.3.1.1^{4,7}.0^{5,28}]]triaconta-1,3,5(28),9,19,21,25(29),26-octaen-13-il acetato
- ✓ Número CAS: 13292-46-1
- ✓ Fórmula condensada: C₄₃H₅₈N₄O₁₂
- ✓ Peso molecular: 822.9402
- ✓ pka: 8.25

- ✓ Solubilidad: Ligeramente soluble en agua (pH 2 es de 100 mg/mL, pH 5.3 es de 4 mg/mL, pH 7.5 es de 2.8 mg/mL) y etanol.
- ✓ Log P: 2.7
- ✓ Punto de fusión: 183°C
- ✓ Forma y color: Polvo de color rojo.
- ✓ Estabilidad y manejo: Rifampicina es sensible a la luz y a la humedad, la temperatura de almacenaje recomendado es de -20°C. ^{(13), (17)}

3.10.2. Propiedades farmacológicas.

Es un antibiótico semisintético producido por *Streptomyces mediterranei*. Este tiene un amplio espectro antibacterial, incluyendo actividad agonista en varias especies de *Mycobacterium*, en organismos susceptibles inhibe la actividad de la RNA polimerasa dependiente del ADN por formación de un complejo estable con la enzima, lo cual suprime la síntesis de RNA, ver Figura 20. La rifampicina tiene actividad bactericida, es activa contra microorganismos extracelulares de crecimiento rápido, pero también tiene actividad bactericida intracelularmente y contra *M. tuberculosis* de crecimiento lento e intermitente.

3.10.3. Propiedades farmacocinéticas.

- ✓ *Absorción.*- La rifampicina es fácilmente absorbida desde el tracto gastrointestinal. Los niveles plasmáticos máximos en adultos normales y niños varían ampliamente de un individuo a otro. La concentración plasmática de 10 µg/mL se presentan alrededor de 2 a 4 horas después de la administración de una dosis de 10 mg/kg de peso, con el estómago vacío. La absorción de rifampicina se reduce cuando se ingiere con alimentos.
- ✓ *Distribución.*- La rifampicina es ampliamente distribuido en el cuerpo, está presente en concentraciones efectivas en varios órganos y líquidos corporales, incluyendo el líquido cefalorraquídeo. Alrededor del 80% se une a proteínas, y la mayor parte de la fracción no unida no está ionizada y, por lo tanto, se difunde libremente en los tejidos.

- ✓ *Metabolismo.*- Después de la absorción, rifampicina se elimina rápidamente por la bilis y se genera una circulación entero hepática. Durante este proceso rifampicina sufre desacetilación progresiva de manera que casi todo el fármaco se metaboliza a esta forma en la bilis, en aproximadamente 6 horas. Este metabolito mantiene actividad antibacteriana.
- ✓ *Eliminación.*- La reabsorción intestinal se reduce por la desacetilación y así se facilita la eliminación. Hasta 30% de una dosis se excreta en la orina, con alrededor de la mitad de esta fracción como medicamento inalterado. El tiempo de vida media es de aproximadamente de 4 a 6 horas.

3.10.4. Indicaciones terapéuticas.

La rifampicina está indicada en el tratamiento de todas las formas de tuberculosis, incluyendo casos recientes, avanzados, crónicos, y resistentes, este debe asociarse por lo menos con otro fármaco antituberculoso. También está indicado en el tratamiento de la lepra multibacilar y paucibacilar, siendo que también se debe asociar con otro fármaco antileproso. Puede emplearse en infecciones estafilocócicas graves, en el tratamiento de la brucelosis y otras infecciones causadas por microorganismos sensibles a rifampicina, siendo que siempre se deberá administrar en conjunto con otro agente antibacteriano hacia el cual el microorganismo sea sensible, esto para evitar la aparición de microorganismos resistentes a rifampicina.

3.10.5. Contraindicaciones.

Está contraindicada en pacientes con historia de hipersensibilidad a alguna de las rifampicinas, en la administración concomitante con saquinavir/ritonavir.

3.10.6. Precauciones generales.

Pacientes con insuficiencia hepática deben recibir rifampicina sólo si es necesario.

Los adultos con tuberculosis tratados con rifampicina deben realizarse exámenes basales de enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina sérica, biometría hemática completa y cuenta plaquetaria.

La rifampicina puede producir una coloración rojiza en la orina, sudor, esputo y lágrimas.

3.10.7. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.

La rifampicina atraviesa la barrera placentaria y aparece en la sangre del cordón umbilical. No se conoce el efecto sobre el feto. Puede causar hemorragias posnatales en el recién nacido y/o en la madre, por lo que se debe administrar, sólo si, los beneficios de la paciente superan los posibles riesgos para el feto. Se excreta en la leche materna, por lo tanto se debe considerar la recomendación anterior.

3.10.8. Reacciones adversas.

Se ha reportado colitis pseudomembranosa, reacciones gastrointestinales (náuseas, vómito, malestar abdominal y diarrea). Se puede presentar trombocitopenia con o sin púrpura. Se han reportado casos de psicosis. Pueden ocurrir reacciones cutáneas leves, que incluyen rubor y prurito con o sin eritema.⁽¹⁸⁾

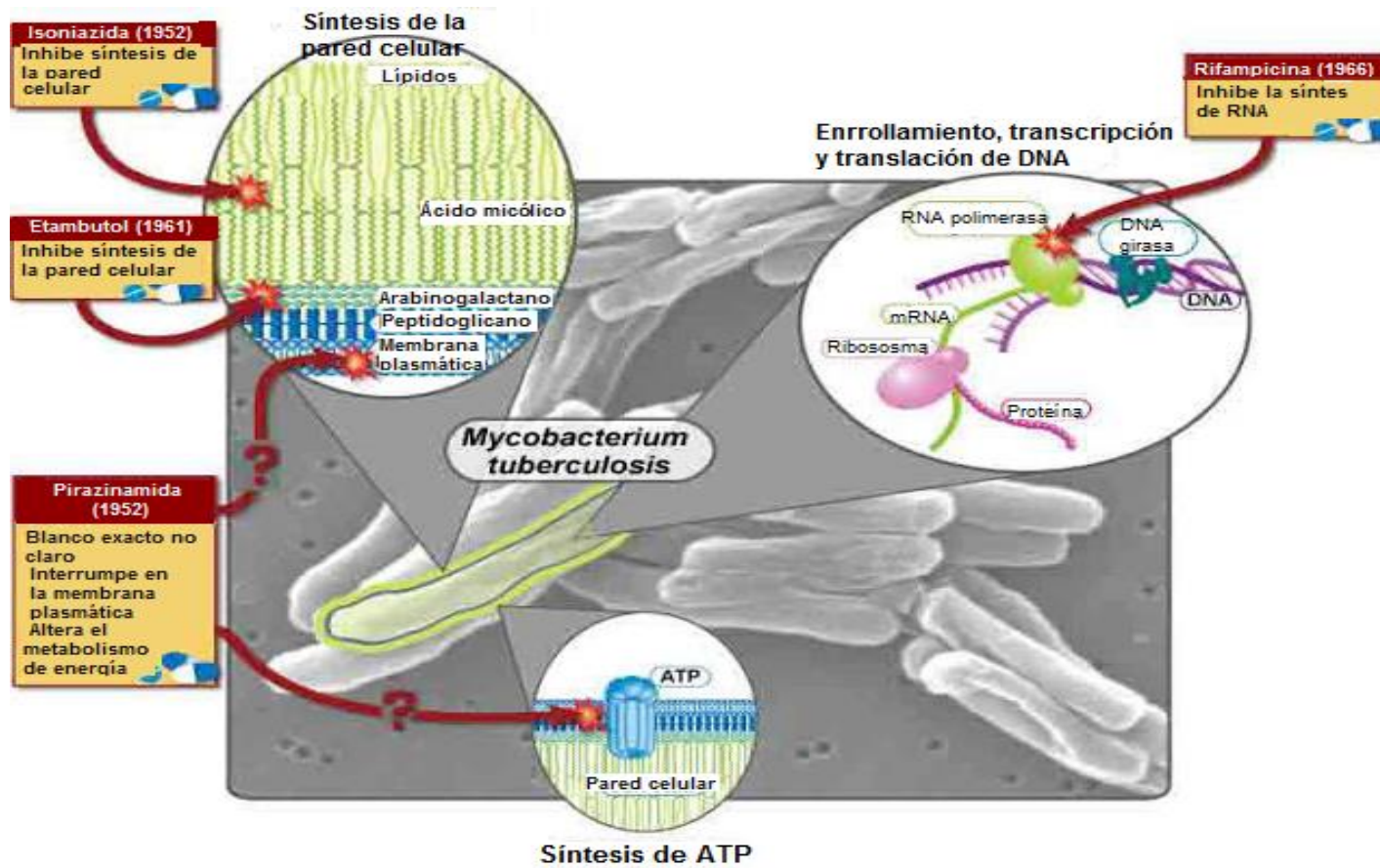


Figura 20. Sitio de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. ⁽¹⁹⁾

3.11. Cromatografía.

La cromatografía es un método de separación, donde los compuestos a separar se distribuyen entre dos fases: la **fase estacionaria** y la **fase móvil**, siendo que también permite la identificación y determinación de los compuestos presentes en una mezcla compleja. La fase estacionaria es una capa de partículas sólidas que se encuentran fijadas en un lugar o soporte, como una columna o en una superficie plana. La fase móvil es aquella que se encuentra en movimiento sobre o a través de la fase estacionaria, esta puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. ^{(20), (21)}

3.11.1. Clasificación de los métodos cromatográficos.

Existen 2 tipos de métodos que se consideran:

- ✓ Cromatografía en columna, donde la fase estacionaria está contenida en un tubo estrecho y la fase móvil pasa ya sea por presión o gravedad.
- ✓ Cromatografía plana, donde la fase estacionaria está sobre una placa plana o en los poros de un papel, la fase móvil se desplaza sobre ella por capilaridad o por gravedad.

En la Tabla 10 se presenta la clasificación de métodos cromatográficos, en la cual se considera la naturaleza de la fase móvil, la naturaleza de la fase estacionaria y el tipo de equilibrio entre las fases. Se puede observar también que el método más utilizado es una cromatografía en columna. ^{(20), (22)}

Tabla 10. Clasificación de métodos cromatográficos.

Clasificación general	Fase móvil	Fase estacionaria	Mecanismo	Técnica
Cromatografía de gases	Gas	Sólido	Adsorción	Columna
	Gas	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Partición	Columna
Cromatografía líquida	Líquido	Sólido	Adsorción	Columna, capa delgada
	Líquido	Sólido (resina de intercambio iónico)	Intercambio iónico	Columna
	Líquido	Sólido	Exclusión	Columna
	Líquido	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Partición	Columna, capa delgada
	Líquido	Líquido con grupo específico unido a una superficie sólida.	Afinidad	Columna
Cromatografía de fluidos supercríticos	Fluido supercrítico	Sólido	Adsorción	Columna
	Fluido supercrítico	Líquido	Partición	Columna

3.11.2. Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de espectrometría MS-MS.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un tipo de cromatografía en la cual la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria presenta tamaños de partícula de 3-10 μm , donde para lograr una velocidad de flujo satisfactoria, el líquido debe someterse a presiones altas. Es una de las herramientas analíticas más importantes, teniendo un amplio campo de aplicación como medicina forense, el área bioquímica, ciencias ambientales, ciencias de alimentación, química farmacéutica y toxicología. Mediante esta se puede

separar y determinar especies en varios materiales, ya sea orgánico, inorgánico o biológico.

Con el desarrollo de este tipo de cromatografía, se requirió de instrumentos capaces de soportar altas presiones, así como de detectores para el monitoreo de los efluentes de la columna. El equipo de CLAR se encuentra conformado por: recipientes de fase móvil y/o un sistema de tratamiento de disolventes, un sistema de bombeo (capaz de generar presiones de hasta 6000 psi), un sistema de inyección, un termostato para columna (puede o no ser necesario) y un sistema de detección.

Los sistemas de detección más usados son de fluorescencia, UV-Vis, arreglo de diodos, índice de refracción, electroquímico y espectrometría de masas, siendo este último el de mayor interés.

En los últimos años, se ha considerado ideal la combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas.

La espectrometría de masas se refiere al conjunto de técnicas utilizadas para la medición de la masa de iones (relación masa/carga) y su abundancia en la fase gaseosa. Permite obtener información de la masa molecular, estructural, así como un análisis cuantitativo preciso. Los pasos que incluye la medición son:

- a) Generación de moléculas en fase gaseosa.
- b) Ionización.
- c) Separación según su masa.
- d) Detección del pico del ion.

Considerando los puntos anteriores, tenemos que los componentes básicos del sistema de detección de espectrometría de masas consta de: una fuente de ionización (para a y b), el analizador (c) y el transductor/detector (d).

- ✓ Fuente de ionización.

En la combinación de CLAR con espectrometría de masas, conocida también como LC-MS, el requisito que debe cumplir la muestra para su análisis, es que debe de estar en estado gaseoso, sin embargo, la salida de la columna es un líquido donde el soluto está disuelto en un disolvente, por lo que el primer paso

para el análisis requiere de una evaporación del disolvente. Las fuentes de ionización cumplen con este objetivo, siendo que también garantizan la estabilidad del ion producido. Actualmente las fuentes de ionización para LC-MS son:

Ionización por electrospray (ESI). Trabaja a presión atmosférica, el proceso de nebulización, se da cuando la muestra procedente de la columna entra al capilar junto con una corriente de gas de nitrógeno coaxial, el campo eléctrico creado a la salida del nebulizador combinado con la corriente de gas dan lugar a la formación de un fino aerosol, el cual contiene pequeñas gotas cargadas eléctricamente, a los que se les llama droplets. Los droplets formados son atraídos hacia un electrodo, donde antes de llegar a este, sufren un proceso de evaporación del disolvente, que trae como consecuencia una disminución del tamaño de la gota aproximadamente hasta 1 μm de diámetro, provocando que los iones que se encuentran en la superficie de la misma se vean forzados a aproximarse entre sí. Cuando la repulsión entre iones se hace mayor a la fuerza cohesiva debida a la tensión superficial, la gotita formada se rompe, proyectando gotas aún más pequeñas de aproximadamente 10 nm, estas continúan perdiendo disolvente, hasta dejar los iones en fase gaseosa (ver figura 21).

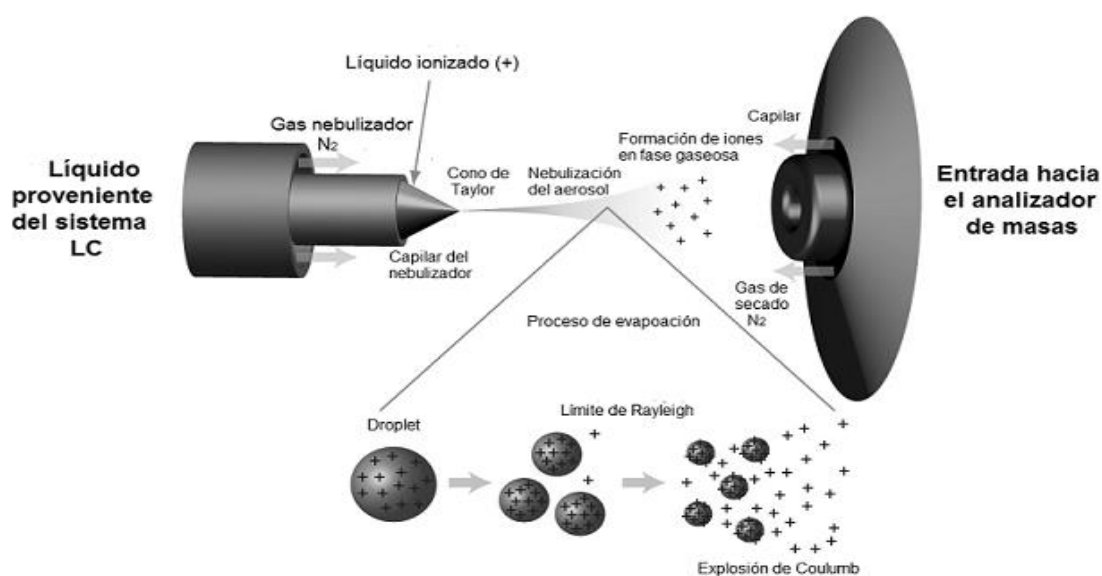


Figura 21. Fuente de ionización por electrospray (ESI).⁽²³⁾

Ionización química a presión atmosférica (APCI). La muestra procedente de la columna entra al capilar de nebulización para la formación del aerosol, el cual se da por una combinación de calor con una corriente coaxial de nitrógeno, en las gotas formadas se da la evaporación de las moléculas de disolvente y del analito. La obtención de iones se da por la aplicación de una descarga visible y de alto voltaje proveniente de una corona, donde las moléculas de disolvente son ionizadas y mediante una secuencia de reacciones se crean los iones del analito, para posteriormente introducirse al analizador (ver figura 22).

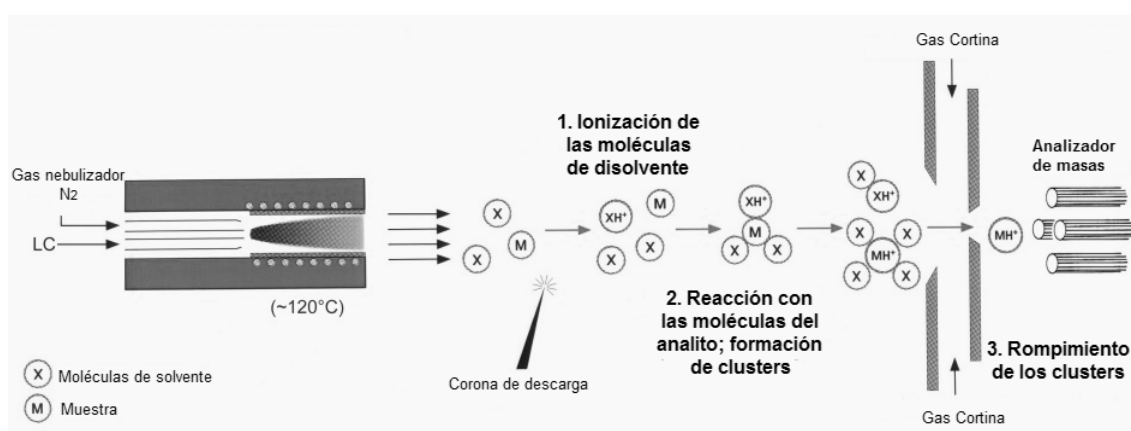


Figura 22. Fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI). ⁽²⁴⁾

Fotoionización a presión atmosférica (APPI). Esta es una técnica relativamente nueva, la nebulización se da de manera similar que en APCI, sin embargo la formación de iones se da por una descarga de fotones generada por una lámpara UV de kriptón, en un estrecho rango de energía de ionización. La transferencia de carga puede provenir de compuestos no polares (un agente dopante) o desde el solvente para la formación del ion del analito, el cual una vez ionizado pasa al analizador (figura 23).

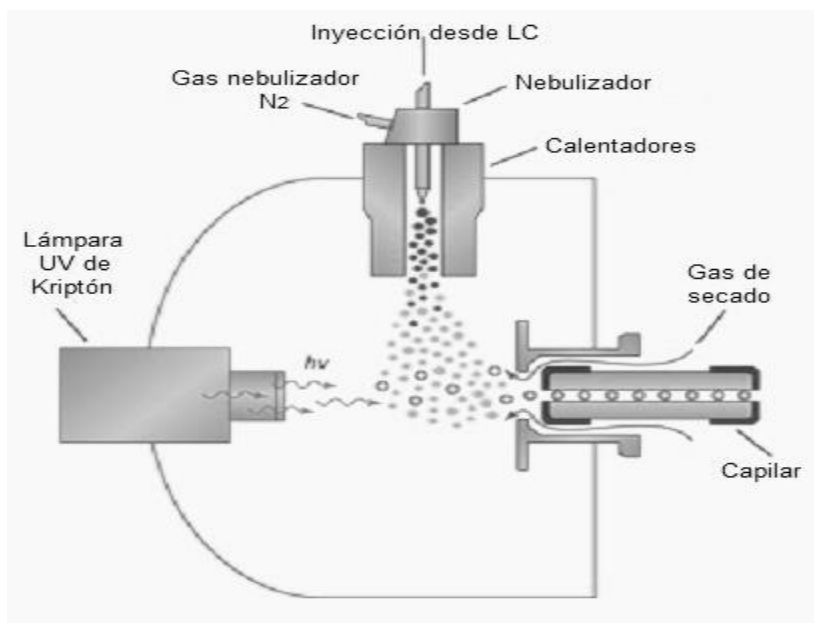


Figura 23. Fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI).⁽²⁵⁾

✓ Analizadores

El analizador de un espectrómetro de masas, tiene como objetivo limitar los iones que llegan al detector y lo hace mediante el poder de resolución (mayor selectividad) del mismo. El diseño de los analizadores incluye una óptica de iones, la cual permite la focalización solamente de los iones de interés, con lo que se logra incrementar el poder de resolución y la sensibilidad. Existen diferentes tipos de analizadores de masas: de sector magnético, de doble sector magnético, filtro cuadrupolo, de trampa de iones, de tiempo de vuelo y de transformada de Fourier (ciclotrón iónico). A continuación se describe el analizador de filtro de masas de cuadrupolo, siendo este, componente del equipo con el cual se trabajó en el proyecto.

Filtro de masas cuadrupolo

Consta de cuatro barras metálicas esmeriladas, que están alineadas paralelamente entre sí, dos verticales y dos horizontales, la separación de la masa (relación m/z) se realiza mediante la aplicación de un campo eléctrico variable con el tiempo, provocando una diferencia de potencial en las barras, de esta manera, cuando un haz de iones atraviesa desde la fuente las barras, estos se mueven a lo largo de la misma realizando oscilaciones completas.

Cada relación masa-carga presenta una combinación de voltajes única, por lo que tan solo un intervalo estrecho de m/z puede pasar al mismo tiempo a través del cuadrupolo (figura 24).

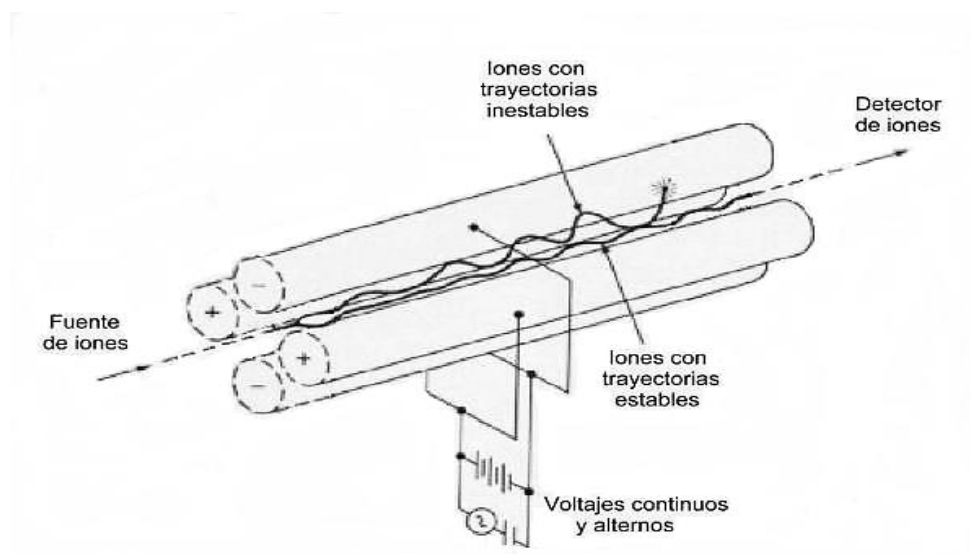


Figura 24. Diagrama de la estructura de un filtro de masas cuadrupolo. ⁽²⁶⁾

Comúnmente la combinación de CLAR con un espectrómetro de masas con cuadrupolo se le denomina LC-MS. Hoy en día se encuentran equipos disponibles, que tienen acoplados uno o más cuadrupolos, a lo que se le conoce como espectrometría de masas en tándem o LC-MS-MS.

Los espectrómetros de masas en tándem generalmente cuentan con 3 cuadrupolos, siendo el cuadrupolo 1 (Q1), la celda de colisión (q2) y el cuadrupolo 3 (Q3), también se le conoce como triple cuadrupolo o QQQ. El modo de operación de este tipo de sistema, consiste en que en el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona una masa determinada con lo que ocurre la filtración del ion de interés (ion precursor), este pasa a la cámara de colisión (q2) donde por medio de un gas inerte se fragmenta y los iones producidos en esta pasan al tercer cuadrupolo (Q3) para ser analizados (ion producto). El sistema de triple cuadrupolo puede trabajar en otros modos, en la Tabla 11 se muestran los modos de operación:

Tabla 11. Modos de operación de un triple cuadrupolo.

Modo de operación	Q1	q2	Q3
Full Scan	Barrido	No se lleva a cabo la fragmentación	Barrido
Product Ion Scan	Se realiza el filtro del ion precursor	Fragmentación	Barrido
Precursor Ion Scan	Barrido	Fragmentación	Se realiza el filtro del ion producto
Neutral Loss Scan	Barrido	Fragmentación	Barrido
MRM (Multi Reaction Monitoring)	Se realiza el filtro del ion precursor	Fragmentación	Se realiza el filtro del ion producto

✓ Transductor/detector.

Una vez realizada la separación de los iones en el analizador, estos llegan al transductor donde la corriente de iones se amplifica mediante un multiplicador de electrones, dando como resultado una señal de salida. ^{(20), (21)}

3.12. Validación de métodos analíticos.

Se entiende por validación, a contar con evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. Así mismo, la validación de un método analítico tiene como objetivo principal, el garantizar la confiabilidad del mismo en la cuantificación de un fármaco en una matriz biológica (por ejemplo: plasma, sangre, orina, saliva).

Los criterios y requisitos para la validación de métodos en México, se establecen en la Norma Oficial Mexicana: NOM-177 SSA-1-2013 “que

establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable; requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas”. Para los fines del presente trabajo, se consideró la Norma Oficial Mexicana vigente en el tiempo en el que se realizó el proyecto, la cual es la NOM-177 SSA-1-1998 “que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable; requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.”

La validación del método se realiza una vez determinadas las condiciones analíticas, evaluando como mínimo los parámetros siguientes:

Exactitud: Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Estabilidad de la muestra: Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Linealidad: Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Límite inferior de cuantificación: Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Límite de detección: Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

Recuperación absoluta: Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Selectividad: Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Tolerancia: Capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. ⁽²⁷⁾

Debido al desarrollo de nuevas tecnologías como: cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, las Guías internacionales como FDA (Food and Drug administration), EMA (European Medicines Agency), ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria), se establecen parámetros adicionales para garantizar la confiabilidad del método. ^{(28), (29), (30), (31)}

Los parámetros a evaluar son:

Efecto matriz: Es el incremento o supresión en la ionización de los analitos por la presencia de los componentes en la matriz biológica. Se define como la relación de la respuesta del analito en presencia de iones de la matriz entre la respuesta del analito en ausencia de iones de la matriz.

Acarreo: Efecto causado por residuos del analito de una muestra anterior a otra, reflejando un incremento en la respuesta de esta última. Este efecto puede afectar considerablemente a la precisión y exactitud del método.

Respuesta cruzada (Cross talk): Efecto causado por la eliminación lenta de los iones desde la celda de colisión, lo cual puede afectar la respuesta/señal de la siguiente transición e impactar en la cuantificación del analito de interés.

A continuación (Tabla 12) se muestra un comparativo de la NOM-177-SSA-1-1998 con respecto a otras guías internacionales:

Tabla 12. Comparación de NOM-177-SSA-1998, FDA, EMA y ANVISA.

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
Selectividad	-Analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. -Evaluar interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante).	-Si se cuantifica más de un analito, en cada analito se debe evaluar la selectividad, para demostrar la ausencia de interferencias. -Para métodos por LC-MS-MS, el efecto matriz debe ser evaluado, midiendo la precisión, selectividad y sensibilidad.	No hay diferencias significativas.	-Evaluación de un mínimo de 4 muestras de plasma lipémico y plasma hemolizado. -Si las primeras 6 fuentes no cumplen, se pueden evaluar otras 6 fuentes, si éstas no cumplen, se deberá modificar el método, para eliminar las interferencias.
Linealidad	-Establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por 5 concentraciones	-Evaluación de una curva de calibración por cada analito en la muestra. -Curva de calibración conformada por: a) Muestra blanco (muestra procesada sin E.I.). b) Muestra cero (muestra procesada con E.I.).	-Curva de calibración por cada analito incluido en el método de validación y por cada corrida analítica. -Curva de calibración conformada por: a) Un mínimo de 6 concentraciones. b) Muestra blanco (muestra	-Evaluación de al menos 3 curvas de calibración, cada una debe incluir: a) Muestra blanco b) Muestra cero c) 6 muestras a diferentes concentraciones del analito. -Para modelos no lineales se debe incluir como mínimo 8

GENERALIDADES

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
	<p>distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.</p> <p>-Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.</p>	<p>c) 6 a 8 muestras que cubran el rango esperado, incluyendo el límite de cuantificación.</p>	<p>procesada sin analito y sin E.I.).</p> <p>c) Muestra cero (muestra procesada con E.I.).</p> <p>Cada estándar de calibración se puede analizar en replica.</p> <p>-Al menos 3 curvas deben ser consideradas.</p>	<p>muestras a diferentes concentraciones, para la curva de calibración.</p>
Límite de cuantificación	<p>-Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo.</p>	<p>-Se realiza conforme a lo establecido en precisión y exactitud.</p>	<p>--Se realiza conforme a lo establecido en precisión y exactitud.</p>	<p>--Se realiza conforme a lo establecido en precisión y exactitud.</p>
Límite de detección	<p>-Determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede</p>	<p>No aplica</p>	<p>No aplica.</p>	<p>No aplica.</p>

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
	distinguirse se los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.			
Precisión	<p>-Evaluar como sigue:</p> <p>A) Repetibilidad: analizar en mismo día por quintuplicado, un mínimo de 3 concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica.</p> <p>B) Reproducibilidad intralaboratorio: analizar por duplicado durante 3 días, un mínimo de 3 concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica.</p> <p>Las concentraciones</p>	<p>-Analizar un mínimo de 5 determinaciones por concentración, mínimo 3 concentraciones dentro del rango: baja, media y alta. Aplica para una intra-corrída y para una inter- corrída.</p>	<p>-Evaluación de precisión como sigue:</p> <p>A) Intra-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras por concentración a los niveles de límite de cuantificación, bajo, medio y alto, en una misma corrída.</p> <p>B) Inter-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras por concentración a los niveles de límite de cuantificación, bajo, medio y alto, en 3 diferentes corrídas en al menos 2 días diferentes.</p>	<p>-Evaluación de precisión como sigue:</p> <p>A) Intra-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras de por lo menos 5 concentraciones: límite de cuantificación, bajo, medio, alto y control diluido, en una misma corrída.</p> <p>B) Inter-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras de por lo menos 5 concentraciones: límite de cuantificación, bajo, medio, alto y control diluido, en un mínimo de 3 corrídas diferentes en días distintos.</p>

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
	deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango.			
Exactitud	-Se toman las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad.	-Evaluación con un mínimo de 5 determinaciones por concentración (mínimo 3).	-Evaluación de la exactitud como sigue: A) Intra-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras por concentración a los niveles de límite de cuantificación, bajo, medio y alto, en una misma corrída. B) Inter-corrída: analizar un mínimo de 5 muestras por concentración a los niveles de límite de cuantificación, bajo, medio y alto, en 3 diferentes corrídas en al menos 2 días.	-Evaluación de exactitud como sigue: Analizar un mínimo de 5 muestras de por lo menos 5 concentraciones: límite de cuantificación, bajo, medio, alto y control diluido, en una misma corrída (intra-corrída) y en un mínimo de 3 corrídas diferentes en días distintos.

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
Recobro	-Analizar al menos por triplicado un mínimo de 3 concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos a analizar en la matriz biológica, dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes.	No hay diferencias significativas.	No aplica.	No aplica.
Integridad de la dilución.	Las concentraciones por encima del rango pueden diluirse con el mismo tipo de matriz biológica.	-Las muestras que presenten una concentración por encima del límite superior de cuantificación, se pueden someter a una dilución, adicionando la misma matriz libre del fármaco. La dilución de la muestra debe cumplir con precisión y exactitud,	-La integridad de la dilución no debe afectar la exactitud y precisión. Debe ser demostrada a una concentración del analito cerca del límite superior de cuantificación diluida con la matriz sin analito, un mínimo de 5 determinaciones por factor de dilución debe ser	No aplica.

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
		considerándola como muestra control.	evaluado. La integridad de la dilución debe cubrir la dilución aplicada a las muestras de estudio.	
Estabilidad	<p>-Evaluación con muestras al menos por duplicado, a 3 niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos:</p> <p>A) Condiciones de almacenamiento: evaluar estabilidad bajo las condiciones en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.</p> <p>B) Ciclos de congelación-descongelación:</p>	<p>-Evaluación con al menos 3 muestras a concentración baja y alta.</p> <p>A) Condiciones de almacenamiento (estabilidad a periodos largos): no hay diferencias.</p> <p>B) Ciclos de congelación-descongelación: evaluación de 3 ciclos, entre cada ciclo debe haber un periodo de 12 a 24 horas.</p> <p>C) Temperatura ambiente: evaluación donde las muestras deben permanecer de 4 a 24 horas en esta condición, para su posterior análisis.</p>	<p>-Evaluación de muestras a concentración baja y alta.</p> <p>A) Condiciones de almacenamiento (estabilidad a periodos largos): Si el estudio es multi-analito, la estabilidad debe evaluarse en la matriz conteniendo todos los analitos.</p> <p>B) Ciclos de congelación-descongelación: número de ciclos igual o mayor al que se aplicaran en el estudio, con un periodo mínimo de 12 horas entre cada uno.</p> <p>C) Temperatura ambiente.</p> <p>D) Estabilidad de soluciones estándar de los analitos y el</p>	<p>-Evaluación con al menos 3 muestras a concentración baja y alta.</p> <p>A) Condiciones de almacenamiento (estabilidad a periodos largos): no hay diferencias.</p> <p>B) Ciclos de congelación-descongelación: número de ciclos igual o mayor al que se aplicaran en el estudio, con un periodo mínimo de 12 horas entre cada uno.</p> <p>C) Temperatura ambiente: evaluación por un tiempo mayor al que se someterán las muestras durante el estudio.</p> <p>D) Estabilidad de soluciones estándar: evaluación de un</p>

GENERALIDADES

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
	<p>evaluación de estabilidad al congelar y descongelar las muestras y al menos 2 ciclos.</p> <p>C) Otros: evaluación de otros factores a los cuales pueden ser sometidas las muestras hasta su análisis.</p>	<p>D) Estabilidad de soluciones estándar: aplica para las soluciones de analitos y del E.I., evaluando temperatura ambiente (por lo menos 6 horas), refrigeración y congelación en el periodo requerido.</p> <p>E) Estabilidad de muestra procesada: consiste en el tiempo en el cual la muestra pasa en el automuestreador.</p>	<p>E.I.</p> <p>E) Estabilidad de muestra procesada: evaluación a temperatura ambiente, condiciones usadas durante el estudio o en el automuestreador.</p>	<p>mínimo de 3 muestras de la solución primaria de mayor concentración y de la solución de trabajo de menor concentración (realizar la dilución adecuada), en las condiciones a las que se someten durante su uso y almacenamiento.</p> <p>E) Estabilidad de muestra procesada: evaluación en un intervalo que comprenda el término de procesamiento de muestras y el final de la corrida analítica más larga. Si se realiza algún almacenamiento en el automuestreador, debe ser evaluado.</p>
Tolerancia	Evaluación del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (p. ej. pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de	No aplica.	No aplica.	No aplica.

GENERALIDADES

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
	incubación), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica.			
Efecto matriz.	No aplica.	-En el caso de procedimientos basados en LC-MS-MS, se deben tomar las acciones apropiadas para medir el efecto matriz a lo largo de la aplicación del método.	-El efecto matriz debe ser investigado cuando se utiliza espectrometría de masas, usando un mínimo de 6 lotes independientes de la matriz, proveniente de donadores. El pool de la matriz no debe ser usado. Para cada analito y el E.I., el factor matriz debe ser calculado para cada lote de la matriz, mediante el cálculo de la relación de área del pico en presencia de la matriz (blanco de matriz con adición del analito después de la extracción) con respecto a la relación de área del pico en ausencia de la matriz (analito en solución). El factor matriz normalizado	-Evaluación, realizando el análisis de muestras procesadas de la matriz biológica con una posterior adición del analito y el E.I. y de muestras en solución a las mismas concentraciones del control bajo y control alto. -Si la matriz biológica es plasma, analizar 8 muestras de fuentes distintas, siendo 4 normales, 2 lipémicas y 2 hemolizadas. -Para cada muestra debe ser obtenido el factor matriz normalizado (respuesta del analito o E.I. en la matriz/respuesta del analito o E.I. en solución).

GENERALIDADES

PARÁMETRO	NOM-177-SSA1-1998*	FDA MAYO 2001 Bioanalytical Method Validation	EMA/CHMP/EWP/192217/2 009 Guideline on bioanalytical method validation	Brasil Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012
			para el E.I. debe ser calculado por división del factor matriz del analito por el factor matriz del E.I. La determinación debe realizarse con el nivel bajo y alto.	
Acarreo.	No aplica.		-Durante la validación, el acarreo debe ser evaluado por la inyección de una muestra blanco después de una muestra de concentración alta o del límite superior de cuantificación.	-Evaluación con un mínimo de 3 inyecciones de la misma muestra blanco, siendo que antes de cada inyección, se realizará la inyección de un límite superior de cuantificación.

*Se consideraron los lineamientos de esta Norma Oficial Mexicana, ya que era la norma vigente al momento de realizar el proyecto.

4. PARTE EXPERIMENTAL

-Desarrollo y validación del método analítico por CLAR acoplado a un detector de espectrometría de MS-MS para cuantificar los fármacos en plasma.

4.1. Material, equipos e instrumentos

4.1.1. Material.

- ✓ Matraces volumétricos calibrados ámbar: 5 y 10 mL.
- ✓ Matraces volumétricos calibrados: 10, 50, 100 y 1000 mL.
- ✓ Probeta graduada de 500 mL.
- ✓ Puntas de volumen variable para pipeta repetidora (Combitip®).
- ✓ Viales ámbar para automuestreador.
- ✓ Pipetas Pasteur y bulbos.
- ✓ Vasos de precipitados de vidrio: 250 y 1000 mL.
- ✓ Vasos de precipitados de polipropileno: 50, 100 y 1000 mL.
- ✓ Frascos de vidrio con tapa de rosca de: 100, 500, 1000 y 2000 mL.
- ✓ Guantes de nitrilo.
- ✓ Microtubos ámbar de 2 mL.
- ✓ Microtubos de 2 mL.
- ✓ Insertos de propileno.
- ✓ Membranas de filtración de Nylon de 0.45 micras y 47 mm de diámetro.
- ✓ Gradillas para microtubos.
- ✓ Probeta graduada de 1 L.
- ✓ Naves de pesada.
- ✓ Espátula de cromo- níquel.
- ✓ Barra magnética de agitación.

4.1.2. Equipos e instrumentos.

- ✓ Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, que consta de:

PARTE EXPERIMENTAL

DESCRIPCIÓN	MARCA	MODELO	# SERIE
Detector Masas/Masas	AB SCIEX	API 5000	AG23921001
Fuente ESI	AB SCIEX	API 5000	23655100122
Sistema de control de temperatura para columna	SHIMADZU	CTO-20AC	L20214550279
Desgasificador	SHIMADZU	DGU-20A3	SS1-3-1439
Módulo de comunicación	SHIMADZU	CBM-20A	L20234752408 US G
Bomba A	SHIMADZU	LC-20AD	L20104552439 US K
Bomba B	SHIMADZU	LC-20AD	L-20104753546 US H
Automuestreador del	SHIMADZU	SIL-20ACHT	L20354755729 US I

- ✓ Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C.
- ✓ Balanza granataria marca Ohaus modelo Adventurer PRO.
- ✓ Agitador vórtex marca Scientific Industries, modelo G560.
- ✓ Agitador vórtex de gran capacidad, marca Glas-Col.
- ✓ Agitador vórtex multi-tubo, marca VWR, Modelo 945063.
- ✓ Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A40.
- ✓ Sistema de purificación de agua marca ELGA, modelo Purelab.
- ✓ Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf, modelo Multipette Plus.
- ✓ Micropipeta volumen variable de 100-1000 µL marca Hirschmann Laborgeräte, modelo Labopette.
- ✓ Micropipeta volumen fijo de 200 µL marca Hirschmann Laborgeräte, modelo Labopette.
- ✓ Micropipeta volumen variable de 10-100 µL marca Hirschmann Labopette, modelo Labopette.
- ✓ Refrigerador Torrey R-16.
- ✓ Centrífuga Hettich Rotanta 460R.
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5424.
- ✓ Centrífuga Centra CL5.
- ✓ Centrífuga Hettich Rotanta 460.

- ✓ Parrilla con agitación magnética.
- ✓ Baño ultrasónico Marca Bransonic, modelo 3510R-MT.
- ✓ Potenciómetro Oakton Serie pH 510.
- ✓ Potenciómetro Oakton Serie pH 1100.

4.1.3. Reactivos y sustancias de referencia.

- ✓ Agua grado cromatográfico (CLAR) obtenida del sistema de purificación de agua marca ELGA, modelo Purelab.
- ✓ Acetonitrilo (ACN), J.T. Baker, grado cromatográfico (CLAR).
- ✓ Metanol (MeOH), J. T. Baker, grado cromatográfico (CLAR).
- ✓ Ácido fórmico, Merck, 98-100%, grado reactivo.
- ✓ Acetato de amonio, J. T. Baker, grado reactivo
- ✓ Ácido ascórbico, J.T. Baker, granulado fino

4.1.4. Sustancias de Referencia.

- ✓ Rifampicina (RIF). Sustancia de Referencia Secundaria, Silanes, lote 1011004035, potencia 95.9%.
- ✓ Clorhidrato de Etambutol (ETA). Sustancia de Referencia Secundaria, Silanes, lote 1010003934, potencia 100.19%.
- ✓ Clorhidrato de Memantina E.I. (MEM). Sustancia de Referencia Secundaria, Torrent, lote MMT/1008008(M), potencia 99.5%.
- ✓ Pirazinamida (PIR). Sustancia de Referencia Secundaria, Silanes, lote 1104004613, potencia 99.7%.
- ✓ Isoniazida (ISO). Sustancia de Referencia Secundaria, Silanes, lote 1011004138, potencia 99.1 %.

4.1.5. Matriz biológica.

El fluido biológico para el desarrollo y validación del método analítico utilizado en la preparación de muestras plasmáticas (dobles blancos, blancos, curvas de calibración y puntos control) fue plasma humano fresco con heparina como

anticoagulante, proveniente de voluntarios sanos de Biological Special Corporation el cual contó la documentación que amparó su bioseguridad. El plasma fue almacenado en congelación a -20°C .

4.2. Desarrollo del método analítico.

Para el desarrollo del método analítico, se requiere tener información acerca de las propiedades fisicoquímicas de los analitos en estudio, para determinar las condiciones del detector, las condiciones cromatográficas y el método de extracción en plasma, los cuales se tienen que establecer para la cuantificación de los mismos.

4.2.1. Condiciones del detector y elección del estándar Interno

Las condiciones óptimas de detección de rifampicina, etambutol y el posible estándar interno (memantina, glimepirida), se determinaron mediante un ajuste de los parámetros de detección dependientes del analito y de los parámetros dependientes del flujo. Para tales fines, se prepararon las soluciones estándar de las sustancias de referencia en estudio a concentraciones de $1\ \mu\text{g/mL}$ y $100\ \text{ng/mL}$, con las cuales se realizó el scan correspondiente para buscar la relación masa/carga (m/z), en donde una vez ajustadas las condiciones del detector se obtuvo la estabilidad de la señal, el mejor nivel de respuesta y la selectividad/especificidad para cada uno de los analitos.

4.2.2. Condiciones cromatográficas.

Después de haber encontrado las mejores condiciones de detección para los analitos, se procedió a buscar las condiciones cromatográficas para obtener la adecuada separación e identificación de los analitos.

Los parámetros cromatográficos evaluados fueron:

4.2.2.1. Fase móvil.

Para la elección de la fase móvil, es importante considerar los componentes y la proporción de estos, así como el pH, ya que están relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de la molécula (ej. pka, polaridad, solubilidad).

Las fases estudiadas a diferentes proporciones fueron:

- Ácido fórmico 0.1% en H₂O: ácido fórmico 0.1% en MeOH,
- Acetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1% en H₂O: con ácido fórmico 0.1% en ACN,
- Acetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1% en H₂O: ACN,
- Acetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1% en H₂O: (ACN: MeOH 75:25 v/v).

4.2.2.2. Fase estacionaria

Se probaron las siguientes columnas cromatográficas:

- Zorbax SB- C18, 2.1 x 100 mm, 3.5µm.
- Zorbax Eclipse XDB- C18, 2.1 x 100 mm, 3.5µm.
- Polaris C18A, 4 x 150mm, 5µm.
- Polaris C18A, 2.0 x 50mm, 5µm.
- Zorbax Eclipse XDB-CN, 4.6 x 150mm, 5µm.
- Zorbax Eclipse XDB- C18, 4.6 x 150 mm, 5µm.
- Zorbax Eclipse Phenyl-Hexyl, 3 x 150 mm, 3.5µm.

4.2.2.3. Volumen de inyección, velocidad de flujo y temperatura de la columna

Se evaluaron volúmenes de inyección de 1, 2, 4 y 5 µL. Velocidades de flujo de 0.15, 0.3, 0.5, 0.6 y 1.0 mL/min. Temperaturas del horno de la columna de 25, 35 y 45°C.

Así los parámetros considerados en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

- Resolución entre picos.

- Ancho del pico.
- Simetría de los picos
- Sensibilidad.
- Seguimiento de la presión.
- Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).

4.2.3. Método de extracción

En un método de extracción se busca que el recobro sea bueno, preferentemente mayor al 50%, además de obtener la muestra libre o con la menor cantidad de impurezas de la matriz biológica.

Antes de iniciar con el método de extracción, se realizó una revisión bibliográfica, donde se reporta que rifampicina es un compuesto fotosensible, por lo que las condiciones en las cuales se manejó la sustancia de referencia, soluciones de trabajo y muestras plasmáticas fueron en presencia de luz amarilla. También se encontraron reportes en los cuales se determinó la degradación de rifampicina en muestras de plasma y donde la adición de ácido ascórbico prevenía la degradación de la misma. La concentración de ácido ascórbico recomendada es de aproximadamente el 0.5% p/v. por lo que se llevó a cabo la evaluación a una concentración del 0.5 y 1.0% p/v en las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina.

a) Método de extracción por precipitación de proteínas.

Se propuso una técnica de precipitación de proteínas con un disolvente orgánico. En el siguiente diagrama (Figura 25) se muestran los pasos y las variantes implicadas en el proceso.

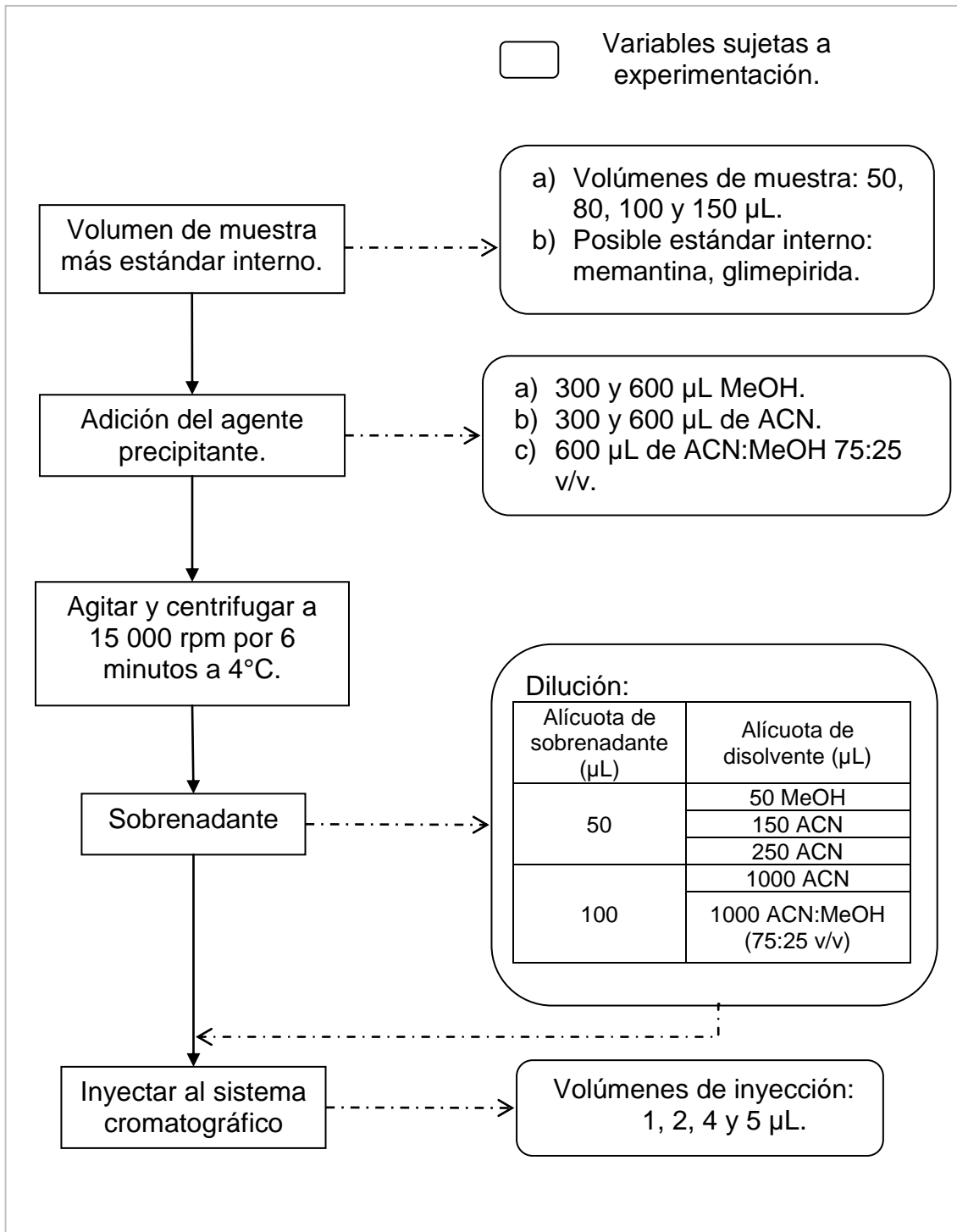


Figura 25. Evaluación de la técnica de precipitación de proteínas, para la extracción de RIF, ETA y el posible E. I. en plasma.

4.3. Validación del método.

La validación del método analítico se realizó conforme a los requisitos y parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia.

4.3.1. Preparación de soluciones.

- ✓ Fase móvil: acetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1 % en agua: acetonitrilo grado cromatográfico (10:90 v/v).

Pesar 0.77 g de acetato de amonio, disolver con 100 mL de agua grado cromatográfico y transferir a un matraz volumétrico de 1 litro, posteriormente adicionar 1 mL de ácido fórmico concentrado y llevar a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico.

- ✓ Solución de lavado. Ver preparación en fase móvil.
- ✓ Ácido ascórbico 5% p/v.

Pesar 5 g de ácido ascórbico, disolver en un vaso de precipitados, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua grado cromatográfico

- ✓ Agente precipitante (acetonitrilo grado CLAR:metanol grado CLAR 75:25 v/v).

Transferir 375 mL de acetonitrilo grado cromatográfico a una probeta graduada de 500 mL y agregar 125 mL de metanol grado cromatográfico, mezclar homogéneamente y transferir a un reservorio de 500 mL.

- ✓ Solución de referencia de etambutol, 1000 µg/mL (Solución A).

Pesar con exactitud el equivalente a 11.7 mg de sustancia de referencia de clorhidrato de etambutol (equivalente a 10 mg de etambutol) y

PARTE EXPERIMENTAL

transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico, sonicar durante 5 minutos.

- ✓ Solución de referencia de etambutol, 100 µg/mL (Solución B).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución A de etambutol a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

- ✓ Solución de referencia de etambutol, 10 µg/mL (Solución C).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución B de etambutol a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Para las soluciones de rifampicina, se realiza la preparación bajo luz amarilla.

- ✓ Solución de referencia de rifampicina, 1000 µg/mL (Solución D).

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de sustancia de referencia de rifampicina y transferir a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico; sonicar durante 5 minutos.

- ✓ Solución de referencia de rifampicina, 100 µg/mL (Solución E).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución D de rifampicina a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

- ✓ Solución de referencia de rifampicina, 10 µg/mL (Solución F).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución E de rifampicina a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

- ✓ Solución de referencia de memantina (E.I.), 1000 µg/mL (Solución I).

Pesar con exactitud el equivalente a 12.1 mg de sustancia de referencia de clorhidrato de memantina (equivalente a 10 mg de memantina) y

PARTE EXPERIMENTAL

transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

- ✓ Solución de referencia de memantina (E.I.), 2000 ng/mL (Solución II).

Transferir cuantitativamente 200 μ L de la solución I de memantina a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico

- ✓ Solución de referencia de memantina (E.I.), 100 ng/mL (Solución III).

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución II de memantina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico

- ✓ Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (etambutol 5.99 ng/mL, rifampicina 14.97 ng/mL y memantina 5.27 ng/mL) Solución AD1.

Transferir cuantitativamente 20 μ L de la solución A (1000 μ g/mL) de etambutol, 50 μ L de la solución D (1000 μ g/mL) de rifampicina y 930 μ L de metanol CLAR a un microtubo ámbar de 2 mL y mezclar homogéneamente. Posteriormente, tomar 50 μ L de muestra y adicionar 950 μ L de metanol CLAR y 100 μ L de ácido ascórbico 5% p/v, mezclar homogéneamente.

Transferir 50 μ L de muestra, adicionar 40 μ L de la solución II (1000 ng/mL) de memantina (E.I.) y 600 μ L de agente precipitante, mezclar homogéneamente. Finalmente transferir 100 μ L de la muestra a un microtubo ámbar de 2 mL, adicionar 1 mL de agente precipitante y mezclar.

Dividir la solución en alícuotas de 0.2 mL en microtubos ámbar de 2 mL y almacenarlas a -70°C . Descongelar un tubo cada día de trabajo a temperatura ambiente y en presencia de luz amarilla.

4.3.2. Preparación de muestras de curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.

Se prepararon cada una de las muestras de la curva de calibración y las muestras control de calidad en solución, de acuerdo a la Tabla 13 y Tabla 14 respectivamente, para preparar posteriormente las muestras en plasma heparinizado de acuerdo a los descrito en la Tabla 15 y Tabla 16.

Para la preparación de las muestras en solución se depositaron las alícuotas de rifampicina, etambutol y metanol CLAR correspondiente, en microtubos ámbar de 2 mL. Posteriormente tomar 50 μ L de las muestras preparadas en solución y añadir 950 μ L de plasma heparinizado, agitar en vórtex durante 1 minuto.

Con la finalidad de observar el efecto de la presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida en la cuantificación de etambutol, se prepararán muestras plasmáticas correspondientes al LIC, de acuerdo a la Tabla 17 y Tabla 18.

Para observar el efecto de la presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida en la cuantificación de rifampicina, se prepararon muestras plasmáticas correspondientes al LIC, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 19 y Tabla 20.

Y para observar el efecto de la presencia de Isoniazida y Pirazinamida en la cuantificación de rifampicina y etambutol, se prepararon nuestras plasmáticas control de calidad: CC bajo, CC medio y CC alto, tal y como se describe en la Tabla 21 y Tabla 22.

Tabla 13. Preparación de la curva de calibración en sistema.

Etambutol Soln C (10 µg/mL) µL	Etambutol Soln. B (100 µg/mL) µL	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. F (10 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. E (100 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Muestras en sistema
20	-	-	100	-	-	880	200	1000	LD
40	-	-	200	-	-	760	400	2000	CP 1
80	-	-	500	-	-	420	800	5000	CP 2
-	30	-	-	100	-	870	3000	10000	CP 3
-	80	-	-	240	-	680	8000	24000	CP 4
-	160	-	-	-	45	795	16000	45000	CP 5
-	-	25	-	-	70	905	25000	70000	CP 6
-	-	35	-	-	90	875	35000	90000	CP 7
-	-	45	-	-	120	835	45000	120000	CP 8

Soln.: Solución.

Tabla 14. Preparación de las muestras control de calidad en sistema.

Etambutol Soln. C (10 µg/mL) µL	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. F (10 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. E (100 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Muestras en sistema
40	-	200	-	-	760	400	2000	LIC
120	-	-	60	-	820	1200	6000	CC Bajo
-	20	-	-	50	930	20000	50000	CC Medio
-	40	-	-	100	860	40000	100000	CC Alto
-	45	-	-	120	835	45000	120000	LSC

Soln.: Solución.

Tabla 15. Preparación de la curva de calibración en plasma.

Muestras en sistema	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Etambutol Concentración en plasma (ng/mL)	Rifampicina Concentración Final en plasma (ng/mL)
LD	200	1000	50	950	10*	50*
CP 1	400	2000	50	950	20**	100**
CP 2	800	5000	50	950	40	250
CP 3	3000	10000	50	950	150	500
CP 4	8000	24000	50	950	400	1200
CP 5	16000	45000	50	950	800	2250
CP 6	25000	70000	50	950	1250	3500
CP 7	35000	90000	50	950	1750	4500
CP 8	45000	120000	50	950	2250***	6000***

*LD: Límite de Detección, **LIC: Límite Inferior de Cuantificación, ***LSC: Límite Superior de Cuantificación

NOTA: Al final de la preparación de las muestras en plasma, se adicionan 100 µL de ácido ascórbico al 5 % p/v, con la finalidad de evitar la degradación de rifampicina.

Tabla 16. Preparación de las muestras control de calidad en plasma

Muestras en sistema	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Etambutol Concentración en plasma (ng/mL)	Rifampicina Concentración en plasma (ng/mL)
LIC	400	2000	50	950	20	100
CC Bajo	1200	6000	50	950	60	300
CC Medio	20000	50000	50	950	1000	2500
CC Alto	40000	100000	50	950	2000	5000
LSC	45000	120000	50	950	2250	6000

CC: Muestras Control de Calidad, LIC: Límite Inferior de Cuantificación, LSC: Límite Superior de Cuantificación

NOTA: Al final de la preparación de las muestras en plasma, se adicionan 100 µL de ácido ascórbico al 5 % p/v, con la finalidad de evitar la degradación de rifampicina.

Tabla 17. Preparación de las muestras LIC en sistema para etambutol.

Etambutol Soln. C (10 µg/mL) µL	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Isoniazida Soln. G (1000 µg/mL) µL	Pirazinamida Soln. H (1750 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Muestras en sistema
40	-	50	30	100	780	400	50000	30000	175000	LIC

Conc.: Concentración, LIC: Límite Inferior de Cuantificación.

Tabla 18. Preparación de las muestras LIC en plasma para etambutol.

Muestras en sistema	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Etambutol Conc. en plasma (ng/mL)	Rifampicina Conc. en plasma (ng/mL)	Isoniazida Conc. en plasma (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en plasma (ng/mL)
LIC	400	50000	30000	175000	50	950	20	2500	1500	8750

Conc.: Concentración, LIC: Límite inferior de cuantificación.

NOTA: Al final de la preparación de las muestras en plasma, se adicionan 100 µL de ácido ascórbico al 5 % p/v, con la finalidad de evitar la degradación de rifampicina.

Tabla 19. Preparación de las muestras LIC en sistema para rifampicina.

Rifampicina Soln. E (100 µg/mL) µL	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Isoniazida Soln. G (1000 µg/mL) µL	Pirazinamida Soln. H (1750 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Muestras en sistema
20	20	30	100	830	2000	20000	30000	175000	LIC

Soln.: Solución, LIC: Límite Inferior de Cuantificación.

Tabla 20. Preparación de las muestras LIC en plasma para rifampicina.

Muestras en sistema	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Rifampicina Conc. en plasma (ng/mL)	Etambutol Conc. en plasma (ng/mL)	Isoniazida Conc. en plasma (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en plasma (ng/mL)
LIC	2000	20000	30000	175000	50	950	100	1000	1500	8750

Conc.: Concentración, LIC: Límite Inferior de Cuantificación.

NOTA: Al final de la preparación de las muestras en plasma, se adicionan 100 µL de ácido ascórbico al 5 % p/v, con la finalidad de evitar la degradación de rifampicina.

Tabla 21. Preparación de las muestras control de calidad en sistema en presencia de pirazinamida e isoniazida.

Etambutol Soln. C (10 µg/mL) µL	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. E (100 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Isoniazida Soln. G (1000 µg/mL) µL	Pirazinamida Soln. H (1750 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Muestras en sistema
120	-	60	-	30	100	100	690	1200	6000	30000	175000	CC Bajo
-	20	-	50	30	100	100	800	20000	50000	30000	175000	CC Medio
-	40	-	100	30	100	100	730	40000	100000	30000	175000	CC Alto

CC: Muestras Control de Calidad

Tabla 22. Preparación de las muestras control de calidad en plasma en presencia de pirazinamida e isoniazida.

Muestras en sistema	Etambutol Conc. en sistema (ng/mL)	Rifampicina Conc. en sistema (ng/mL)	Isoniazida Conc. en sistema (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Etambutol Conc. en plasma (ng/mL)	Rifampicina Conc. en plasma (ng/mL)	Isoniazida Conc. en plasma (ng/mL)	Pirazinamida Conc. en plasma (ng/mL)
CC Bajo	1200	6000	30000	175000	50	950	60	300	1500	8750
CC Medio	20000	50000	30000	175000	50	950	1000	2500	1500	8750
CC Alto	40000	100000	30000	175000	50	950	2000	5000	1500	8750

CC: Muestras Control de Calidad

NOTA: Al final de la preparación de las muestras en plasma, se adicionan 100 µL de ácido ascórbico al 5 % p/v, con la finalidad de evitar la degradación de rifampicina.

4.3.3. Adecuabilidad del sistema.

Con el fin de evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico y de llevar un monitoreo de la columna cromatográfica, se preparó una solución conteniendo 5.99 ng/mL de etambutol y 14.97 ng/mL de rifampicina y 5.27 ng/mL de memantina (E.I.) (solución AD1), de acuerdo a lo establecido anteriormente, dicha solución se dividió y almacenó en microtubos ámbar de 2 mL en congelación a -70°C . Previo a cada corrida analítica, se descongeló una de las alícuotas y se realizó un mínimo de 6 inyecciones consecutivas de 2 μL .

El sistema se consideró adecuado al cumplir con los parámetros señalados a continuación:

- Repetibilidad (relación de áreas) con un C. V. ≤ 5.0 %.
- Repetibilidad (tiempo de retención) con un C.V. ≤ 2.0 %.

4.3.4. Selectividad del sistema.

Antes de cada corrida se evaluó la selectividad del sistema, inyectándose en el orden siguiente: un blanco de reactivos, un doble blanco (muestra de matriz biológica sin la adición de los analitos de interés y sin el estándar interno) y el blanco (muestra de la matriz biológica con adición únicamente del estándar interno); estos últimos dos fueron procesados de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26), los cuales se analizaron en las condiciones cromatográficas establecidas. Así mismo, durante cada corrida, se evaluó el acarreamiento, inyectando al inicio, en medio y al final de la corrida una muestra de concentración alta (CC alto o LSC) seguida de un doble blanco y un blanco. En ninguno de los casos se debían presentar interferencias en el tiempo de retención de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.) o la interferencia debía ser $\leq 20\%$ de la respuesta analítica obtenida en el límite inferior de cuantificación para rifampicina y etambutol y $\leq 5\%$ con respecto a la respuesta promedio de memantina (E.I.).

4.3.5. Selectividad a la matriz biológica.

Para evaluar la selectividad a la matriz biológica, se analizaron seis plasmas de voluntarios sanos y la mezcla de éstos, las muestras se procesaron por

duplicado de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26). Se consideró selectivo el método analítico para los seis plasmas si estos no presentaban interferencias en el tiempo de retención de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.). Si se presentaban interferencias en los dobles blancos y blancos, estos no debían ser mayor al 5% comparada con la respuesta del estándar interno y no mayor al 20% con respecto a la respuesta mostrada por el límite inferior de cuantificación de etambutol y rifampicina .

También se determinó la selectividad del método a plasma lipémico y hemolizado, analizando por duplicado los plasmas anteriores, los cuales se procesaron de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26). El método analítico se consideró selectivo si estos no presentaban interferencias en el tiempo de retención de los picos de interés o si la interferencia endógena en los dobles blancos lipémicos y hemolizados utilizados, era menor o igual al 5% comparada con la respuesta del estándar interno y no mayor al 20% con respecto a la respuesta mostrada por el límite inferior de cuantificación de etambutol y rifampicina.

4.3.6. Selectividad a fármacos de uso común.

Se evaluó la selectividad del método contra posibles interferencias en el tiempo de retención de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.) analizando muestras de fármacos de uso común a las concentraciones plasmáticas reportadas, como paracetamol (20 µg/mL), naproxeno (100 µg/mL), ácido salicílico (300 µg/mL) y cafeína (80 µg/mL). También se evaluó la selectividad a isoniazida (3750 ng/mL) y pirazinamida (17500 ng/mL), ya que estos son fármacos que se administran conjuntamente con rifampicina y etambutol.

4.3.7. Selectividad del sistema (cross-talk o respuesta cruzada).

Para evaluar la selectividad del sistema de detección, se procesó un doble blanco, una muestra correspondiente al punto más alto de la curva de calibración para rifampicina y una muestra correspondiente al punto más alto para etambutol, ambas muestras sin estándar interno, una muestra conteniendo isoniazida a una concentración de 1500 ng/mL, una muestra conteniendo pirazinamida a una concentración de 8750 ng/mL y un blanco de

plasma. Las muestras se inyectaron de acuerdo a la siguiente secuencia de inyección:

- 1) Se inyectó el doble blanco de plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 2) Se inyectó la muestra plasmática que contiene sólo rifampicina y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 3) Se inyectó la muestra plasmática que contiene sólo etambutol y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 4) Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene memantina y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 5) Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene isoniazida y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 6) Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene pirazinamida y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 7) Se inyectó nuevamente el doble blanco de plasma plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 8) Se inyectó la muestra plasmática que contiene sólo rifampicina y se monitorean las señales de RIF, ETA y MEM.
- 9) Se inyectó nuevamente el doble blanco de plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 10) Se inyectó la muestra plasmática que contiene sólo etambutol y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 11) Se inyectó nuevamente el doble blanco de plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 12) Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene memantina y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.

- 13) Se inyectó nuevamente el doble blanco de plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 14) Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene isoniazida y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 15) Se inyectó nuevamente el doble blanco de plasma y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.
- 16) .Se inyectó la muestra plasmática que sólo contiene pirazinamida y se monitorearon las señales de RIF, ETA y MEM.

El criterio de aceptación para ésta prueba es que no debe aparecer respuesta (mayor al 5 % comparada con la respuesta del estándar interno y no mayor al 20% con respecto a la respuesta mostrada por el límite inferior de cuantificación de etambutol y rifampicina) en el tiempo de retención perteneciente a los analitos que están ausentes en cualquiera de las muestras analizadas.

4.3.8. Linealidad.

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes y se procesaron de acuerdo al método de extracción optimizado (ver Figura 26), utilizando las concentraciones de 100, 250, 500, 1200, 2250, 3500, 4500 y 6000 ng/mL de rifampicina y 20, 40, 150, 400, 800, 1250, 1750 y 2250 ng/mL de etambutol como se describe en las tablas 13 y 15.

La relación entre la respuesta cromatográfica (área) con respecto a la concentración en cada curva de calibración para cada analito, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, donde la variable “y” es la relación de áreas rifampicina/memantina (E. I.) o etambutol/memantina (E. I.) (según corresponda) obtenida para la concentración nominal de rifampicina o etambutol “x”. Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste en cada una de las cinco curvas para cada analito se obtenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al $\pm 15\%$

en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al $\pm 20\%$.

4.3.9. Repetibilidad de la curva de calibración.

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de la misma pesada, esto con el fin de evaluar la repetibilidad de la curva de calibración, de los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 3 determinaciones de cada nivel de concentración. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Con los resultados obtenidos de las tres curvas de esta prueba, se realizó el análisis de modelo de regresión como se indica a continuación:

- a) Se graficó el área relativa entre rifampicina/memantina (E.I.) y etambutol/memantina (E.I.) (y) versus su concentración nominal de etambutol y rifampicina (x), y se realizó un análisis de regresión lineal simple ajustando los datos a la ecuación $y = mx + b$, donde b es la ordenada al origen y m es la pendiente de la curva de calibración.
- b) Se determinó la concentración experimental (recuperada) introduciendo el área relativa obtenida en la ecuación de la línea recta generada para cada curva de calibración.
- c) Calcular el error relativo (%ER) mediante la siguiente ecuación.

$$ER \% = \frac{| \text{Concentración Recuperada} - \text{Concentración nominal} |}{\text{Concentración nominal}} \times 100$$

- d) Se graficó el error relativo (ER%) con respecto a la concentración nominal considerando las tres curvas de calibración evaluadas, para visualizar posibles tendencias y falta de ajuste de los datos. Los puntos deben estar distribuidos homogéneamente y formar una banda horizontal estrecha alrededor del eje de concentración. En el caso de desviaciones significativas de la banda horizontal, una

heterocedasticidad de los datos; por lo que se realizó un análisis de regresión lineal con alguna ponderación para el ajuste de los datos y se determinó nuevamente los valores de ER%.

- e) Se evaluaron al menos tres ponderaciones diferentes ($1/X$, $1/X^2$ y $1/Y$) y se sumó para cada ponderación, los valores absolutos del ER%, conjuntando todas las curvas de calibración, lo cual se definió como $\sum ER \%$.
- f) El mejor modelo matemático para el ajuste de los datos, fue aquel que proporcionó la $\sum ER \%$ global más baja.

4.3.10. Precisión del método.

La precisión del método fue evaluada como repetibilidad y reproducibilidad.

4.3.10.1. Repetibilidad muestras control de calidad.

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por sextuplicado las muestras plasmáticas control de calidad de rifampicina y etambutol: LIC, CC bajo, CC medio, CC alto y LSC, (ver preparación en Tabla 14 y 16), los cuales se procesaron de acuerdo al método de extracción optimizado (ver Figura 26), las muestras contenían también a los analitos isoniazida y pirazinamida a concentraciones equivalentes de su $C_{m\acute{a}x}$, con la finalidad de observar el efecto de la presencia de isoniazida y pirazinamida en la cuantificación de rifampicina y etambutol, tal y como se describe en la Tabla 21 y 22. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones en cada nivel. El coeficiente de variación no debió ser mayor al 15% (20% para el LIC).

4.3.10.2. Reproducibilidad muestras control.

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva de calibración de rifampicina y etambutol en plasma heparinizado y las muestras control de calidad CC bajo, CC medio y CC alto por sextuplicado durante tres días, empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente, las

muestras fueron procesadas de acuerdo al método de extracción optimizado (ver Figura 26).

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las muestras control de calidad (concentración recuperada), tomando en cuenta las determinaciones realizadas durante los tres días. El coeficiente de variación global no debió ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

4.3.11. Exactitud del método

La exactitud se evaluó tomando en cuenta el valor promedio en cada nivel de concentración de las determinaciones realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad de las muestras control de calidad debiendo estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente (20% para el límite inferior de cuantificación), para tal fin se determinó la desviación absoluta haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv Abs \%} = 100 \times \frac{|\text{Concentración nominal} - \text{Concentración Recuperada}|}{\text{Concentración nominal}}$$

4.3.12. Efecto matriz.

Para evaluar el efecto matriz (supresión iónica o incremento en la respuesta), se procesaron por duplicado por lo menos seis diferentes tipos de plasma de voluntarios sanos y de la mezcla de ellos, de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26). Se preparó un CC medio en sobrenadante de doble blanco precipitado, de acuerdo a la Tabla 23, 24 y 25, comparando la respuesta de esta contra la respuesta obtenida en la solución de adecuabilidad. El efecto de la matriz biológica se reportará en términos porcentuales para rifampicina, etambutol y memantina (E.I.). Será aceptable si se tiene un %C.V. de las áreas de los analitos en los diferentes plasmas evaluados menor al 15%.

4.3.13. Recobro.

Para la evaluación del recobro se prepararon y procesaron por sextuplicado las muestras control de calidad de rifampicina y etambutol en plasma heparinizado (CC bajo, CC medio y CC alto) y se compararon sus respuestas cromatográficas promedio (área de pico), con respecto al promedio del área

PARTE EXPERIMENTAL

obtenida de muestras en solución con los analitos de interés, preparadas a concentraciones equivalentes de acuerdo a las Tabla 23, 24 y 25.

El recobro no necesariamente debería ser del 100%, pero debía ser consistente en los niveles de concentración evaluados, además, los valores promedio individuales no deberían desviarse del promedio total en más del 15%.

En el caso de la evaluación del estándar interno (memantina), se determinó el recobro promedio total utilizando los 18 valores obtenidos en matriz biológica como en solución respectivamente (considerando la respuesta de ésta última como el 100%).

Tabla 23. Preparación de muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro.

Muestras en sistema	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de metanol CLAR (µL)	Etambutol Concentración en metanol (ng/mL)	Rifampicina Concentración en metanol (ng/mL)
CC Bajo	1200	6000	50	950	60	300
CC Medio	20000	50000	50	950	1000	2500
CC Alto	40000	100000	50	950	2000	5000

CC: Muestras Control de Calidad

Tabla 24. Preparación muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro (concentraciones reales).

Muestras en sistema	Etambutol Concentración en metanol (ng/mL)	Rifampicina Concentración en metanol (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Clorhidrato de Memantina (E.I.) Solución II (1000 ng/mL) (µL)	Volumen de Sobrenadante de dobles blancos precipitados* (µL)	Etambutol Concentración real en solución (ng/mL)	Rifampicina Concentración real en solución (ng/mL)	Clorhidrato de Memantina (E.I.) Concentración real en solución (ng/mL)
CC Bajo	60	300	50	40	600	4.348	21.739	57.971
CC Medio	1000	2500	50	40	600	72.464	181.159	57.971
CC Alto	2000	5000	50	40	600	144.928	362.319	57.971

CC: Muestras Control de Calidad

*Sobrenadante de dobles blancos precipitados: corresponde a la solución obtenida al final del procesamiento de una muestra doble blanco.

Tabla 25. Preparación muestras control de calidad en solución para evaluación de recobro (simulación de dilución post-precipitación).

Muestras en sistema	Etambutol Concentración real en solución (ng/mL)	Rifampicina Concentración real en solución (ng/mL)	Clohidrato de Memantina (E.I.) Concentración real en solución (ng/mL)	Alícuota de muestra post-precipitación (µL)	Volumen de Agente precipitante (µL)	Etambutol Concentración real final (ng/mL)	Rifampicina Concentración real final (ng/mL)	Clohidrato de Memantina (E.I.) Concentración real final (ng/mL)
CC Bajo	4.348	21.739	57.971	100	1000	0.395	1.976	5.270
CC Medio	72.464	181.159	57.971	100	1000	6.588	16.469	5.270
CC Alto	144.928	362.319	57.971	100	1000	13.175	32.938	5.270

Nota: Debido a que el método de extracción empleado fue una precipitación y que las muestras son sometidas a una dilución post-extracción, la muestra plasmática se diluyó 152 veces, por ello la concentración final real en sistema es 152 veces más diluida que la concentración inicial.

4.3.14. Límite de detección y límite inferior de cuantificación.

Para determinar estos parámetros se prepararon por sextuplicado, muestras de rifampicina a las concentraciones de 50 y 100 ng/mL y de etambutol a las concentraciones de 10 y 20 ng/mL en plasma heparinizado respectivamente, las cuales se procesaron e inyectaron en el sistema cromatográfico correspondiente.

La sensibilidad del método se definió como la concentración mínima cuantificable o límite inferior de cuantificación (LIC). Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. El promedio de estas muestras no debió desviarse más del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un CV $< 20\%$.

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

4.3.15. Estabilidad.

La prueba de estabilidad se llevó a cabo con el fin de determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que los compuestos de interés (rifampicina y etambutol) permanecen estables en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) de los compuestos por analizar en la matriz biológica.

Las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina y etambutol, en las diferentes condiciones evaluadas se considerarán estables, si los valores de concentración interpolada promedio obtenidos de las determinaciones en cada nivel de concentración se encuentran dentro del $\pm 15\%$ del valor obtenido con muestras control de calidad preparadas el día del análisis (controles frescos por sextuplicado)

Se realizó la evaluación de la estabilidad de los analitos: rifampicina y etambutol en plasma en las condiciones a continuación descritas:

4.3.15.1. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.

Para realizar la evaluación, se prepararon por sextuplicado una serie de muestras plasmáticas conteniendo rifampicina (a las concentraciones de 300, 2500 y 5000 ng/mL) y etambutol (a las concentraciones de 60, 1000 y 2000 ng/mL) y se almacenaron en congelación a -70°C. En cada uno de los ciclos evaluados se descongelaron las seis muestras de cada nivel de concentración y se dosificaron 50 µL para la cuantificación, para nuevamente congelar a -70°C; se realizó de esta manera hasta cumplir con cuatro ciclos, dejando un período mínimo de 12 horas entre cada ciclo.

4.3.15.2. Estabilidad a temperatura ambiente (15–30 °C).

La estabilidad se evaluó preparando por sextuplicado una serie de muestras plasmáticas a las concentraciones de 300, 2500 y 5000 ng/mL de rifampicina y 60, 1000 y 2000 ng/mL de etambutol y almacenando las muestras a temperatura ambiente (15-30°C), para posteriormente procesar las muestras a las 4, 5 y 24 horas de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26).

4.3.15.3. Estabilidad en refrigeración (2–8 °C).

Se prepararon por sextuplicado una serie de muestras plasmáticas a las concentraciones de 300, 2500 y 5000 ng/mL de rifampicina y 60, 1000 y 2000 ng/mL de etambutol y se almacenaron en refrigeración (2-8°C). El procesamiento de muestras se realizó a las 4, 5 y 24 horas de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26).

4.3.15.4. Estabilidad de la muestra procesada.

La estabilidad de la muestra procesada se determinó preparando por sextuplicado las muestras control de calidad de rifampicina y etambutol en plasma heparinizado (CC bajo, CC medio y CC alto), las cuales se sometieron al método de extracción establecido (ver Figura 26) y fueron inyectadas al sistema cromatográfico. Las muestras se almacenaron en el automuestreador (8°C) y se inyectaron de nuevo a las 24 y 48 horas después de su procesamiento.

4.3.15.5. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 336 días.

Para la realización de esta estabilidad, se prepararon series de muestras plasmáticas conteniendo rifampicina (a las concentraciones de 300, 2500 y 5000 ng/mL) y etambutol (a las concentraciones de 50, 850 y 1700 ng/mL), y se almacenaron en congelación a -70°C por 336 días. Una vez transcurrido el periodo de tiempo se procesaron las muestras de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26).

La preparación de muestras se realizó conforme a lo indicado en las Tabla 14 y 16.

4.3.15.6. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 281 días, en presencia de isoniazida y pirazinamida a concentraciones de 8750 y 1500 ng/mL respectivamente.

Para la realización de esta estabilidad, se prepararon series de muestras plasmáticas conteniendo rifampicina (a las concentraciones de 300, 2500 y 5000 ng/mL) y etambutol (a las concentraciones de 60, 1000 y 2000 ng/mL), conteniendo también isoniazida (a la concentración de 1500 ng/mL) y pirazinamida (a la concentración de 8750 ng/mL), ver preparación de estas muestras en las Tabla 21 y 22. Las muestras fueron almacenadas en congelación a -70°C por 281 días. Una vez transcurrido el periodo de tiempo se procesaron las muestras de acuerdo al método de extracción establecido (ver Figura 26).

4.3.16. Integridad de la dilución

4.3.16.1. Concentración dentro de la curva de calibración 5000 ng/mL de rifampicina y 2000 ng/mL de etambutol (IDD).

Se preparó por sextuplicado la muestra IDD indicada en las Tabla 26 y 27, y se aplicó el proceso de extracción empleando 25 µL de muestra, completando a un volumen de 50 µL con plasma libre de fármaco. La concentración

interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del 15% con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al 15%.

4.3.16.2. Concentración fuera de la curva de calibración 10000 ng/mL de rifampicina y 4000 ng/mL de etambutol (IDF).

Se preparó por sextuplicado la muestra IDF indicada en la Tabla 26 y en la Tabla 27, y se aplicó el proceso de extracción empleando 25 μ L de la muestra y se completó el volumen a 50 μ L con plasma libre de fármaco. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del 15% con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al 15%.

Tabla 26. Preparación de muestras para evaluar integridad de la dilución en sistema con un factor de dilución de 2.

	Etambutol Soln. A (1000 µg/mL) µL	Rifampicina Soln. D (1000 µg/mL) µL	Volumen de Metanol (µL)	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)
IDD	40	100	860	40000	100000
IDF	80	200	720	80000	200000

IDD: Integridad de la dilución dentro de la curva de calibración, IDF: Integridad de la dilución fuera de la curva de calibración

Tabla 27. Preparación de muestras para evaluar integridad de la dilución en plasma con un factor de dilución de 2.

Muestras en sistema	Etambutol Concentración en sistema (ng/mL)	Rifampicina Concentración en sistema (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Etambutol Concentración en plasma (ng/mL)	Rifampicina Concentración Final en plasma (ng/mL)
IDD	40000	100000	50	950	2000	5000
IDF	80000	200000	50	950	4000	10000

IDD: Integridad de la dilución dentro de la curva de calibración, IDF: Integridad de la dilución fuera de la curva de calibración

4.3.17. Tolerancia del método analítico

4.3.17.1. Tolerancia a plasma lipémico.

Para la evaluación se prepararon, procesaron y cuantificaron por sextuplicado las muestras plasmáticas control de calidad de rifampicina y etambutol: CC bajo, CC medio y CC alto, utilizando plasma lipémico. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones (de cada analito) en cada nivel. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

4.3.17.2. Tolerancia a plasma hemolizado.

Para la evaluación se prepararon, procesaron y cuantificaron por sextuplicado las muestras plasmáticas control de calidad de rifampicina y etambutol: CC bajo, CC medio y CC alto, utilizando plasma hemolizado. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones (de cada analito) en cada nivel. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

4.3.17.3. Tolerancia al cambio en la temperatura de la columna cromatográfica 50 °C.

Para la evaluación se preparó una curva de calibración y las muestras control de calidad CC bajo, CC medio y CC alto por sextuplicado, de acuerdo a lo establecido en las Tabla 14 y 16. Las muestras se procesaron y cuantificaron, modificando la temperatura de horno de la columna de 45 a 50°C. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones en cada nivel. El método será tolerante si al comparar las concentraciones recuperadas promedio en la condición de cambio con respecto a la original, no se presenta una desviación absoluta mayor al 15%.

4.3.17.4. Tolerancia a la presencia de isoniazida y pirazinamida.

Para la evaluación se prepararon por sextuplicado muestras conteniendo rifampicina (300, 2500 y 5000 ng/mL) y etambutol (60, 1000 y 2000 ng/mL), conteniendo también isoniazida (1500 ng/mL) y pirazinamida (8750 ng/mL) con la finalidad de observar el efecto de la presencia de éstos analitos en la cuantificación de rifampicina y etambutol (ver preparación de muestras en las Tabla 21 y 22

De la misma manera y con el mismo objetivo, se prepararon muestras correspondientes al LIC (100 ng/mL) de rifampicina por sextuplicado y se compararon con muestras a la misma concentración conteniendo también etambutol, isoniazida y pirazinamida a concentraciones correspondientes a sus $C_{m\acute{a}x}$ (1000, 1500 y 8750 ng/mL) respectivamente (ver preparación de muestras en las Tabla 19 y 20). Para etambutol se prepararon muestras correspondientes al LIC (20ng/mL) por sextuplicado y se compararon con muestras a la misma concentración conteniendo también rifampicina, isoniazida y pirazinamda a concentraciones correspondientes a sus $C_{m\acute{a}x}$ (2500, 1500 y 8750 ng/mL) respectivamente (ver preparación de muestras en las Tabla 17 18).

Se consideró que la presencia de isoniazida y pirazinamida en las muestras control de calidad, no afectaba la cuantificación de rifampicina y etambutol, si la desviación absoluta (%) de su concentración interpolada promedio no es mayor al 15% con respecto a la concentración interpolada promedio de las muestras sin analitos concominantes (isoniazida y pirazinamida). Para las muestras de LIC de rifampicina en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida, se consideró que la presencia de los analitos concominantes no afectaba en la cuantificación, si la desviación absoluta (%) de su concentración interpolada promedio no es mayor al 20 % con respecto a la concentración interpolada promedio de las muestras sin analitos concominantes (etambutol, isoniazida y pirazinamida). Para las muestras de LIC de etambutol en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida, se consideró que la presencia de los analitos concominantes no afectaba en la cuantificación, si la desviación absoluta (%) de su concentración interpolada promedio no es mayor al 20 %

PARTE EXPERIMENTAL

con respecto a la concentración interpolada promedio de las muestras sin analitos concominantes (rifampicina, izonizida y pirazinamida).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Desarrollo del método analítico.

El equipo utilizado durante el desarrollo y validación del método analítico fue un LC-MS/MS modelo API 5000 de AB-SCIEX.

5.1.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno.

Las condiciones óptimas del detector para la cuantificación de rifampicina y etambutol se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Condiciones finales de detección.

Condiciones de interface:			
Collision Gas (L/min)	8		
Curtain Gas (psi)	40		
Ion Source Gas 1 (psi)	50		
Ion Source Gas 2 (psi)	50		
Ion Spray Voltage (volts)	4500		
Temperature (°C)	400		
Interface Heater	On		
Condiciones de las señales:			
	Rifampicina	Etambutol	Memantina (EI)
Interface	Turbo Spray	Turbo Spray	Turbo Spray
Polaridad	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Precursor Ion	823.4	205.3	180.2
Product Ion	791.4	116.2	163.2
Dwell	200	200	200
DP (volts)	80	50	65
EP (volts)	10	10	9
CE (volts)	24	20	22
CXP (volts)	19	12	20

5.1.2. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas que mejor cumplieron con los parámetros anteriores se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Condiciones cromatográficas finales.

Columna	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm 5 µm
Fase Móvil	Ácetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1% : acetonitrilo grado cromatográfico (10:90 v/v)
Fase de lavado	Ácetato de amonio 10 mM con ácido fórmico 0.1% : acetonitrilo grado cromatográfico (10:90 v/v)
Velocidad de Flujo	0.6 mL/min
Volumen de inyección	2 µL
Temperatura columna	45 °C
Temp. automuestreador	8 °C
Tiempo de retención aproximado	Etambutol 2.2 min Rifampicina 2.7 min Memantina (E.I.) 2.4 min

5.1.3. Método de extracción.

El método de extracción que se describe a continuación presentó los mejores resultados(ver Figura 26).

NOTA: Las muestras deben ser procesadas en condiciones especiales (área con iluminación amarilla).

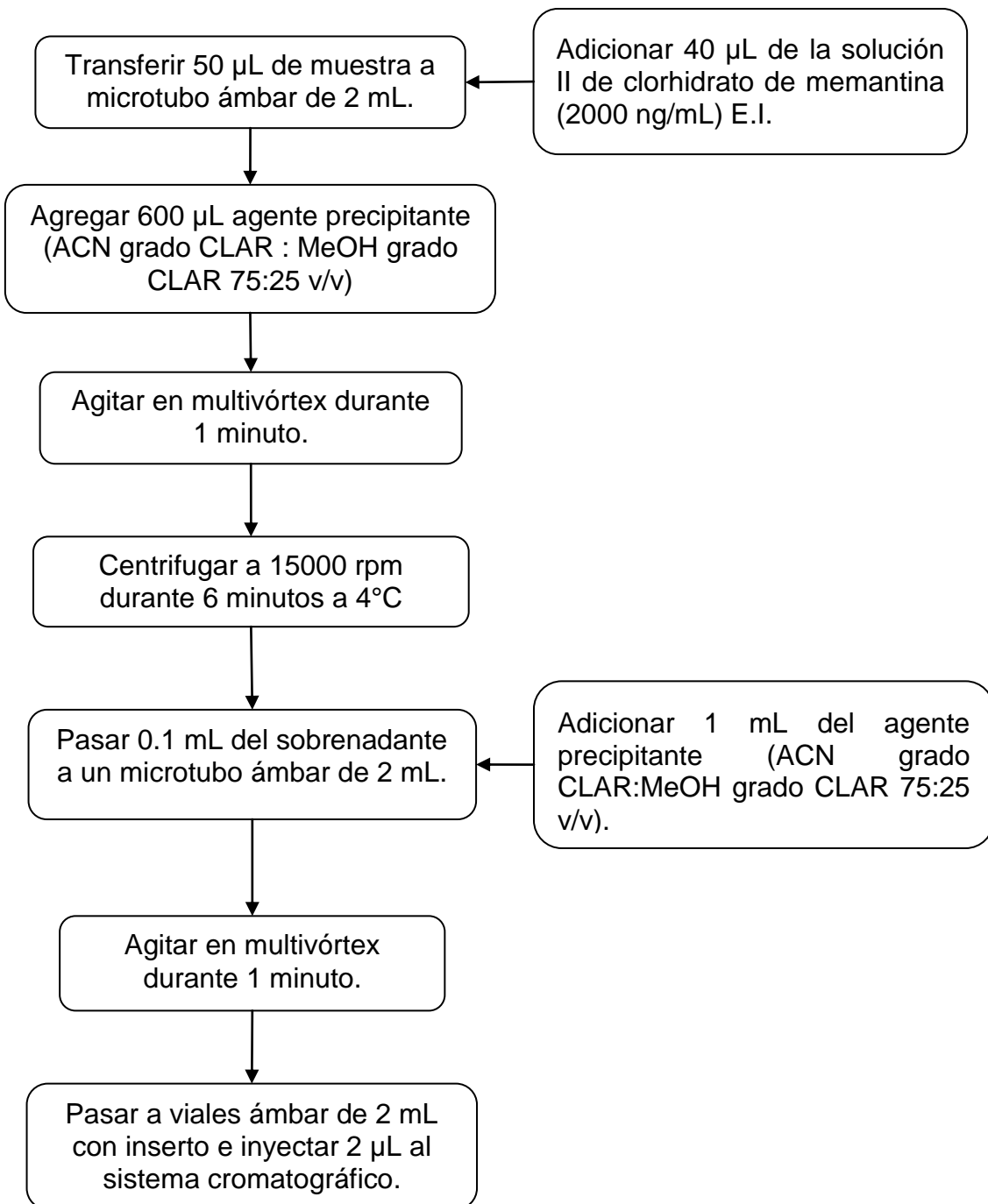


Figura 26. Diagrama del método de extracción para rifampicina y etambutol en plasma.

5.2. Resultados de validación.

5.2.1. Adecuabilidad del sistema.

A continuación se presentan los resultados de adecuabilidad obtenidos en las corridas que se llevaron a cabo durante la validación del método (ver Tabla 30 y 31). Los resultados de adecuabilidad de rifampicina y etambutol para cada analito y corrida, cumplieron con los criterios establecidos al tener un área relativa con un C.V. menor al 5% y un C.V. menor al 2 % en el tiempo de retención.

Tabla 30. Resultados de la adecuabilidad del sistema para las corridas de validación de rifampicina.

Número de corrida	Rifampicina			Memantina (E.I.)			Área Relativa	C.V.% Área Relativa
	Promedio Área N=6	Promedio Tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de Retención	Promedio Área N=6	Promedio Tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de Retención		
1	602576.451	2.702	0.120	756974.567	2.355	0.139	0.796	2.180
2	558267.463	2.700	0.049	700276.202	2.363	0.066	0.798	1.760
3	534071.133	2.703	0.049	720080.792	2.375	0.049	0.742	0.797
4	582930.598	2.705	0.030	765311.219	2.389	0.043	0.762	1.417
5	596167.374	2.707	0.065	645105.467	2.401	0.055	0.924	1.670
6	721396.887	2.707	0.054	638792.008	2.416	0.057	1.130	1.998
7	721940.509	2.704	0.073	855159.902	2.420	0.072	0.844	2.262
8	777110.566	2.706	0.045	974288.672	2.428	0.064	0.798	1.860
9	505354.163	2.713	0.066	516809.445	2.450	0.050	0.978	2.073
10	683518.286	2.713	0.063	650435.149	2.477	0.061	1.051	1.298

Tabla 31. Resultados de la adecuabilidad del sistema para las corridas de validación de etambutol.

Número de corrida	Etambutol			Memantina (E.I.)			Área Relativa	C.V.% Área Relativa
	Promedio Área N=6	Promedio Tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de Retención	Promedio Área N=6	Promedio Tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de Retención		
1	650039.412	2.173	0.139	756974.567	2.355	0.139	0.859	2.116
2	542459.718	2.174	0.063	700276.202	2.363	0.066	0.775	2.207
3	708376.631	2.195	0.047	765311.219	2.389	0.043	0.926	4.313
4	697818.126	2.197	0.062	645105.467	2.401	0.055	1.081	1.087
5	522223.944	2.207	0.025	638792.008	2.416	0.057	0.817	2.775
6	646778.922	2.203	0.080	855159.902	2.420	0.072	0.757	2.700
7	980176.169	2.207	0.053	974288.672	2.428	0.064	1.006	3.158
8	405692.193	2.221	0.081	516809.445	2.450	0.050	0.785	3.428
9	798953.078	2.246	0.098	650435.149	2.477	0.061	1.229	3.229

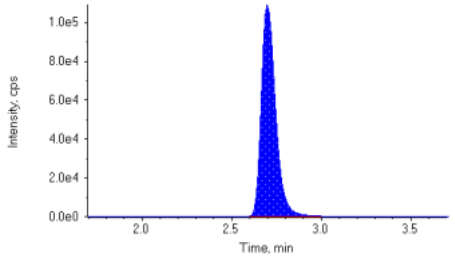
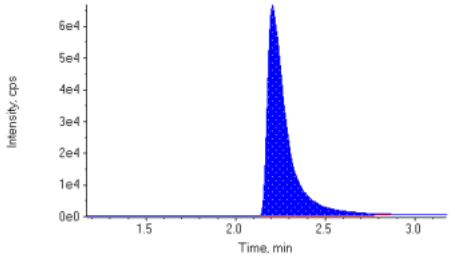
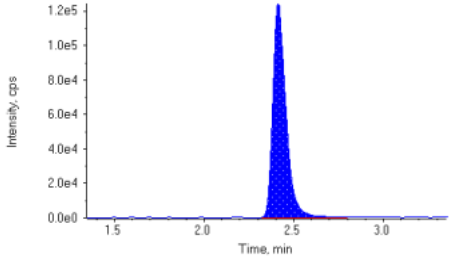
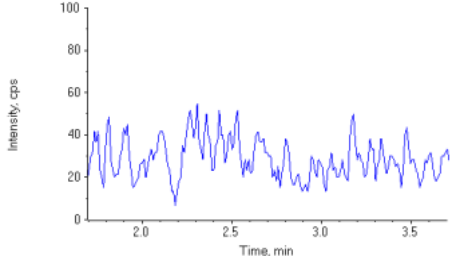
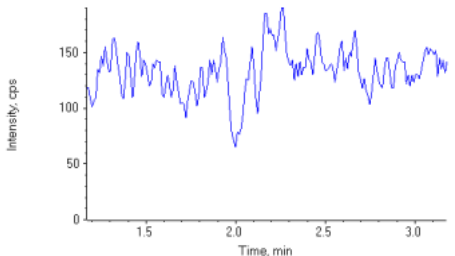
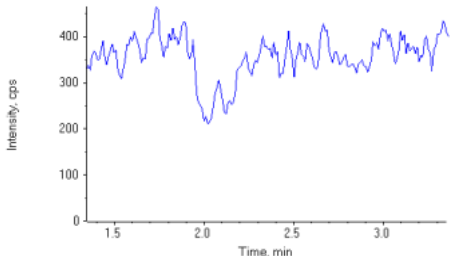
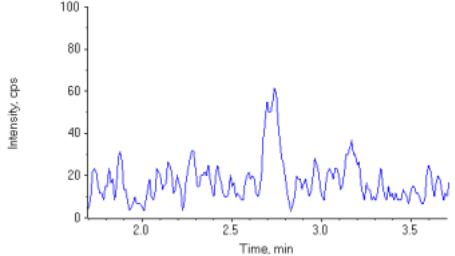
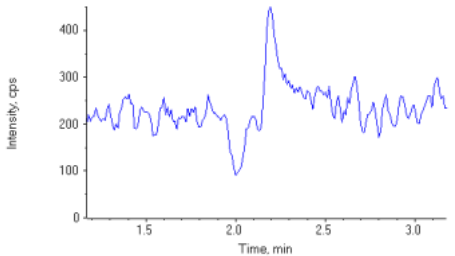
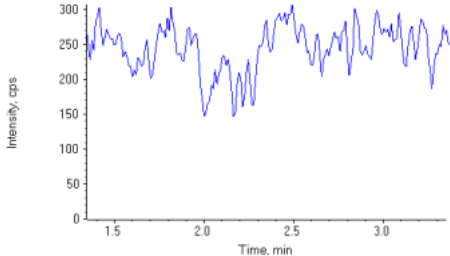
5.2.2. Selectividad del sistema.

Se demostró la selectividad del sistema antes de cada corrida, al no presentarse interferencias en el tiempo de retención de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.). Así mismo no se presentó acarreamiento por parte del sistema durante la corrida analítica.

5.2.3. Selectividad a la matriz biológica y fármacos de uso común.

El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias con los picos de interés (rifampicina, etambutol y E.I.). Ver Figura 27.

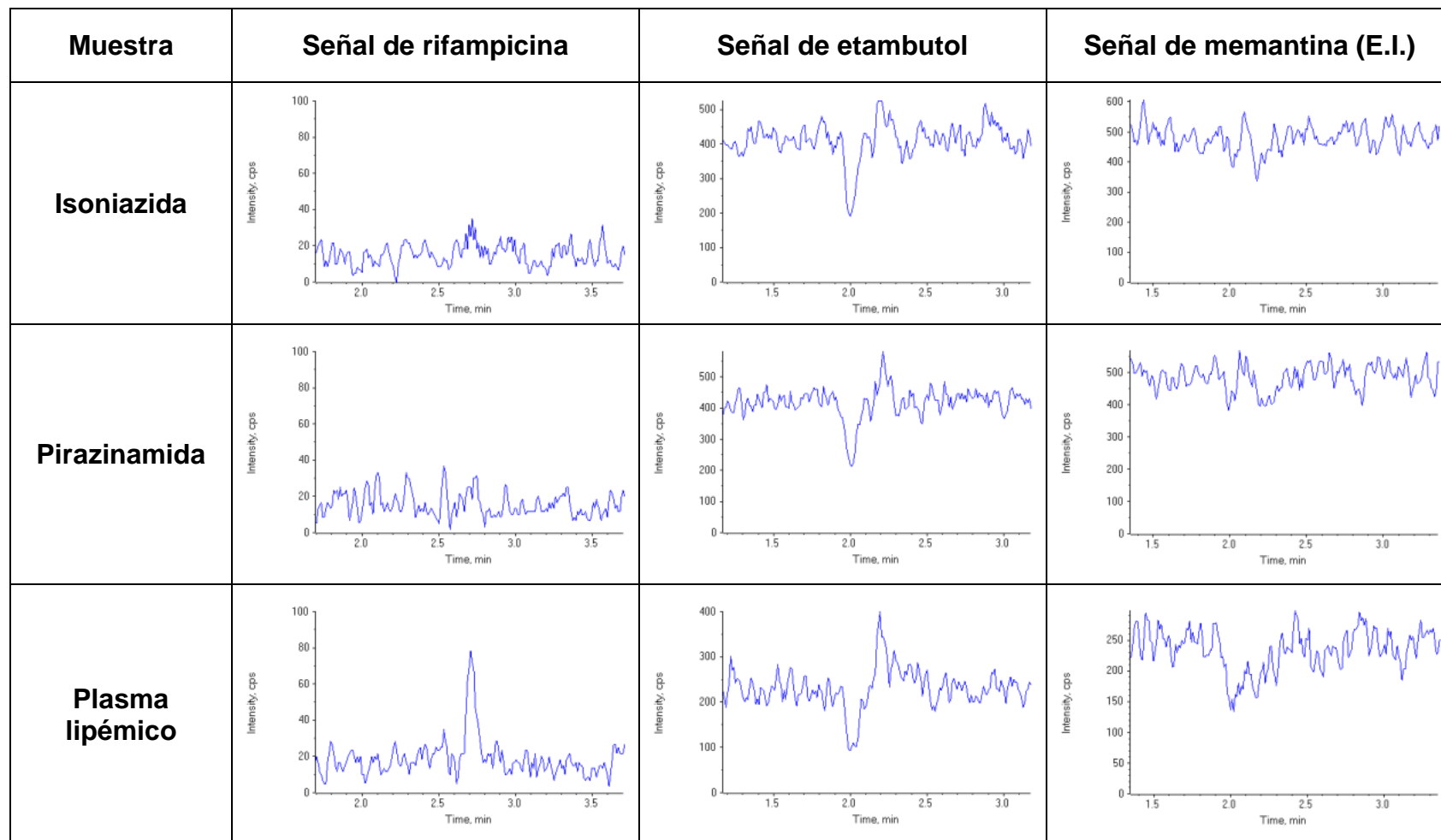
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
Adecuabilidad			
Doble blanco			
Ácido salicílico			

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
Paracetamol			
Naproxeno			
Cafeína			

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



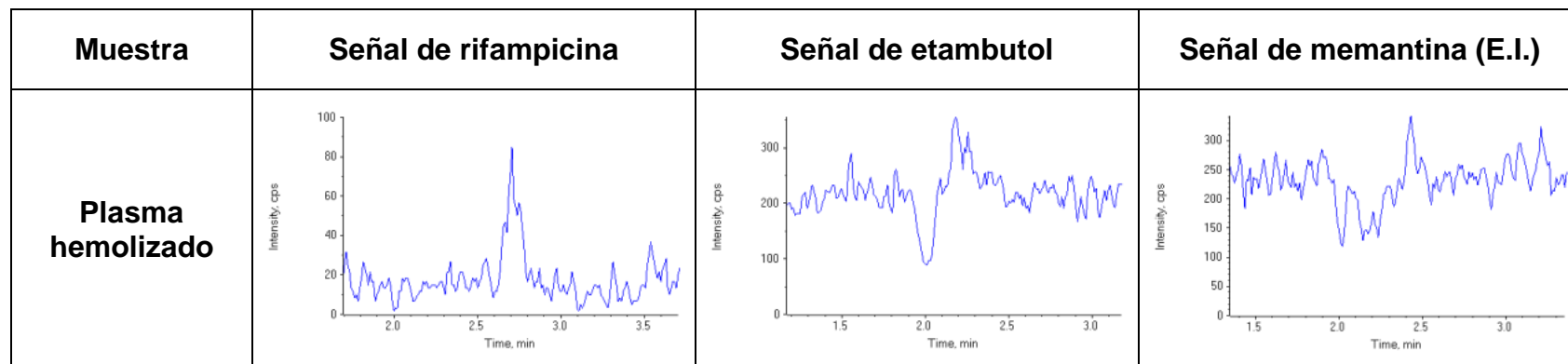


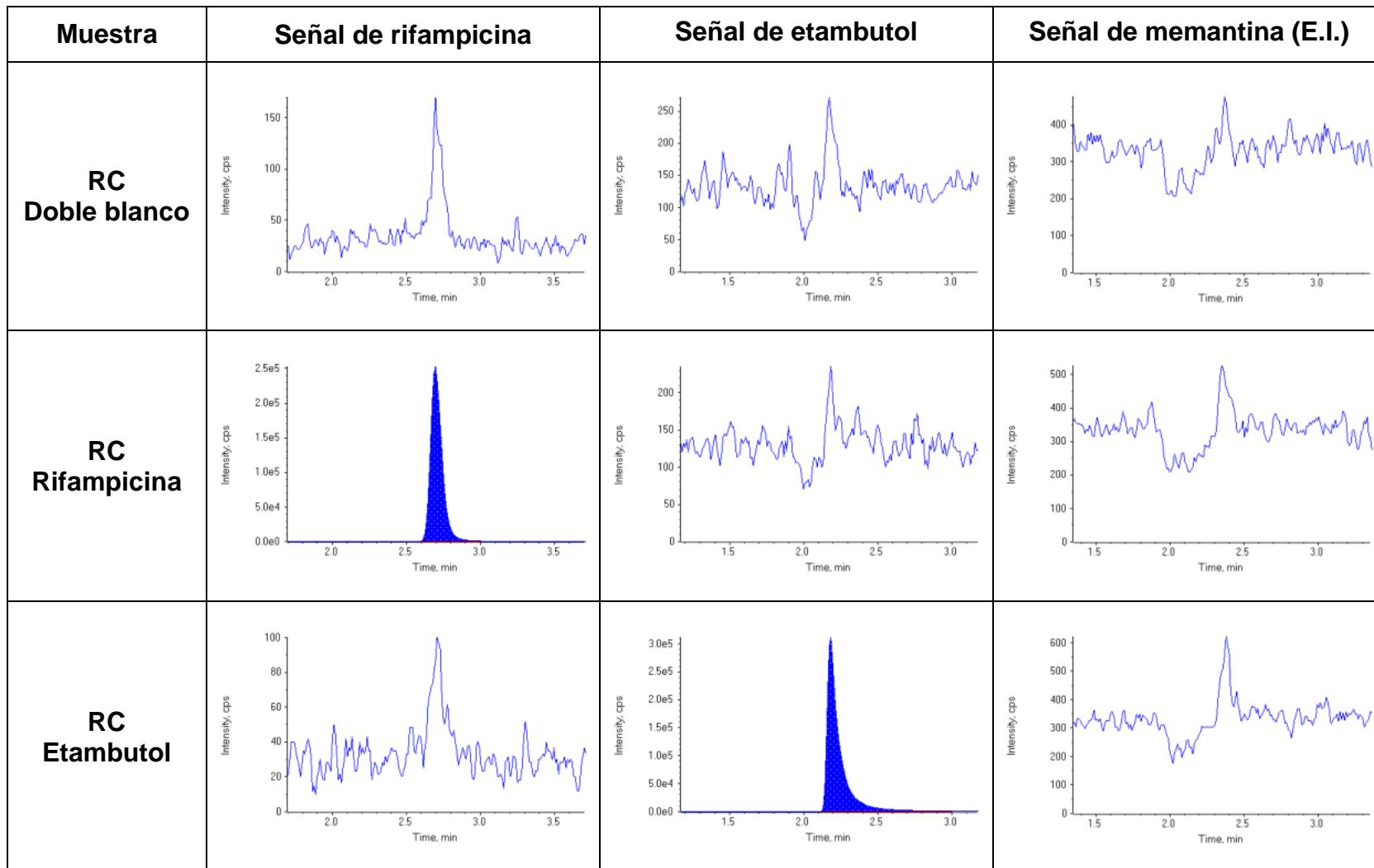
Figura 27. Selectividad del método para fármacos de uso común, concomitantes, plasma lipémico y hemolizado para rifampicina, etambutol y memantina (E.I.).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

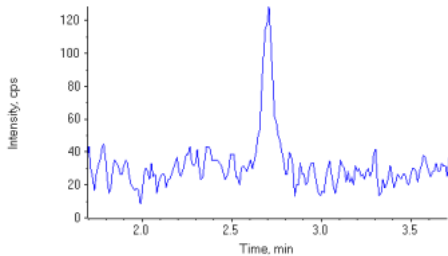
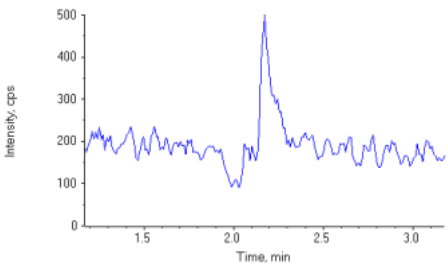
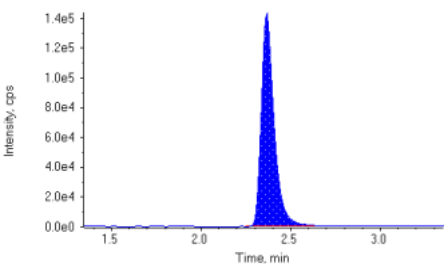
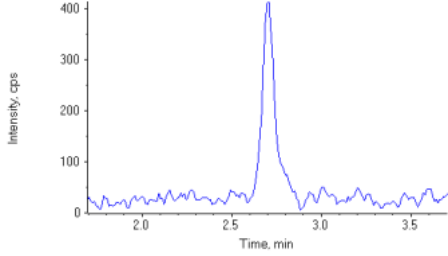
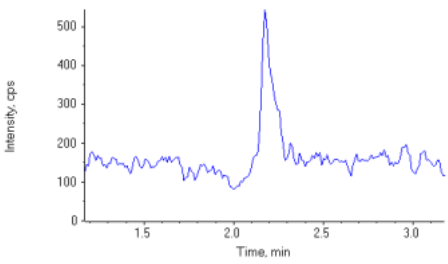
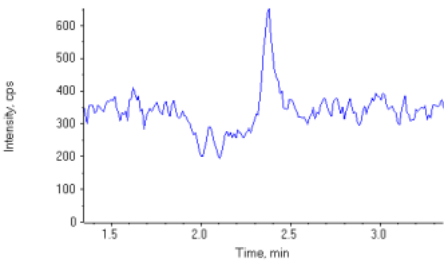
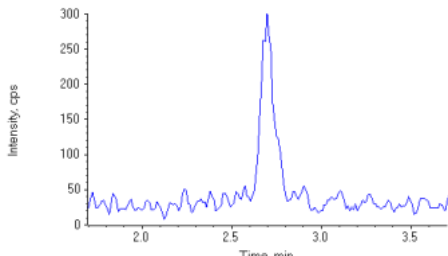
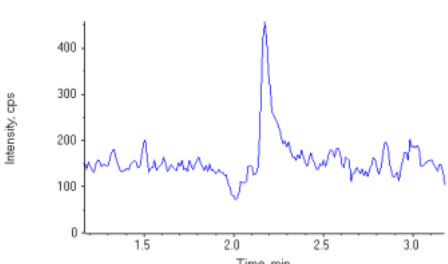
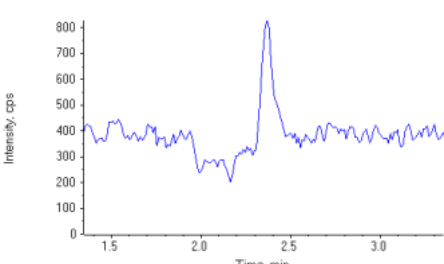
5.2.4. Respuesta cruzada de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.).

Las interferencias mostradas, no deben ser mayor al 5% comparada con la respuesta del estándar interno y no mayor al 20% con respecto a la respuesta mostrada por el límite inferior de cuantificación y en éste caso no se mostró interferencia significativa en los tiempos de retención de los analitos ausentes en cualquiera de las muestras evaluadas. Ver Figura 28.

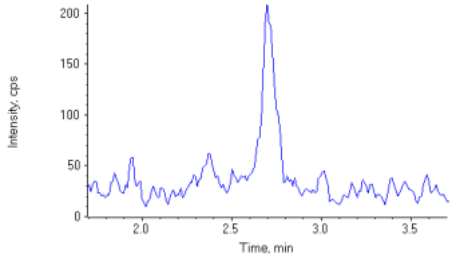
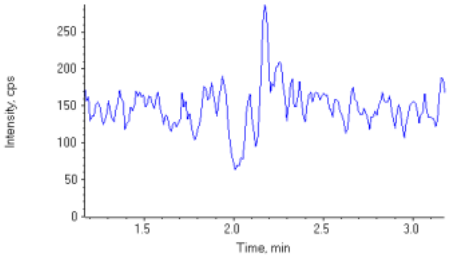
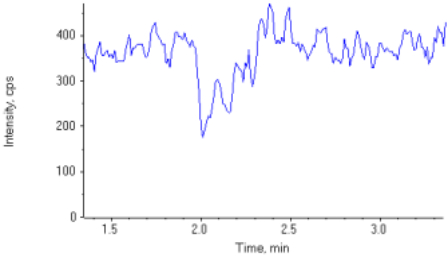
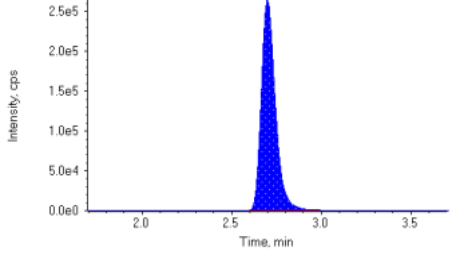
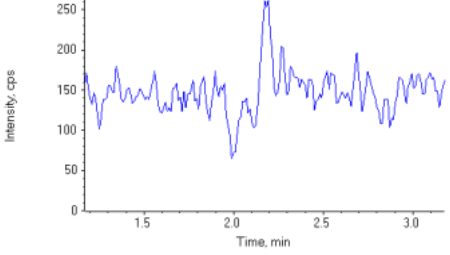
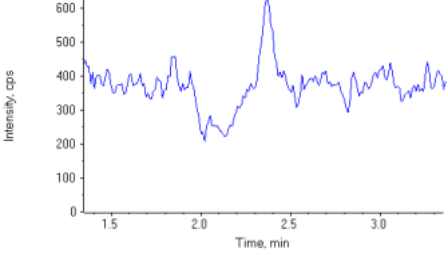
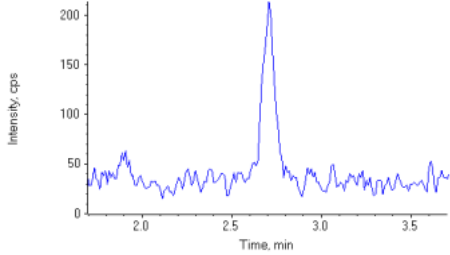
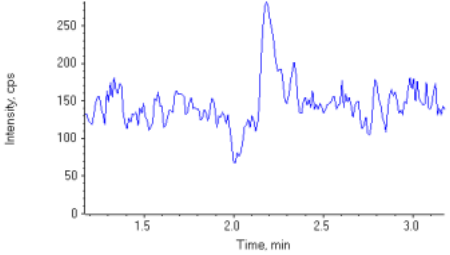
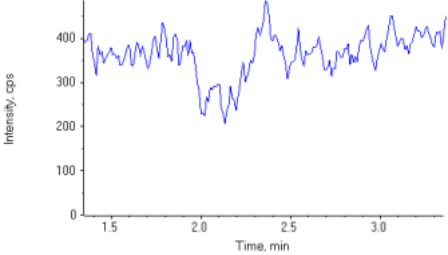
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



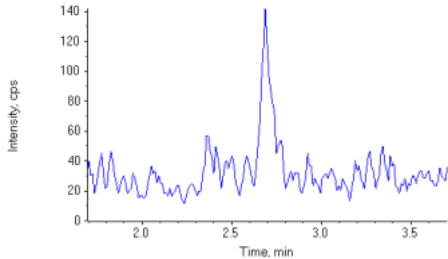
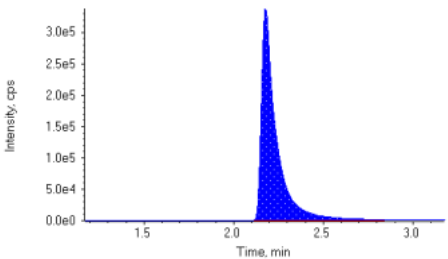
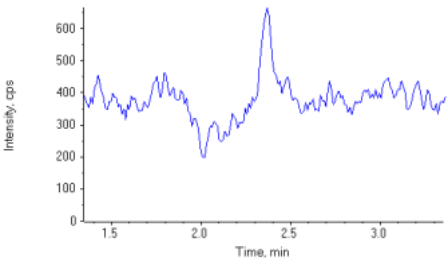
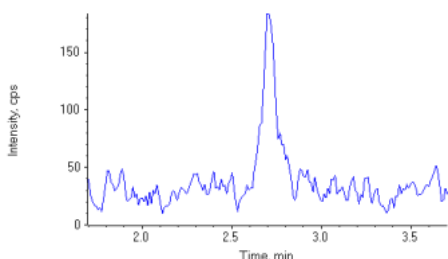
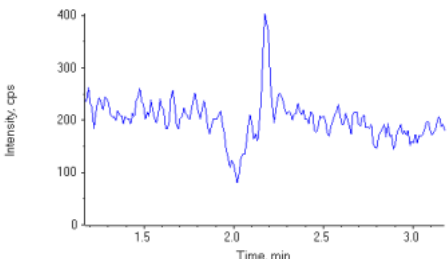
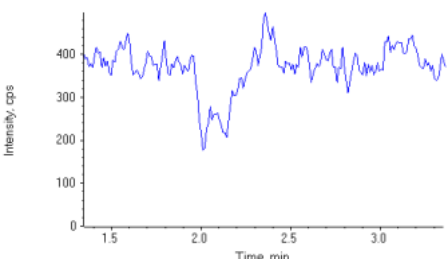
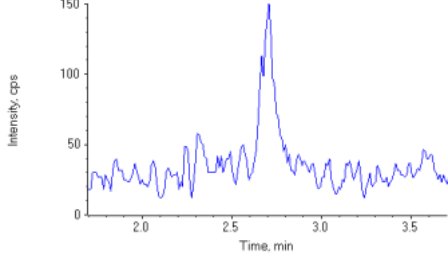
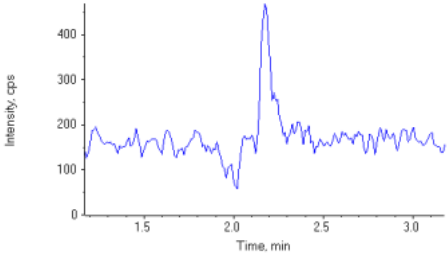
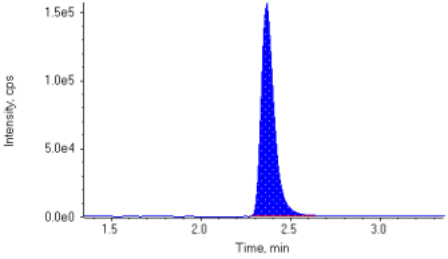
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
RC Memantina (E.I.)			
RC Isoniazida			
RC Pirazinamida			

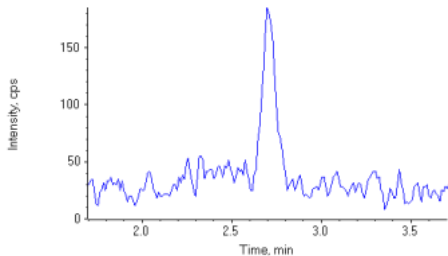
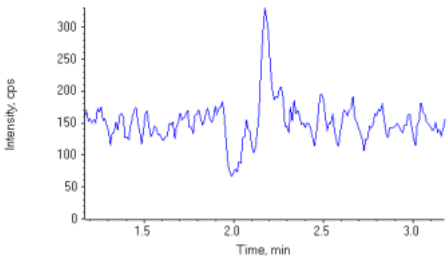
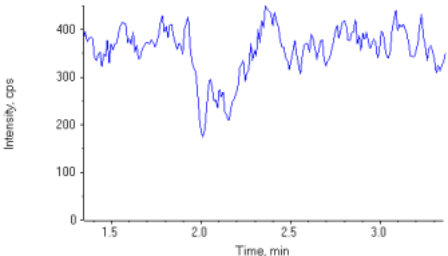
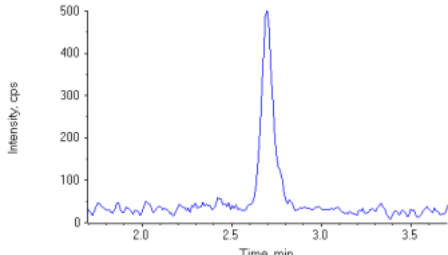
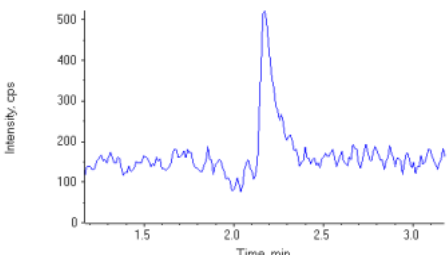
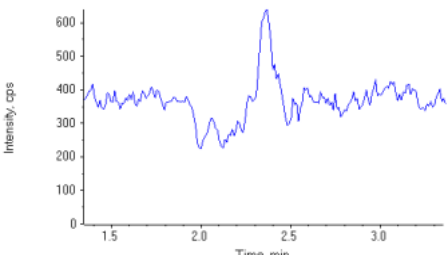
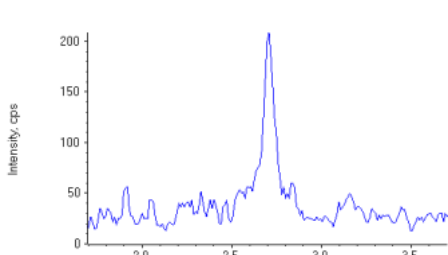
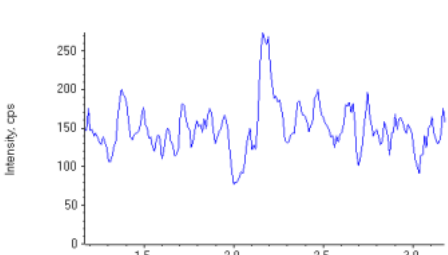
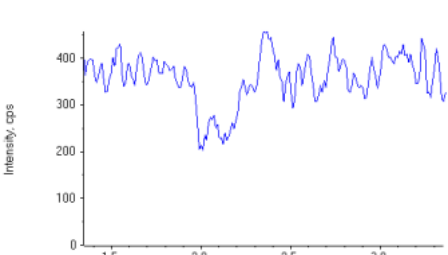
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
<p style="text-align: center;">RC Doble blanco</p>			
<p style="text-align: center;">RC Rifampicina</p>			
<p style="text-align: center;">RC Doble blanco</p>			

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
RC Etambutol	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>
RC Doble blanco	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>
RC Memantina (E.I.)	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>	 <p>Intensity, cps</p> <p>Time, min</p>

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra	Señal de rifampicina	Señal de etambutol	Señal de memantina (E.I.)
<p style="text-align: center;">RC Doble blanco</p>			
<p style="text-align: center;">RC Isoniazida</p>			
<p style="text-align: center;">RC Doble blanco</p>			

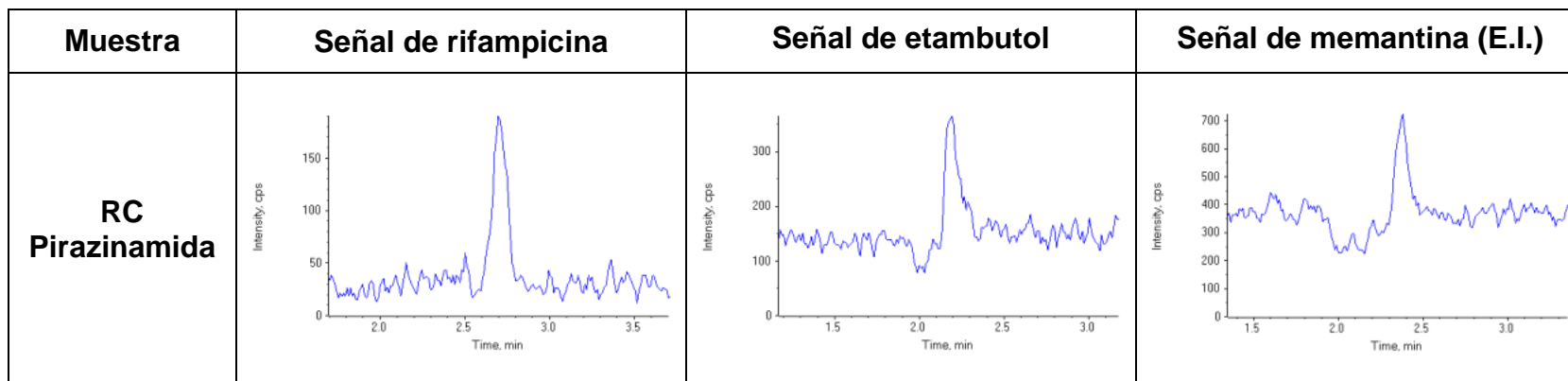


Figura 28. Respuesta cruzada (RC) para rifampicina, etambutol, memantina (E.I.).

5.2.5. Linealidad del método para rifampicina.

La relación entre la respuesta cromatográfica (área) y la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ajuste $1/x^2$ (este modelo matemático fue el mejor para el ajuste de los datos, al presentar la $\sum ER$ % global más baja), donde la variable "y" es la respuesta analítica (relación de áreas de rifampicina/memantina (E.I.)) obtenida para su respectiva concentración nominal "x" de rifampicina. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación 5 curvas de la validación del método analítico.

El método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 100 a 6000 ng/mL; todos los valores de "r" obtenidos fueron mayores a 0.99. En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir C.V. % y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite inferior de cuantificación. La Tabla 32 muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de rifampicina en plasma.

Tabla 32. Resultados de la linealidad del método para cuantificar rifampicina en plasma (concentración recuperada).

Concentración (ng/mL)	100	250	500	1200	2250	3500	4500	6000
Curva 1	100.318	249.352	481.603	1176.084	2298.423	3711.505	4692.908	5461.194
Curva 2	99.529	254.523	479.842	1202.032	2281.890	3572.338	4455.919	5874.436
Curva 3	100.524	246.331	493.027	1176.981	2226.925	3558.747	4503.585	6084.704
Curva 4	98.654	251.472	518.169	1185.077	2323.805	3489.957	4403.102	5724.883
Curva 5	99.658	246.654	515.259	1158.980	2328.818	3526.446	4279.147	6035.044
Promedio	99.737	249.666	497.580	1179.831	2291.972	3571.799	4466.932	5836.052
D. E.	0.738	3.433	18.215	15.631	41.065	84.326	151.548	252.872
C. V. (%)	0.740	1.375	3.661	1.325	1.792	2.361	3.393	4.333
Desv. Abs. (%)	0.001	0.131	0.221	1.421	2.135	2.322	0.472	2.475
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	80.0-120.0	212.5-287.5	425.0-575.0	1020.0-1380	1912.5-2587.5	2975.0-4025.0	3825.0-5175.0	5100.0-6900.0

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 33. Parámetros de linealidad del método para cuantificar rifampicina en plasma.

	Pendiente	Ordenada	R
Curva 1	0.00031	0.0014	0.9985
Curva 2	0.00031	0.0007	0.9997
Curva 3	0.00029	0.0016	0.9999
Curva 4	0.00029	-0.0004	0.9995
Curva 5	0.00034	0.0032	0.9994
Promedio	0.00031		
D. E.	0.00002		
C. V. (%)	6.826		

Nota: Todos los resultados reportados en la tabla anterior se obtuvieron de resultados generados por el paquete computacional Analyst® con un ajuste $1/x^2$.

En la Figura 29 se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las 5 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta (relación de áreas) de rifampicina/memantina (E.I.).

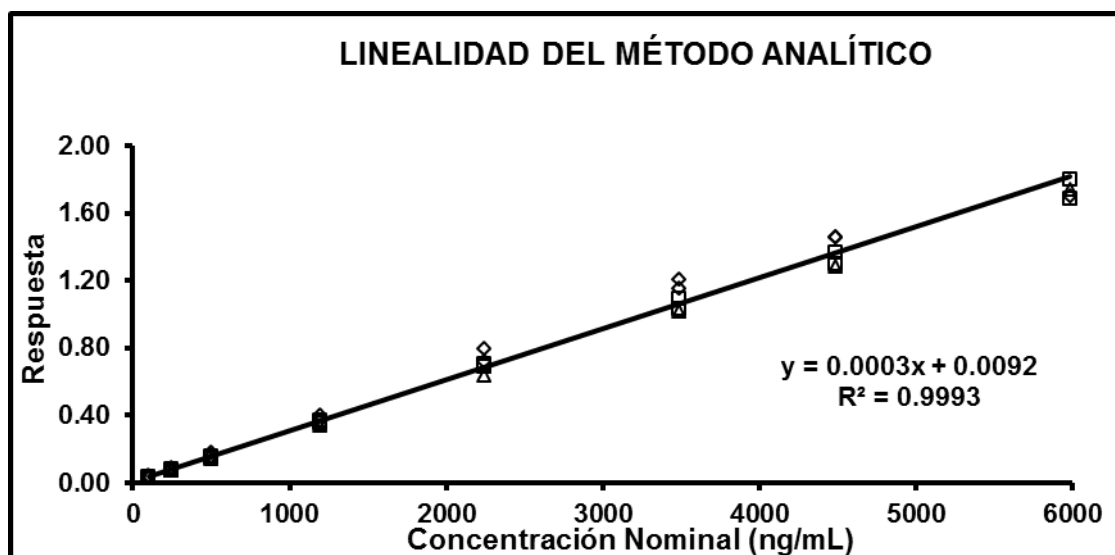


Figura 29. Linealidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.

5.2.6. Linealidad del método para etambutol.

La relación entre la respuesta cromatográfica (área) y la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ajuste $1/x^2$ (este modelo matemático fue el mejor para el ajuste de los datos, al presentar la $\sum ER$ % global más baja), donde la variable “y” es la respuesta analítica (relación de áreas de etambutol/memantina (E.I.)) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de etambutol. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación 5 curvas de la validación del método analítico.

El método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 20 a 2250 ng/mL; todos los valores de "r" obtenidos fueron mayores a 0.99. En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir C.V. % y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite inferior de cuantificación. La Tabla 34 muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de etambutol en plasma.

Tabla 34. Resultados de la linealidad del método para cuantificar etambutol en plasma (concentración recuperada).

Concentración (ng/mL)	20	40	150	400	800	1250	1750	2250
Curva 1	20.225	38.780	147.781	393.980	793.764	1308.963	1795.882	2147.958
Curva 2	19.403	42.145	146.412	397.871	809.164	1298.054	1732.543	2107.553
Curva 3	19.558	41.072	152.575	404.670	812.595	1236.697	1697.015	2166.244
Curva 4	19.518	41.217	153.970	397.137	802.082	1250.410	1660.895	2235.343
Curva 5	19.969	40.178	142.440	383.288	876.480	1204.628	1763.516	2235.094
Promedio	19.735	40.678	148.636	395.389	818.817	1259.750	1729.970	2178.438
D. E.	0.348	1.270	4.691	7.807	33.033	43.435	53.230	56.014
C. V. (%)	1.762	3.122	3.156	1.974	4.034	3.448	3.077	2.571
Desv. Abs. (%)	0.970	2.063	0.550	0.795	2.723	1.145	0.786	2.830
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	16.0-24.0	34.0-46.0	127.5-172.5	340.0-460.0	680.0-920.0	1062.5-1437.5	1487.5-2012.5	1912.5-2587.5

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 35. Parámetros de linealidad del método para cuantificar etambutol en plasma.

	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	0.0011	0.0023	0.9994
Curva 2	0.0011	0.0018	0.9991
Curva 3	0.0011	0.0012	0.9996
Curva 4	0.0012	0.0019	0.9996
Curva 5	0.0013	0.0010	0.9987
Promedio	0.0012		
D. E.	0.0001		
C. V. (%)	8.083		

Nota: Todos los resultados reportados en la tabla anterior se obtuvieron de resultados generados por el paquete computacional Analyst® con un ajuste $1/x^2$.

En la Figura 30 se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las 5 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta (relación de áreas) de etambutol/memantina (E.I.).

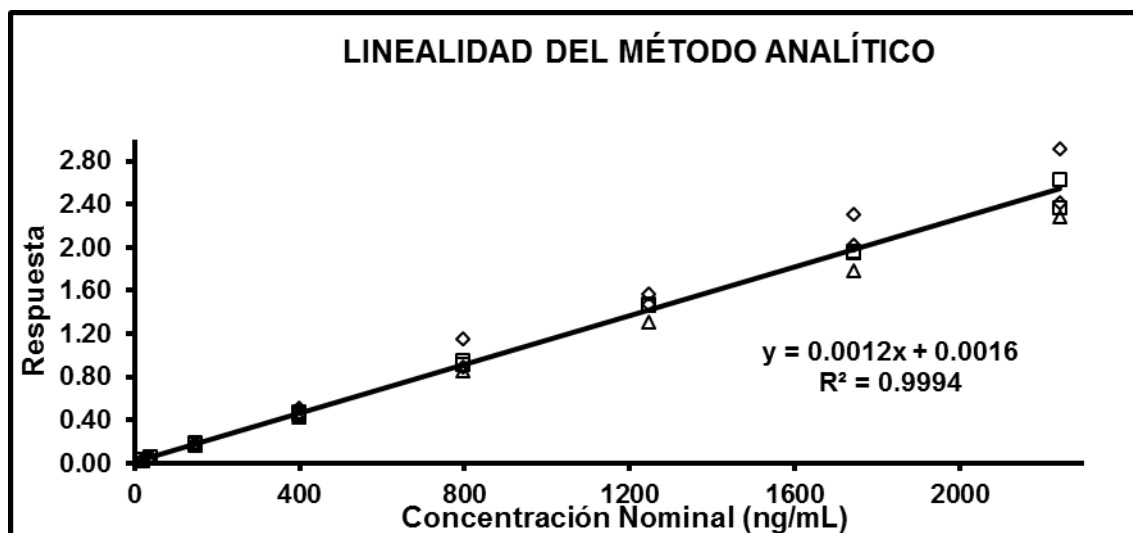


Figura 30. Linealidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.

5.2.7. Repetibilidad de la curva de calibración para rifampicina.

Los resultados se muestran en la Tabla 36:

Tabla 36. Repetibilidad de las curvas de calibración para cuantificar rifampicina en plasma (concentración recuperada).

Concentración de rifampicina (ng/mL)	100	250	500	1200	2250	3500	4500	6000
Curva 1	100.318	249.352	481.603	1176.084	2298.423	3711.505	4692.908	5461.194
Curva 2	100.306	248.373	493.266	1150.529	2261.422	3508.143	4619.687	6018.131
Curva 3	100.099	245.252	505.386	1186.829	2285.236	3546.724	4567.827	5718.028
Promedio	100.241	247.659	493.418	1171.147	2281.694	3588.791	4626.807	5732.451
D. E.	0.123	2.141	11.892	18.647	18.753	108.010	62.844	278.748
C. V. (%)	0.123	0.865	2.410	1.592	0.822	3.010	1.358	4.863
Desv. Abs. (%)	0.506	0.674	1.055	2.146	1.677	2.808	3.090	4.206
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	80.0-120.0	212.5-287.5	425.0-575.0	1020.0-1380	1912.5-2587.5	2975.0-4025.0	3825.0-5175.0	5100.0-6900.0

Tabla 37. Parámetros de linealidad del método (repetibilidad de las curvas de calibración para rifampicina).

	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	0.00031	0.0014	0.9985
Curva 2	0.00032	0.0003	0.9998
Curva 3	0.00032	0.0008	0.9997
Promedio	0.00032		
D. E.	0.000004		
C. V. (%)	1.379		

Se demuestra la precisión de todos los puntos de la curva de calibración para rifampicina.

5.2.8. Repetibilidad de la curva de calibración para etambutol.

Los resultados se muestran en la Tabla 38:

Tabla 38. Repetibilidad de las curvas de calibración para cuantificar etambutol en plasma (concentración recuperada).

Concentración (ng/mL)	20	40	150	400	800	1250	1750	2250
Curva 1	20.225	38.780	147.781	393.980	793.764	1308.963	1795.882	2147.958
Curva 2	20.169	39.085	147.613	389.051	794.058	1240.925	1830.671	2244.229
Curva 3	20.165	38.741	151.535	397.475	796.754	1296.439	1765.605	2133.936
Promedio	20.186	38.869	148.976	393.502	794.859	1282.109	1797.386	2175.374
D. E.	0.034	0.188	2.217	4.232	1.648	36.212	32.559	60.041
C. V. (%)	0.166	0.485	1.488	1.076	0.207	2.824	1.811	2.760
Desv. Abs. (%)	1.296	2.477	0.322	1.268	0.283	2.940	3.080	2.966
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	16.0-24.0	34.0-46.0	127.5-172.5	340.0-460.0	680.0-920.0	1062.5-1437.5	1487.5-2012.5	1912.5-2587.5

Tabla 39. Parámetros de linealidad del método (repetibilidad de las curvas de calibración para etambutol).

	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	0.0011	0.0023	0.9994
Curva 2	0.0011	0.0018	0.9997
Curva 3	0.0011	0.0015	0.9995
Promedio	0.0011		
D. E.	0.00001		
C. V. (%)	0.514		

5.2.9. Precisión.

5.2.9.1. Repetibilidad de rifampicina.

En la Tabla 40 se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad de rifampicina, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación y la desviación absoluta en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor al 3.124% y 1.420% respectivamente.

Tabla 40. Repetibilidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.

Muestra	Límite Inferior de Cuantificación (100 ng/mL)	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)	Límite Superior de Cuantificación (6000 ng/mL)
1	98.544	295.773	2543.725	4817.315	5949.482
2	98.483	291.232	2432.648	5090.333	5944.999
3	98.503	308.100	2465.065	5096.999	5959.965
4	98.313	292.695	2469.519	5109.996	6055.843
5	95.165	310.634	2458.726	4967.697	5994.162
6	100.911	297.240	2495.089	4752.869	5821.864
Promedio	98.320	299.279	2477.462	4972.535	5954.386
D. E.	1.832	8.140	38.151	155.327	76.917
C. V. (%)	1.863	2.720	1.540	3.124	1.292
Desv. Abs. (%)	1.420	0.024	0.639	0.286	0.498
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	80.0-120.0	255.0-345.0	2125-2875.0	4250.0-5750.0	5100.0-6900.0

5.2.9.2. Repetibilidad de etambutol.

En la Tabla 41 se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad de etambutol, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación y la desviación absoluta en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor al 10.024% y 6.211% respectivamente.

Tabla 41. Repetibilidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.

Muestra	Límite Inferior de Cuantificación (20 ng/mL)	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)	Límite Superior de Cuantificación (2250 ng/mL)
1	18.067	57.199	947.174	1869.058	2106.806
2	22.479	54.230	951.013	1962.647	2123.462
3	17.633	55.864	944.785	1897.305	2087.704
4	17.585	53.842	930.369	1940.246	2148.747
5	18.222	58.503	959.015	1905.587	2083.709
6	19.791	56.988	957.442	1868.597	2065.364
Promedio	18.963	56.104	948.300	1907.240	2102.632
D. E.	1.901	1.812	10.401	37.979	30.159
C. V. (%)	10.024	3.230	1.097	1.991	1.434
Desv. Abs. (%)	4.843	6.153	4.826	4.292	6.211
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	16.0-24.0	51.0-69.0	850.0-1150.0	1700.0-2300.0	1912.0-2587.5

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.10. Reproducibilidad y exactitud de rifampicina

En la Tabla 42 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud para rifampicina, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 2.28 a 2.514%, mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 1.937%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 42. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.

Día	Concentración recuperada		
	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio) (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	295.428	2565.554	5071.411
	293.760	2511.579	4922.159
	295.184	2579.024	4895.590
	293.821	2509.726	5118.102
	302.519	2579.931	5055.379
	290.496	2587.841	4962.313
2	295.773	2543.725	4817.315
	291.232	2432.648	5090.333
	308.100	2465.065	5096.999
	292.695	2469.519	5109.996
	310.634	2458.726	4967.697
	297.240	2495.089	4752.869
3	300.040	2659.151	5061.555
	303.994	2622.116	4964.019
	305.054	2581.445	5159.411
	301.455	2557.624	5144.773
	293.954	2623.453	5019.978
	317.460	2508.279	4921.139
Promedio	299.380	2541.694	5007.280
D. E.	7.398	63.900	114.474
C. V. (%)	2.471	2.514	2.286
Desv. Abs. (%)	0.057	1.937	0.411
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	255.0-345.0	2125-2875.0	4250.0-5750.0

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.11. Reproducibilidad y exactitud del método de etambutol.

En la Tabla 43 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud para etambutol, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 2.28 a 2.514%, mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 1.937%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 43. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.

Día	Concentración recuperada		
	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	59.251	1046.448	2032.574
	59.992	1052.995	1973.000
	59.203	1061.848	1957.202
	58.654	1047.294	2045.812
	57.321	1067.455	1988.239
	57.608	1085.685	1994.305
2	57.199	947.174	1869.058
	54.230	951.013	1962.647
	55.864	944.785	1897.305
	53.842	930.369	1940.246
	58.503	959.015	1905.587
	56.988	957.442	1868.597
3	58.214	984.262	1907.325
	59.204	999.656	1926.662
	64.818	985.670	1917.675
	66.824	965.936	1973.985
	58.507	914.490	1898.412
	59.673	939.049	2025.481
Promedio	58.661	991.144	1949.117
D. E.	3.135	54.625	54.513
C. V. (%)	5.344	5.511	2.797
Desv. Abs. (%)	1.877	0.527	2.191
Rango de cumplimiento mínimo,máximo (ng/mL)	51.0-69.0	850.0-1150.0	1700.0-2300.0

5.2.12. Efecto matriz de rifampicina, etambutol y memantina.

En la evaluación de la selectividad sobre el efecto matriz se obtuvieron los siguientes resultados, en ellos se puede observar que para rifampicina se tiene 0.303% de efecto matriz global, para etambutol se tiene 4.485% y para memantina (E.I.) se tiene -1.446% de efecto matriz global, sin embargo, el efecto matriz mostrado no afecta la precisión del método analítico dado que los coeficientes de variación fueron menores a 15%. Ver resultados en las Tabla 44 a 50.

Tabla 44. Evaluación del efecto matriz para rifampicina.

Plasma	Determinación 1 Área	Determinación 2 Área	Área promedio en blanco de plasma	Área sistema	% Factor Matriz
1	459121.979	467201.231	463161.605	484403.056	97.209
2	460075.330	466310.026	463192.678	480431.191	97.216
3	469215.212	467691.231	468453.222	481174.955	98.320
4	461384.551	478964.643	470174.597	472232.868	98.681
5	495151.930	482952.436	489052.183	468985.168	102.643
6	506900.346	520869.708	513885.027	471527.388	107.855
Mezcla	478359.433	476467.803	477413.618	-	100.200
		Promedio global	477904.704	476459.104	100.303
		D. E.	18266.449	6311.350	3.834
		C. V. (%)	3.822	1.325	3.822
		% Efecto matriz	0.303		

Tabla 45. Evaluación del efecto matriz para etambutol.

Plasma	Determinación 1 Área	Determinación 2 Área	Área promedio en blanco de plasma	Área sistema	% Factor Matriz
1	437851.118	447704.726	442777.922	473997.335	98.997
2	449311.700	464365.466	456838.583	466216.732	102.141
3	465902.618	454297.358	460099.988	449188.391	102.870
4	454912.464	472069.361	463490.913	434539.946	103.628
5	487290.464	470251.962	478771.213	433166.423	107.045
6	488842.653	506240.179	497541.416	426465.169	111.242
Mezcla	468793.607	474699.548	471746.578	-	105.474
		Promedio global	467323.802	447262.333	104.485
		D. E.	17526.280	19343.294	3.919
		C. V. (%)	3.750	4.325	3.750
		% Efecto matriz	4.485		

Tabla 46. Evaluación del efecto matriz para memantina (E.I.).

Plasma	Determinación 1 Área	Determinación 2 Área	Área promedio en blanco de plasma	Área sistema	% Factor Matriz
1	476058.351	484015.711	480037.031	493046.870	96.850
2	479556.499	499076.034	489316.267	506314.756	98.722
3	476976.454	476862.096	476919.275	505479.258	96.221
4	491681.786	496799.985	494240.886	482027.136	99.716
5	498609.714	491501.637	495055.676	497425.371	99.880
6	484654.708	491820.705	488237.707	489598.893	98.505
Mezcla	498785.788	492369.589	495577.689	-	99.986
		Promedio global	488483.504	495648.714	98.554
		D. E.	7444.198	9407.209	1.502
		C. V. (%)	1.524	1.898	1.524
		% Efecto matriz	-1.446		

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 47. Evaluación del efecto matriz relativo para rifampicina/memantina (E.I.).

Plasma	Área relativa del método	Área relativa del sistema	% Factor matriz relativo
1	0.965	0.982	100.350
2	0.947	0.949	98.454
3	0.982	0.952	102.160
4	0.951	0.980	98.942
5	0.988	0.943	102.745
6	1.053	0.963	109.470
Mezcla	0.963	-	100.195
Promedio global	0.978	0.961	101.760
D. E.	0.036	0.017	3.739
C. V. (%)	3.674	1.723	3.674
% Efecto Global	1.760		

Tabla 48. Evaluación del factor matriz normalizado para rifampicina/memantina E.I. (FMI).

Plasma	% Factor matriz rifampicina	% Factor matriz memantina (E.I.)	FMI
1	97.209	96.850	1.004
2	97.216	98.722	0.985
3	98.320	96.221	1.022
4	98.681	99.716	0.990
5	102.643	99.880	1.028
6	107.855	98.505	1.095
Mezcla	100.200	99.986	1.002
Promedio global	100.303	98.554	1.018
D. E.	3.834	1.502	0.037
C. V. (%)	3.822	1.524	3.674

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 49. Evaluación del efecto matriz relativo para etambutol/memantina E.I. (FMI).

Plasma	Área relativa del método	Área relativa del sistema	% Factor matriz relativo
1	0.922	0.961	102.219
2	0.934	0.921	103.465
3	0.965	0.889	106.912
4	0.938	0.901	103.926
5	0.967	0.871	107.175
6	1.019	0.871	112.932
Mezcla	0.952	-	105.491
Promedio global	0.957	0.902	106.017
D. E.	0.032	0.035	3.549
C. V. (%)	3.347	3.834	3.347
% Efecto Global	6.017		

Tabla 50. Evaluación del factor matriz normalizado para etambutol/memantina E.I. (FMI).

Plasma	% Factor matriz etambutol	% Factor matriz memantina (E.I.)	FMI
1	98.997	96.850	1.022
2	102.141	98.722	1.035
3	102.870	96.221	1.069
4	103.628	99.716	1.039
5	107.045	99.880	1.072
6	111.242	98.505	1.129
Mezcla	105.474	99.986	1.055
Promedio global	104.485	98.554	1.060
D. E.	3.919	1.502	0.035
C. V. (%)	3.750	1.524	3.347

5.2.13. Recobro de rifampicina, etambutol y memantina (E.I.).

El recobro fue definido como el cociente de la respuesta cromatográfica promedio de muestras plasmáticas entre sus correspondientes muestras del analito en solución a concentraciones equivalentes, pero que no fueron sometidas al procedimiento de extracción.

El recobro del método analítico para cuantificar rifampicina y etambutol en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (muestras control de calidad bajo, medio y alto), presentando una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%. Los resultados se muestran en las Tabla 51 y 52.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 51. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma.

Nivel de concentración	ÁREAS		Recobro	% Desv.
	SISTEMA	MÉTODO		
Control Bajo (300 ng/mL)	65359.177	64744.146		
	68022.149	64637.726		
	67975.645	65592.842		
	66640.390	64853.661		
	68682.895	63882.936		
	67877.913	68122.328		
Promedio	67426.362	65305.606	96.855	2.791
Control Medio (2500 ng/mL)	581112.168	547428.600		
	584455.871	520949.531		
	573357.977	543554.609		
	593308.558	534855.583		
	563557.133	534423.805		
	566953.649	508741.292		
Promedio	577124.226	531658.903	92.122	2.232
Control Alto (5000 ng/mL)	1131714.679	1039046.694		
	1155692.888	1035617.071		
	1093995.519	1044637.290		
	1075191.245	1084203.649		
	1117487.845	1084621.490		
	1147160.741	1009529.906		
Promedio	1120207.153	1049609.350	93.698	0.559
	Promedio Global		94.225	1.861

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 52. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar etambutol en plasma.

Nivel de concentración	ÁREAS		Recobro	% Desv.
	SISTEMA	MÉTODO		
Control Bajo (60 ng/mL)	39556.365	37185.078		
	36194.511	37441.671		
	36322.403	38656.509		
	37351.701	36631.169		
	39447.330	40915.871		
	41398.414	38902.869		
Promedio	38378.454	38288.861	99.767	3.550
Control Medio (1000 ng/mL)	635986.207	599127.572		
	692716.998	646097.917		
	666077.414	660356.665		
	650991.585	627528.771		
	648597.989	625090.457		
	652203.265	578509.735		
Promedio	657762.243	622785.186	94.682	1.727
Control Alto (2000 ng/mL)	1349256.725	1266492.106		
	1257048.667	1216009.306		
	1464970.178	1206260.443		
	1315453.583	1250797.509		
	1247713.767	1225885.021		
	1184088.041	1230030.340		
Promedio	1303088.494	1232579.121	94.589	1.824
	Promedio Global		96.346	2.367

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Por otro lado el recobro absoluto del E.I. (Memantina) se muestra a continuación (Tabla 53):

Tabla 53. Recobro absoluto de memantina (E.I.) en plasma.

Concentración	ÁREAS		% Recobro
	Sistema	Método	
5.289 ng/mL	773510.962	743885.749	
	783516.926	733181.944	
	791171.339	741477.197	
	778054.771	741711.852	
	809546.687	748898.392	
	784314.722	740507.846	
	816378.643	721639.791	
	833484.190	696412.788	
	812114.086	738054.312	
	859631.060	732991.497	
	822307.456	714061.927	
	802476.624	710888.150	
	819392.531	720325.474	
	837658.131	732038.360	
	813769.431	710480.837	
	794943.104	739486.504	
	815438.818	758141.057	
784070.888	719809.066		
Promedio	807321.132	730221.819	90.450

5.2.14. Límite de detección y Límite inferior de cuantificación para rifampicina.

La sensibilidad del método para rifampicina fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable o límite inferior de cuantificación (LIC) y del límite de detección (LD). En la Tabla 54 se muestran los resultados:

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 54. Evaluación del límite de detección y del límite inferior de cuantificación para rifampicina.

Muestra	Concentración recuperada	
	Límite de Detección (50 ng/mL)	Límite Inferior de Cuantificación (100 ng/mL)
1	48.876	98.544
2	45.923	98.483
3	49.827	98.503
4	46.026	98.313
5	46.128	95.165
6	45.881	100.911
Promedio	47.110	98.320
D. E.	1.764	1.832
C. V. (%)	3.745	1.863
Desv. Abs. (%)	5.530	1.420

Para rifampicina se determinó 100 ng/mL como el límite inferior de cuantificación, obteniendo un C.V.%= 1.863 y una Desv. Abs%= 1.420.

Se determinó como límite de detección 50 ng/mL, siendo la relación señal ruido mayor a 3 (relación señal ruido de 40), obteniendo un C.V.%= 3.745 y una Desv. Abs%= 5.530. Sin embargo los resultados obtenidos, muestran que la concentración que se estableció como límite de detección cumplen con los criterios de un límite de cuantificación, pero para los fines de este trabajo el límite de cuantificación establecido (100 ng/mL) fue suficiente.

En la Figura 31 se muestra el cromatograma característico de las muestras pertenecientes al límite inferior de cuantificación y de detección para rifampicina.

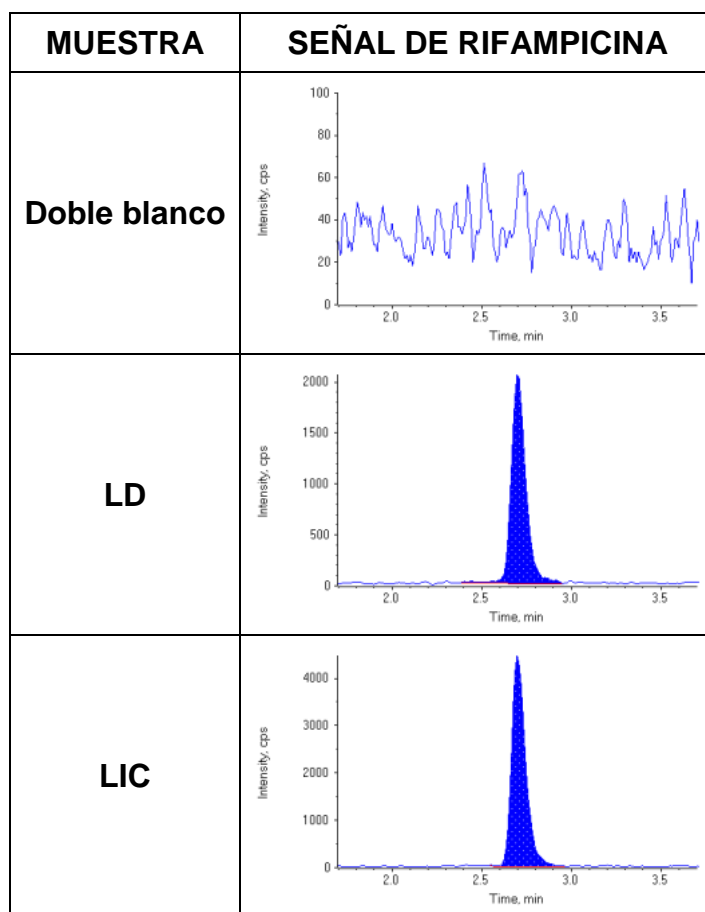


Figura 31. Límite de Detección (LD) e Inferior de Cuantificación (LIC) para rifampicina.

5.2.15. Límite inferior de cuantificación y Límite de detección para etambutol.

La sensibilidad del método para etambutol fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable o límite inferior de cuantificación (LIC) y del límite de detección (LD). En la Tabla 55 se muestran los resultados:

Tabla 55. Evaluación del límite de detección e inferior de cuantificación de etambutol.

Muestra	Concentración recuperada	
	Límite de Detección (10 ng/mL)	Límite Inferior de Cuantificación (20 ng/mL)
1	10.449	18.067
2	8.406	22.479
3	10.213	17.633
4	9.210	17.585
5	9.426	18.222
6	9.224	19.791
Promedio	9.488	18.963
D. E.	0.744	1.901
C. V. (%)	7.846	10.024
Desv. Abs. (%)	4.777	4.843

Para etambutol se determinó 20 ng/mL como el límite inferior de cuantificación, obteniendo un C.V. %= 10.024 y una Desv. Abs%= 4.843.

Se determinó como límite de detección 10 ng/mL, siendo la relación señal ruido mayor a 3 (relación señal ruido de 9) y un C.V.% 7.846 y una Desv. Abs%= 4.777.

En la Figura 32 se muestra el cromatograma característico de las muestras pertenecientes al límite inferior de cuantificación y de detección para etambutol.

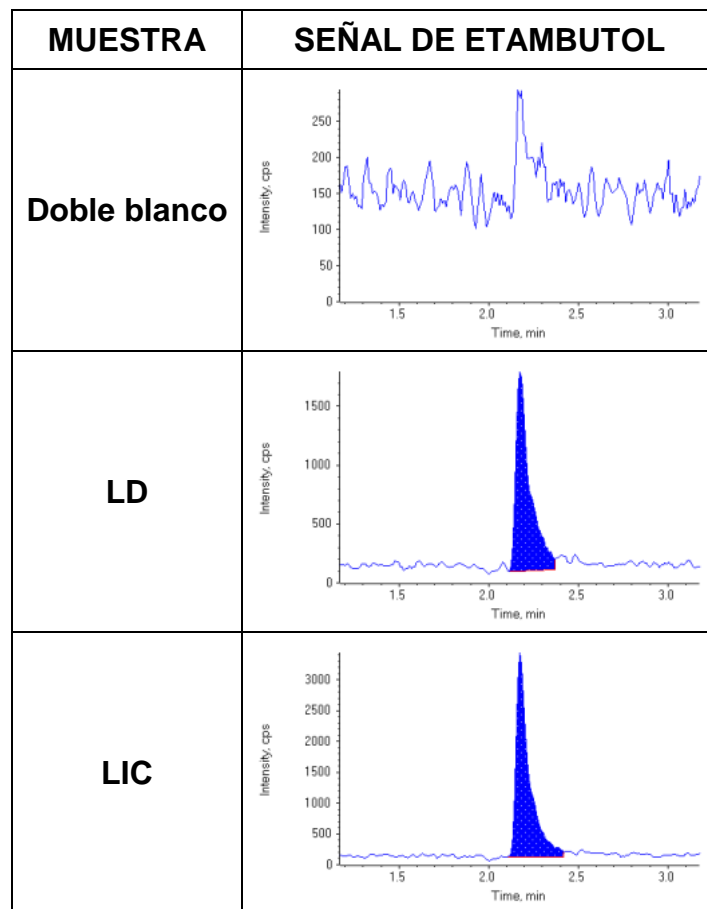


Figura 32. Límite de Detección (LD) e Inferior de Cuantificación (LIC) para etambutol.

5.2.16. Estabilidad

5.2.16.1. Ciclos de congelación-descongelación para rifampicina y etambutol.

Se evaluaron cuatro ciclos de congelación- descongelación para las muestras plasmáticas, los resultados para rifampicina se muestran en la Tabla 56, mientras los resultados de etambutol se muestran en la Tabla 57.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 56. Estabilidad de rifampicina en plasma (CICLO 4).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	306.451	2474.600	4845.260
2	293.106	2485.767	4810.693
3	293.670	2371.754	4652.494
4	292.792	2463.600	4615.816
5	290.364	2395.580	4807.061
6	289.421	2366.791	4848.306
Promedio	294.301	2426.349	4763.272
D. E.	6.181	54.260	102.112
C. V. (%)	2.100	2.236	2.144
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 4			
1	274.025	2330.764	4536.285
2	291.864	2302.897	4949.322
3	280.839	2442.773	4934.454
4	266.616	2472.866	4834.694
5	284.809	2520.894	4572.998
6	296.260	2440.120	4750.054
Promedio	282.402	2418.386	4762.968
D. E.	11.038	84.331	177.156
C. V. (%)	3.909	3.487	3.719
Desv. Abs. (%)	4.043	0.328	0.006

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 57. Estabilidad de etambutol en plasma (CICLO 4).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	60.559	949.818	1982.275
2	59.572	988.713	1942.856
3	59.279	951.373	1928.146
4	58.739	974.460	1857.326
5	59.334	919.654	1916.583
6	58.759	944.348	1955.472
Promedio	59.374	954.728	1930.443
D. E.	0.669	24.156	42.451
C. V. (%)	1.126	2.530	2.199
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 4			
1	52.440	914.023	1752.074
2	54.613	891.835	1884.873
3	55.633	924.132	1891.647
4	53.704	941.165	1810.695
5	57.226	950.822	1785.751
6	58.343	912.234	1832.438
Promedio	55.327	922.369	1826.246
D. E.	2.203	21.310	55.020
C. V. (%)	3.983	2.310	3.013
Desv. Abs. (%)	6.816	3.389	5.398

La prueba cumple con 4 ciclos de congelación/descongelación al presentarse coeficientes de variación menores al 15% y presentar una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas) por lo que se puede concluir que las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina y etambutol son estables después de cuatro ciclos congelación-descongelación a -70°C.

5.2.16.2. Estabilidad a temperatura ambiente para rifampicina y etambutol.

Se demostró una estabilidad de las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina y etambutol almacenadas a temperatura ambiente durante 24 horas, ya que las muestras control de calidad presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor de muestras control de calidad de recién preparación. Los resultados de estabilidad a temperatura ambiente para rifampicina se presentan en la Tabla 58, mientras que para etambutol se presentan en la Tabla 59.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 58. Estabilidad de rifampicina en plasma 24 horas (temperatura ambiente 15-30°C).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	282.394	2450.979	4819.586
2	293.468	2669.691	4734.692
3	289.820	2427.212	4700.763
4	267.185	2492.607	4740.254
5	274.820	2414.663	5167.606
6	285.252	2552.220	5001.463
Promedio	282.157	2501.229	4860.727
D. E.	9.739	96.489	185.289
C. V. (%)	3.452	3.858	3.812
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	251.601	2292.079	4474.333
2	252.982	2315.669	4508.219
3	262.542	2246.057	4513.136
4	267.145	2319.214	4496.306
5	262.598	2308.321	4308.112
6	276.052	2242.788	4498.630
Promedio	262.153	2287.355	4466.456
D. E.	9.098	34.555	78.720
C. V. (%)	3.471	1.511	1.762
Desv. Abs. (%)	7.089	8.551	8.111

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 59. Estabilidad de etambutol en plasma 24 horas (temperatura ambiente 15-30°C).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	55.589	947.529	1888.288
2	54.052	1025.949	1862.254
3	55.110	971.718	1834.430
4	55.499	977.016	1865.812
5	54.766	941.253	1977.787
6	58.830	981.078	1881.253
<i>Promedio</i>	55.641	974.091	1884.971
<i>D. E.</i>	1.659	30.120	49.147
<i>C. V. (%)</i>	2.982	3.092	2.607
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	54.173	903.548	1812.155
2	54.758	932.108	1814.711
3	53.344	893.903	1806.378
4	55.293	913.058	1755.389
5	55.811	898.403	1693.272
6	57.026	903.081	1760.213
<i>Promedio</i>	55.068	907.350	1773.686
<i>D. E.</i>	1.289	13.705	47.359
<i>C. V. (%)</i>	2.341	1.510	2.670
<i>Desv. Abs. (%)</i>	1.031	6.852	5.904

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.16.3. Estabilidad en refrigeración para rifampicina y etambutol.

Se demostró la estabilidad de las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina y etambutol almacenadas en refrigeración durante 24 horas, ya que las muestras control de calidad presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor de muestras control de calidad de recién preparación. Los resultados de estabilidad en refrigeración para rifampicina se presentan en la Tabla 60, mientras que para etambutol se presentan en la Tabla 61.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 60. Estabilidad de rifampicina en plasma 24 horas (refrigeración 2-8°C).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	282.394	2450.979	4819.586
2	293.468	2669.691	4734.692
3	289.820	2427.212	4700.763
4	267.185	2492.607	4740.254
5	274.820	2414.663	5167.606
6	285.252	2552.220	5001.463
<i>Promedio</i>	282.157	2501.229	4860.727
<i>D. E.</i>	9.739	96.489	185.289
<i>C. V. (%)</i>	3.452	3.858	3.812
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	255.701	2234.587	4491.545
2	271.915	2223.927	4591.899
3	274.209	2400.424	4857.302
4	251.525	2254.611	4571.304
5	251.918	2295.618	4653.803
6	253.199	2255.690	4489.782
<i>Promedio</i>	259.745	2277.476	4609.273
<i>D. E.</i>	10.444	65.038	136.662
<i>C. V. (%)</i>	4.021	2.856	2.965
<i>Desv. Abs. (%)</i>	7.943	8.946	5.173

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 61. Estabilidad de etambutol en plasma 24 horas (refrigeración 2-8°C).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	55.589	947.529	1888.288
2	54.052	1025.949	1862.254
3	55.110	971.718	1834.430
4	55.499	977.016	1865.812
5	54.766	941.253	1977.787
6	58.830	981.078	1881.253
<i>Promedio</i>	55.641	974.091	1884.971
<i>D. E.</i>	1.659	30.120	49.147
<i>C. V. (%)</i>	2.982	3.092	2.607
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	53.051	847.204	1706.993
2	53.178	817.464	1738.241
3	52.149	893.078	1829.632
4	48.713	853.452	1722.967
5	50.030	850.776	1762.742
6	50.209	855.861	1677.739
<i>Promedio</i>	51.222	852.973	1739.719
<i>D. E.</i>	1.832	24.149	52.554
<i>C. V. (%)</i>	3.576	2.831	3.021
<i>Desv. Abs. (%)</i>	7.943	12.434	7.706

5.2.16.4. Estabilidad de la muestra procesada para rifampicina y etambutol.

En este caso, las muestras procesadas permanecieron en el automuestreador a 8°C y fueron inyectadas a las 6.5, 8.0, 9.4, 10.5, 12.0, 13.4 y 31.5 horas posteriores a su procesamiento. Los resultados para rifampicina se presentan en la Tabla 62, donde se puede observar que rifampicina fue estable en la solución de inyección durante 31.5 horas. Los resultados de etambutol se presentan en la Tabla 63, siendo que para etambutol la estabilidad en la solución de inyección fue de 12.0 horas después de su preparación ya que después de ese tiempo se presentaron desviaciones absolutas mayores al 15%.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

**Tabla 62. Estabilidad de rifampicina en muestra procesada 31.5 horas
(automuestreador a 8°C).**

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	295.773	2543.725	4817.315
2	291.232	2432.648	5090.333
3	308.100	2465.065	5096.999
4	292.695	2469.519	5109.996
5	310.634	2458.726	4967.697
6	297.240	2495.089	4752.869
Promedio	299.279	2477.462	4972.535
D. E.	8.140	38.151	155.327
C. V. (%)	2.720	1.540	3.124
Concentraciones plasmáticas después de 31.5 h			
1	303.814	2480.338	5155.443
2	307.883	2446.065	4862.732
3	300.465	2528.419	4849.729
4	293.211	2591.648	4977.979
5	289.476	2557.360	4900.781
6	299.430	2614.852	4925.106
Promedio	299.047	2536.447	4945.295
D. E.	6.762	64.828	112.756
C. V. (%)	2.261	2.556	2.280
Desv. Abs. (%)	0.078	2.381	0.548

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

**Tabla 63. Estabilidad de etambutol en muestra procesada 12.0 horas
(automuestreador a 8 °C).**

Respuesta analítica (área relativa) de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	0.068	1.172	2.275
2	0.069	1.179	2.208
3	0.068	1.189	2.190
4	0.068	1.173	2.289
5	0.066	1.196	2.225
6	0.067	1.216	2.232
<i>Promedio</i>	0.068	1.188	2.237
<i>D. E.</i>	0.001	0.017	0.038
<i>C. V. (%)</i>	1.526	1.414	1.716
Respuesta analítica (área relativa) de muestras plasmáticas después de 12.0 h			
1	0.057	1.023	1.923
2	0.060	1.025	1.900
3	0.061	1.024	1.911
4	0.060	1.010	2.026
5	0.059	1.040	1.922
6	0.058	1.071	1.884
<i>Promedio</i>	0.059	1.032	1.928
<i>D. E.</i>	0.001	0.021	0.050
<i>C. V. (%)</i>	2.488	2.061	2.612
<i>Desv. Abs. (%)</i>	12.562	13.081	13.809

5.2.16.5. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 336 días.

Se demostró la estabilidad de rifampicina y etambutol en muestras plasmáticas durante 336 días en congelación a -70°C, ya que las muestras control de calidad presentaron para cada analito una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor de muestras control de calidad de recién preparación. Los resultados de estabilidad a largo plazo (336 días en congelación a -70°C) para rifampicina se presentan en las Tabla 64 y 65; mientras que para etambutol se presentan en las Tabla 66 y 67.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 64. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C durante 336 días (concentración plasmática).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	297.497	2487.387	5029.550
2	306.855	2640.428	5028.914
3	306.235	2586.912	5152.092
4	305.879	2589.552	5248.314
5	306.750	2560.581	5078.415
6	299.708	2519.560	5128.448
Promedio	303.821	2564.070	5110.956
D.E.	4.117	54.544	84.003
C.V. (%)	1.355	2.127	1.644
Concentraciones plasmáticas de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 336 días en presencia de etambutol			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	307.116	2598.127	5416.091
2	303.308	2643.487	5500.363
3	324.665	2583.507	5321.526
4	304.280	2631.085	5596.548
5	317.171	2744.614	5336.543
6	312.319	2786.502	5344.978
Promedio	311.477	2664.554	5419.342
D.E.	8.302	82.251	109.481
C.V. (%)	2.665	3.087	2.020
Desv. Abs. (%)	2.520	3.919	6.034

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 65. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C durante 336 días (% de recuperación).

% de recuperación de muestras plasmáticas recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	99.166	99.495	100.591
2	102.285	105.617	100.578
3	102.078	103.476	103.042
4	101.960	103.582	104.966
5	102.250	102.423	101.568
6	99.903	100.782	102.569
Promedio	101.274	102.563	102.219
D.E.	1.372	2.182	1.680
C.V. (%)	1.355	2.127	1.644
% de recuperación de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 336 días en presencia de etambutol			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	102.372	103.925	108.322
2	101.103	105.739	110.007
3	108.222	103.340	106.431
4	101.427	105.243	111.931
5	105.724	109.785	106.731
6	104.106	111.460	106.900
Promedio	103.826	106.582	108.387
D.E.	2.767	3.290	2.190
C.V. (%)	2.665	3.087	2.020
Desv. Abs. (%)	2.520	3.919	6.034
Criterio de aceptación	85.000-115.000	85.000-115.000	85.000-115.000

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 66. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C durante 336 días (concentraciones plasmáticas).

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	58.685	948.154	1798.752
2	61.605	1007.732	1824.740
3	59.811	973.720	1772.415
4	60.333	960.702	1865.909
5	59.778	945.618	1722.601
6	57.988	947.492	1784.556
Promedio	59.700	963.903	1794.829
D.E.	1.266	23.997	48.554
C.V. (%)	2.120	2.490	2.705
Concentraciones plasmáticas de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 336 días en presencia de rifampicina			
Muestra	Control Bajo (50 ng/mL)	Control Medio (850 ng/mL)	Control Alto (1700 ng/mL)
1	55.727	864.117	1724.219
2	54.867	876.424	1724.962
3	56.857	855.483	1666.414
4	54.601	854.001	1743.301
5	57.052	901.273	1673.984
6	55.842	905.505	1681.711
Promedio	55.824	876.134	1702.432
D.E.	1.000	22.607	32.213
C.V. (%)	1.791	2.580	1.892

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 67. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C durante 336 días (% de recuperación).

% de recuperación de muestras plasmáticas recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	97.808	94.815	89.938
2	102.675	100.773	91.237
3	99.685	97.372	88.621
4	100.555	96.070	93.295
5	99.630	94.562	86.130
6	96.647	94.749	89.228
Promedio	99.500	96.390	89.741
D.E.	2.109	2.400	2.428
C.V. (%)	2.120	2.490	2.705
% de recuperación de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 336 días en presencia de rifampicina			
Muestra	Control Bajo (50 ng/mL)	Control Medio (850 ng/mL)	Control Alto (1700 ng/mL)
1	111.454	101.661	101.425
2	109.734	103.109	101.468
3	113.714	100.645	98.024
4	109.202	100.471	102.547
5	114.104	106.032	98.470
6	111.684	106.530	98.924
Promedio	111.649	103.075	100.143
D.E.	1.999	2.660	1.895
C.V. (%)	1.791	2.580	1.892
Desv. Abs. (%)	12.210	6.935	11.591
Criterio de aceptación	85.000-115.000	85.000-115.000	85.000-115.000

5.2.16.6. Estabilidad a largo plazo de rifampicina y etambutol en congelación a -70 °C durante 281 días, en presencia de isoniazida y pirazinamida a concentraciones de 1500 y 8750 ng/mL respectivamente.

Se demostró la estabilidad de rifampicina y etambutol en presencia de isoniazida y pirazinamida en muestras plasmáticas durante 281 días en congelación a -70°C, ya que las muestras control de calidad presentaron para cada analito una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor de muestras control de calidad de recién preparación. Los resultados de estabilidad a largo plazo (281 días en congelación a -70°C) para rifampicina se presentan en las Tabla 68 y 69, mientras que para etambutol se presentan en las Tabla 70 y 71, esto en presencia de isoniazida y pirazinamida a concentraciones de 1500 y 8750 ng/mL respectivamente.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 68. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	297.497	2487.387	5029.550
2	306.855	2640.428	5028.914
3	306.235	2586.912	5152.092
4	305.879	2589.552	5248.314
5	306.750	2560.581	5078.415
6	299.708	2519.560	5128.448
Promedio	303.821	2564.070	5110.956
D.E.	4.117	54.544	84.003
C.V. (%)	1.355	2.127	1.644
Concentraciones plasmáticas de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 281 días.			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	327.607	2615.556	5628.954
2	323.673	2685.118	5404.756
3	319.479	2693.187	5386.345
4	315.896	2683.151	5342.068
5	320.550	2670.316	5220.707
6	319.419	2714.747	5197.481
Promedio	321.104	2677.013	5363.385
D.E.	4.045	33.498	155.629
C.V. (%)	1.260	1.251	2.902
Desv. Abs. (%)	5.689	4.405	4.939

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 69. Estabilidad a largo plazo de rifampicina en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida (% de recuperación).

% de recuperación de muestras plasmáticas recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	99.166	99.495	100.591
2	102.285	105.617	100.578
3	102.078	103.476	103.042
4	101.960	103.582	104.966
5	102.250	102.423	101.568
6	99.903	100.782	102.569
Promedio	101.274	102.563	102.219
D.E.	1.372	2.182	1.680
C.V. (%)	1.355	2.127	1.644
% de recuperación de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 281 días.			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	109.202	104.622	112.579
2	107.891	107.405	108.095
3	106.493	107.727	107.727
4	105.299	107.326	106.841
5	106.850	106.813	104.414
6	106.473	108.590	103.950
Promedio	107.035	107.081	107.268
D.E.	1.348	1.340	3.113
C.V. (%)	1.260	1.251	2.902
Desv. Abs. (%)	5.689	4.405	4.939
Criterio de aceptación	85.000-115.000	85.000-115.000	85.000-115.000

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 70. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	58.685	948.154	1798.752
2	61.605	1007.732	1824.740
3	59.811	973.720	1772.415
4	60.333	960.702	1865.909
5	59.778	945.618	1722.601
6	57.988	947.492	1784.556
Promedio	59.700	963.903	1794.829
D.E.	1.266	23.997	48.554
C.V. (%)	2.120	2.490	2.705
Concentraciones plasmáticas de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 281 días.			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	64.292	1017.476	2051.968
2	67.191	991.728	1973.797
3	65.488	1047.644	1950.846
4	64.325	1031.592	1951.732
5	66.327	1018.340	1900.017
6	61.926	1029.917	1913.696
Promedio	64.925	1022.783	1957.009
D.E.	1.853	18.756	53.831
C.V. (%)	2.854	1.834	2.751
Desv. Abs. (%)	8.752	6.108	9.036

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 71. Estabilidad a largo plazo de etambutol en congelación a -70°C en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida (% recuperación).

% de recuperación de muestras plasmáticas recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	97.808	94.815	89.938
2	102.675	100.773	91.237
3	99.685	97.372	88.621
4	100.555	96.070	93.295
5	99.630	94.562	86.130
6	96.647	94.749	89.228
Promedio	99.500	96.390	89.741
D.E.	2.109	2.400	2.428
C.V. (%)	2.120	2.490	2.705
% de recuperación de muestras almacenadas en congelación a -70 °C durante 281 días.			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	107.153	101.748	102.598
2	111.985	99.173	98.690
3	109.147	104.764	97.542
4	107.208	103.159	97.587
5	110.545	101.834	95.001
6	103.210	102.992	95.685
Promedio	108.208	102.278	97.850
D.E.	3.089	1.876	2.692
C.V. (%)	2.854	1.834	2.751
Desv. Abs. (%)	8.752	6.108	9.036
Criterio de aceptación	85.000-115.000	85.000-115.000	85.000-115.000

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.17. Integridad de la dilución para rifampicina y etambutol.

5.2.17.1. Concentración dentro de la curva de calibración 5000 ng/mL de rifampicina y 2000 ng/mL de etambutol (IDD).

Se determinó la capacidad del método para cuantificar muestras empleando una dilución 1:2, se consideró que la prueba era aceptable si la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada multiplicando por un factor de dilución de 2 no excedía el 15% del promedio del valor nominal. Los resultados para rifampicina se muestran en la Tabla 72 y para etambutol en la Tabla 73.

Tabla 72. Integridad de la dilución dentro del rango de cuantificación de rifampicina.

RIFAMPICINA (VALOR NOMINAL DE 5000 ng/mL)	
Muestra	Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2
1	4355.119
2	4328.882
3	4557.977
4	4167.023
5	4537.096
6	4187.267
Promedio	4355.561
D. E.	166.438
C. V. (%)	3.821
Desv. Abs. (%)	12.658

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 73. Integridad de la dilución dentro del rango de cuantificación de etambutol.

ETAMBUTOL (VALOR NOMINAL DE 2000 ng/mL)	
<i>Muestra</i>	<i>Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2</i>
1	1707.798
2	1690.758
3	1814.152
4	1606.699
5	1787.962
6	1647.423
Promedio	1709.132
D. E.	79.854
C. V. (%)	4.672
Desv. Abs. (%)	14.234

Con los resultados anteriores se demuestra que es posible tomar una cantidad menor de muestra y completar a 50 μ L con plasma libre de fármaco sin afectar el resultado para la cuantificación tanto de rifampicina como de etambutol.

5.2.17.2. Concentración fuera de la curva de calibración 10000 ng/mL de rifampicina y 4000 ng/mL de etambuto (IDF).

Se determinó la capacidad del método para cuantificar muestras que pudieran estar fuera del rango de cuantificación, empleando una dilución 1:2, se consideró que la prueba era aceptable si la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada multiplicando por un factor de dilución de 2 no excedía el 15% del promedio del valor nominal. Los resultados para rifampicina se muestran en la Tabla 74 y para etambutol en la Tabla 75.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 74. Integridad de la dilución fuera del rango de cuantificación de rifampicina.

RIFAMPICINA (VALOR NOMINAL DE 10 000 ng/mL)	
<i>Muestra</i>	<i>Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2.</i>
1	9570.965
2	9161.852
3	8997.472
4	9305.170
5	9137.074
6	9750.859
Promedio	9320.565
D. E.	286.823
C. V. (%)	3.077
Desv. Abs. (%)	6.548

Tabla 75. Integridad de la dilución fuera del rango de cuantificación de etambutol.

ETAMBUTOL (VALOR NOMINAL DE 4000 ng/mL)	
<i>Muestra</i>	<i>Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2</i>
1	3673.801
2	3530.297
3	3448.630
4	3546.467
5	3490.578
6	3722.994
<i>Promedio</i>	3568.795
<i>D. E.</i>	107.090
<i>C. V. (%)</i>	3.001
<i>Desv. Abs. (%)</i>	10.457

Los resultados anteriores demuestran que es posible tomar una cantidad menor de muestra y completar a 50 μ L con plasma libre de fármaco sin afectar el resultado para la cuantificación de ambos analitos.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.18. Tolerancia del método analítico.

5.2.18.1. Tolerancia a plasma lipémico.

Se evaluó el efecto que tienen las muestras lipémicas sobre la cuantificación de rifampicina y etambutol (efecto de la matriz biológica). Se consideró que este tipo de muestras no afectaba la cuantificación si la de desviación absoluta (%) de su concentración interpolada con respecto a su respectivo valor nominal no era mayor a un 15%. Los resultados de tolerancia en plasma lipémico para rifampicina se muestran en la Tabla 76 y para etambutol en la Tabla 77.

Tabla 76. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma lipémico.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	292.738	2483.518	5062.333
2	284.957	2568.685	4663.945
3	278.642	2532.227	4952.669
4	274.690	2555.497	5042.832
5	291.640	2469.488	4914.822
6	299.978	2482.500	4829.171
Promedio	287.108	2515.319	4910.962
D. E.	9.470	42.278	148.165
C. V. (%)	3.298	1.681	3.017
Concentraciones en plasma lipémico			
1	293.137	2726.368	4922.209
2	298.990	2423.268	5174.861
3	306.002	2466.993	5186.715
4	320.425	2442.574	4997.235
5	295.613	2667.736	5233.471
6	315.655	2611.552	5198.099
Promedio	304.970	2556.415	5118.765
D. E.	11.112	128.842	126.980
C. V. (%)	3.644	5.040	2.481
Desv. Abs. (%)	6.222	1.634	4.231

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 77. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma lipémico.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	56.717	899.331	1990.975
2	53.945	1000.946	1856.961
3	56.087	1007.341	1935.428
4	52.381	965.796	1960.460
5	59.670	961.664	1928.231
6	59.371	930.405	1930.783
Promedio	56.362	960.914	1933.806
D. E.	2.894	41.245	44.557
C. V. (%)	5.135	4.292	2.304
Concentraciones en plasma lipémico			
1	55.801	941.181	1944.265
2	58.285	902.654	2041.803
3	56.093	885.951	2001.568
4	57.209	930.727	1939.853
5	57.381	1007.114	2037.295
6	59.132	942.610	1935.164
Promedio	57.317	935.040	1983.325
D. E.	1.268	41.873	49.800
C. V. (%)	2.213	4.478	2.511
Desv. Abs. (%)	1.694	2.693	2.561

De los resultados anteriores se demuestra que el método es tolerante a plasma lipémico.

5.2.18.2. Tolerancia a plasma hemolizado.

Se evaluó el efecto que tienen las muestras hemolizadas sobre la cuantificación de rifampicina y etambutol (efecto de la matriz biológica). Se consideró que este tipo de muestras no afectaba la cuantificación si la de

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

desviación absoluta (%) de su concentración interpolada con respecto a su respectivo valor nominal no era mayor a un 15%. Los resultados de tolerancia en plasma hemolizado para rifampicina se muestran en la Tabla 78 y para etambutol en la Tabla 79.

Tabla 78. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma hemolizado.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	292.738	2483.518	5062.333
2	284.957	2568.685	4663.945
3	278.642	2532.227	4952.669
4	274.690	2555.497	5042.832
5	291.640	2469.488	4914.822
6	299.978	2482.500	4829.171
<i>Promedio</i>	287.108	2515.319	4910.962
<i>D. E.</i>	9.470	42.278	148.165
<i>C. V. (%)</i>	3.298	1.681	3.017
Concentraciones en plasma hemolizado			
1	311.097	2540.801	5085.279
2	310.343	2589.380	5131.249
3	324.037	2623.662	5365.323
4	321.037	2508.617	5469.331
5	308.446	2611.243	6218.107
6	311.153	2555.362	6240.603
<i>Promedio</i>	314.352	2571.511	5584.982
<i>D. E.</i>	6.485	44.220	519.209
<i>C. V. (%)</i>	2.063	1.720	9.297
<i>Desv. Abs. (%)</i>	9.489	2.234	13.725

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 79. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma hemolizado.

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	56.717	899.331	1990.975
2	53.945	1000.946	1856.961
3	56.087	1007.341	1935.428
4	52.381	965.796	1960.460
5	59.670	961.664	1928.231
6	59.371	930.405	1930.783
<i>Promedio</i>	56.362	960.914	1933.806
<i>D. E.</i>	2.894	41.245	44.557
<i>C. V. (%)</i>	5.135	4.292	2.304
Concentraciones en plasma hemolizado			
1	63.824	1020.303	2012.722
2	59.631	1017.077	1931.452
3	62.033	1058.382	2093.137
4	62.871	960.640	2152.424
5	62.774	1048.907	2443.395
6	61.001	1034.254	2481.766
<i>Promedio</i>	62.022	1023.261	2185.816
<i>D. E.</i>	1.503	34.584	227.289
<i>C. V. (%)</i>	2.423	3.380	10.398
<i>Desv. Abs. (%)</i>	10.043	6.488	13.032

De los resultados anteriores se demuestra que el método es tolerante a plasma hemolizado.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.18.3. Tolerancia al cambio en la temperatura de la columna cromatográfica 50 °C.

Se evaluó el efecto que tiene el cambio de temperatura de la columna (50°C) sobre la cuantificación de rifampicina y etambutol. El método mostró ser tolerante al cambio en la temperatura de la columna (de 45°C a 50°C), al presentar coeficientes de variación menores al 15% y una diferencia no mayor al 15% con respecto a las concentraciones recuperadas promedio en la condición original. Los resultados al cambio en la temperatura de la columna cromatográfica para rifampicina se muestran en la Tabla 80 y para etambutol en la Tabla 81.

Tabla 80. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en plasma, modificación en la temperatura de la columna.

Concentraciones plasmáticas en la condición original			
CONDICIÓN ORIGINAL	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
Temperatura de la columna 45°C	302.214	2526.558	4669.142
	311.107	2527.340	5022.229
	307.071	2581.019	4840.148
	307.275	2575.258	4967.051
	294.624	2564.083	4966.648
	300.335	2490.472	4829.864
Promedio	303.771	2544.122	4882.514
D. E.	5.914	35.207	129.491
C. V. (%)	1.947	1.384	2.652
Concentraciones plasmáticas en la condición de tolerancia			
CONDICIÓN MODIFICADA	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
Temperatura de la columna 50°C	307.800	2526.776	4810.241
	314.616	2542.791	4874.932
	314.101	2540.434	5023.292
	317.604	2640.262	5077.265
	297.552	2656.997	4969.350
	305.228	2466.635	4895.568
Promedio	309.484	2562.316	4941.775
D. E.	7.442	72.551	99.667
C. V. (%)	2.405	2.831	2.017
Desv. Abs. (%)	1.881	0.715	1.214

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 81. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en plasma, modificación en la temperatura de la columna.

Concentraciones plasmáticas en la condición original			
CONDICIÓN ORIGINAL	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
Temperatura de la columna 45°C	60.443	1027.474	1857.553
	61.199	1024.919	1968.657
	61.955	1036.147	1916.011
	62.734	1041.161	1993.103
	59.131	1017.826	1952.247
	58.711	999.860	1836.641
Promedio	60.696	1024.565	1920.702
D. E.	1.578	14.655	62.630
C. V. (%)	2.599	1.430	3.261
Concentraciones plasmáticas en la condición de tolerancia			
CONDICIÓN MODIFICADA	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
Temperatura de la columna 50°C	55.513	987.452	1896.709
	59.199	1006.608	1916.723
	59.706	1014.587	1961.060
	61.357	1049.723	1933.112
	57.715	1029.061	1923.510
	59.088	962.831	1851.548
Promedio	58.763	1008.377	1913.777
D. E.	1.979	30.631	37.086
C. V. (%)	3.367	3.038	1.938
Desv. Abs. (%)	3.184	1.580	0.361

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.18.4. Tolerancia a la presencia de isoniazida y pirazinamida.

Se demostró la tolerancia del método a la presencia de isoniazida y pirazinamida, al no verse afectada la cuantificación de rifampicina y etambutol en presencia de éstos analitos concomitantes, ya que se obtuvieron desviaciones absolutas (%) menores al 15% con respecto a las muestras libres de los analitos concomitantes. Los resultados de esta tolerancia para rifampicina y etambutol se muestran en la Tabla 82 y Tabla 83 respectivamente.

Tabla 82. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en presencia de isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras en ausencia de isoniazida y pirazinamida			
Muestra	Control Bajo (300 ng/mL)	Control Medio (2500 ng/mL)	Control Alto (5000 ng/mL)
1	295.773	2543.725	4817.315
2	291.232	2432.648	5090.333
3	308.100	2465.065	5096.999
4	292.695	2469.519	5109.996
5	310.634	2458.726	4967.697
6	297.240	2495.089	4752.869
Promedio	299.279	2477.462	4972.535
D. E.	8.140	38.151	155.327
C. V. (%)	2.720	1.540	3.124
Concentraciones en presencia de isoniazida y pirazinamida			
1	320.577	2519.419	4835.096
2	302.121	2517.949	4977.969
3	307.260	2532.339	2493.975*
4	293.398	2501.347	5026.327
5	310.446	2602.890	4891.915
6	296.004	2539.692	4826.933
Promedio	304.968	2535.606	4911.648
D. E.	10.012	35.502	88.000
C. V. (%)	3.283	1.400	1.792
Desv. Abs. (%)	1.901	2.347	1.224

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 83. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en presencia de isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras en ausencia de isoniazida y pirazinamida			
Muestra	Control Bajo (60 ng/mL)	Control Medio (1000 ng/mL)	Control Alto (2000 ng/mL)
1	57.199	947.174	1869.058
2	54.230	951.013	1962.647
3	55.864	944.785	1897.305
4	53.842	930.369	1940.246
5	58.503	959.015	1905.587
6	56.988	957.442	1868.597
<i>Promedio</i>	56.104	948.300	1907.240
<i>D. E.</i>	1.812	10.401	37.979
<i>C. V. (%)</i>	3.230	1.097	1.991
Concentraciones en presencia de isoniazida y pirazinamida			
1	61.203	944.108	1832.003
2	55.734	922.583	1882.831
3	55.820	939.255	921.466*
4	56.378	942.414	1887.711
5	56.089	954.153	1859.248
6	54.734	917.088	1794.244
<i>Promedio</i>	56.660	936.600	1851.207
<i>D. E.</i>	2.294	14.018	38.765
<i>C. V. (%)</i>	4.049	1.497	2.094
<i>Desv. Abs. (%)</i>	0.990	1.234	2.938

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Así mismo, se demostró que en muestras correspondientes al LIC de rifampicina en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida no afectó la cuantificación del analito, ya que se obtuvieron desviaciones absolutas (%) menores al 20% con respecto a las muestras libres de los analitos concomitantes. De la misma manera, se demostró que en muestras correspondientes al LIC de etambutol en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida no afectó la cuantificación del analito ya que se obtuvieron desviaciones absolutas (%) menores al 20% con respecto a las muestras libres de los analitos concomitantes. Los resultados de esta tolerancia para rifampicina y etambutol se muestran en la Tabla 84 y Tabla 85 respectivamente.

Tabla 84. Tolerancia del método analítico para cuantificar rifampicina en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras en ausencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida	
Muestra	Límite Inferior de Cuantificación (100 ng/mL)
1	100.355
2	95.013
3	100.184
4	95.570
5	94.823
6	103.606
Promedio	98.259
D. E.	3.640
C. V. (%)	3.705
Concentraciones en presencia de etambutol, isoniazida y pirazinamida	
1	90.430
2	92.964
3	97.130
4	97.651
5	99.774
6	103.387
Promedio	96.889
D. E.	4.654
C. V. (%)	4.804
Desv. Abs. (%)	1.393

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 85. Tolerancia del método analítico para cuantificar etambutol en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida.

Concentraciones plasmáticas de muestras en ausencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida	
Muestra	Límite Inferior de Cuantificación (20 ng/mL)
1	*
2	18.503
3	17.007
4	*
5	16.674
6	15.751
<i>Promedio</i>	16.984
<i>D. E.</i>	1.144
<i>C. V. (%)</i>	6.734
Concentraciones en presencia de rifampicina, isoniazida y pirazinamida	
1	17.558
2	18.593
3	17.010
4	18.282
5	18.428
6	19.267
<i>Promedio</i>	18.190
<i>D. E.</i>	0.797
<i>C. V. (%)</i>	4.384
<i>Desv. Abs. (%)</i>	7.100

*Muestras que no presentan respuesta por confusión de adición del analito

6. CONCLUSIONES.

Se desarrolló la metodología analítica para cuantificar simultáneamente rifampicina y etambutol en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de espectrometría de masas-masas. Se validó el método analítico conforme a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, así como los requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen estas pruebas; y de acuerdo al tipo de tecnología empleada, se incluyeron parámetros considerados en guías internacionales (FDA, EMA, ANVISA). El método analítico fue lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones evaluado tanto para rifampicina y etambutol, también se demostró la selectividad del mismo. Se determinó la estabilidad de las muestras plasmáticas conteniendo rifampicina y etambutol en las diferentes condiciones de manejo y almacenamiento.

Por lo que la metodología analítica para cuantificar rifampicina y etambutol en muestras plasmáticas es confiable, pudiendo ser aplicada en estudios clínicos tales como: monitoreo terapéutico individual, estudios de biodisponibilidad o en estudios de bioequivalencia.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. [ed.] Sherris, J. C., Ryan, K. J. y Ray, C. G. Microbiología Médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. Mc GRAW HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V., México, 2005, 4a. ed., págs. 477-490.
2. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. *Programa de Acción Específico 2007-2012. Tuberculosis*. Recuperado el 10 de Junio de 2013. http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/proy_prog/14._pct.pdf.
3. World Health Organization. *Tuberculosis (TB), Global Tuberculosis Report 2012*. Recuperado el 15 de Junio de 2013. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. ISBN 978 92 4 156450 2.
4. Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología médica*. Mc GRAW HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V., México, D.F., 2011, 25a. ed., págs. 289-297, 337.
5. Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. *BROCK. Biología de los microorganismos..* Pearson Prentice Hall, Madrid 2004, 10a. ed., págs. 414, 874-877.
6. Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M.C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. *Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis*. 2, Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Vol. 18, No. 2 (Abril-Junio de 2005), págs. 142-153.
7. Alcaide, F., Moreno, J. E., González, J., & Palacios, J. J. *Micobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica*, SEIMC. 2005. Recuperado el 6 de Junio de 2013. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>. 84-609-7032-9.

8. [ed.] Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L. *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc GRAW HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V., México, 2007, 11a. ed., págs. 1203-1216.
9. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.
10. Organización Mundial de la Salud. *Países. México*. Recuperado el 10 de Junio de 2013. <http://www.who.int/countries/mex/es/>.
11. Organización Mundial de la Salud. *Centro de prensa. Tuberculosis*. Marzo de 2013. Recuperado el 10 de Junio de 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>.
12. Secretaría de Salud. *Programa Nacional de Salud 2001-2006*. Recuperado el 15 de Junio de 2013. <http://www.salud.gob.mx/docprog/Pns-2001-2006/PNS-completo.pdf>.
13. Drugbank. Recuperado el 18 de Junio de 2013. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00330>.
14. PubChem. *Ethambutol*. Recuperado el 20 de Mayo de 2013. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3279#x27>.
15. Vademecum.es. *Etambutol*. Recuperado el 18 de Junio de 2013. <http://www.vademecum.es/principios-activos-etambutol-j04ak02>.
16. Salud.es. *Myambutol*. Recuperado el 2 de Junio de 2013. <http://www.salud.es/medicamento/myambutol-400-mg-1000-grageas>.
17. Sosa M., Széliga y Fernández A., Bregni C. *Rifampicina y biodisponibilidad en productos combinados*. Ars Pharm, Buenos Aires, Argentina, Vol. 46, No. 4 (2005), págs. 353-364.
18. PLM. *Diccionario de especialidades farmacéutica*. Thompson, 2012.
19. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Tuberculosis*. Recuperado el 20 de septiembre de 2013. <http://www.niaid.nih.gov/Pages/default.aspx>.

20. Skoog, D. A., West, F. J., & Crouch, S. R.. *Fundamentos de Química analítica*. Thomson, 2005, 8a. ed., págs. 931-932, 985-994.
21. Rubinson , K. A. & Rubinson, J. F. *Análisis instrumental*. Pearson educación S.A., Madrid, 2001, págs. 521-572, 583-587.
22. [ed.] Smyth, M. R. *Drug analysis in biological fluids. Chemical Analysis in Complex Matrices*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1992, 1a. ed., págs. 17-53.
23. Lamond Laboratory. Recuperado el 20 de septiembre de 2013.
<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>.
24. Universidad de Santiago Compostela. Recuperado el 20 de septiembre de 2013. <http://usc.es/gl/investigacion/riaidt/espectrometria/experimentos.html>.
25. Agilent technologies. Recuperado el 20 de septiembre de 2013.
http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments_Systems/Masss-Spectrometry/Pages/default.aspx.
26. Universidad de Murcia. Recuperado el 20 de septiembre de 2013.
<http://www.um.es/LEQ/Atmosferas/index.htm>
27. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
28. Food & Drug Administration FDA, Mayo 2001, Bioanalytical Method Validation.
29. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
30. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Resolução-RDC No 27, de 17/05/2012 Dou 22/05/2012.

31. Hughes, N. C., Wong, E., Fan, J., & Bajaj, N. *Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry-Based Chromatography Assays*. The APPS Journal, Vol. 9, No. 3 (2007), págs. E353-E360.
32. Instituto Nacional de Geriatria. *Programa Nacional de Salud 2007-2012*. Recuperado el 15 de junio de 2013.
http://www.geriatria.salud.gob.mx/descargas/programa_nacional_salud.pdf.
33. Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.
34. Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté, México, 3a.ed., págs. 517-539.
35. Le Guellec, C., Gaudet, M. L., Lamanetre, S., & Breteau, M. *Stability of Rifampin in Plasma: Consequences for Therapeutic Monitoring and Pharmacokinetic Studies*. Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 19, No. 6 (1997), págs. 669-674.
36. Song, S. H., Jun, S. H., Park, K. U., Yoon, Y., Lee, J. H., Kim, J. Q., y otros. *Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry RCM, No. 21 (2007), págs. 1331-1338.
37. Fang, P., Cai, H., Li, H., Zhu, R., Tan, Q., & Gao, W. *Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 878 (2010), págs. 2286-2291.
38. Fox, D., O'Connor, R., Mallon, P., & McMahon, G. *Simultaneous determination of efavirenz, rifampicin and its metabolite desacetyl rifampicin levels in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56 (2011), págs. 785-791.
39. Gong, Z., Basir, Y., Chu, D., McCort-Tipton M. *A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous*

BIBLIOGRAFÍA

analysis of anti-tuberculosis drugs ethambutol and pyrazinamide in human plasma. Journal of Chromatography B, 877 (2009), págs. 1698-1704.