



**FACULTAD DE FARMACIA
CARRERA DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DESARROLLO DE UN METODO CROMATOGRAFICO PARA LA
MONITORIZACION FARMACOCINETICA DE CEFTAZIDIMA E
IMIPENEM EN PLASMA SANGUINEO**

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO

RODRIGO FELIPE OLIVARES TORRES.

Director: Jacqueline Concha Olmos.

Co-Director: Yanneth Moya Olave.

Valparaíso, 2013

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCION.....	10
1.1	Antibióticos	10
1.2	Clasificación según farmacocinética y farmacodinamia.....	10
1.3	Antibióticos Beta-lactámicos.....	12
1.3.1	Cefalosporinas.....	16
1.3.2	Carbapenem.....	18
1.4	Monitorización a niveles plasmáticos de los antibióticos.....	20
1.5	Consideraciones analíticas de las muestras a analizar	22
1.5.1	Tratamiento de muestras biológicas.....	22
1.5.2	Precipitación de proteínas	23
1.5.3	Extracción líquido - líquido	24
1.5.4	Extracción por pares iónicos	25
1.5.5	Reacción de derivatización precolumna.....	25
1.5.6	Dilución	26
1.5.7	Bases de la separación cromatográfica.....	26
1.6	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	27
1.7	Validación de método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento	28
1.7.1	Selectividad y Especificidad	30
1.7.2	Linealidad	31
1.7.3	Sensibilidad (Límite de Detección y Límite de Cuantificación)	32
1.7.4	Precisión.....	34
1.7.5	Exactitud	36
1.7.6	Robustez.....	37
1.8	Condiciones cromatográficas para la determinación de ceftazidima e imipenem por HPLC	40
2	HIPÓTESIS	43
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	General	44
3.2	Específicos.....	44
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.1	Instrumentos y equipos	45
4.2	Reactivos	45
4.3	Materiales de laboratorio	46
4.4	Metodología.....	46
4.4.1	Extracción de antibióticos desde plasma.....	46
4.4.2	Condiciones Cromatográficas	47
4.4.3	Validación del método HPLC	49
5	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	54
5.1	Validación metodología analítica	54
5.1.1	Determinación de las condiciones de trabajo.....	54
5.1.2	Parámetros de linealidad	58
5.1.3	Parámetros de sensibilidad.....	61
5.1.4	Parámetros de precisión	64
5.1.5	Parámetros de exactitud	68
5.1.6	Parámetros de robustez	71
5.1.7	Parámetros de especificidad.....	74
6	CONCLUSIÓN	80
7	BIBLIOGRAFIA	81
8	ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Clasificación de antimicrobianos en función de patrón de actividad (Roberts <i>et al.</i> , 2010).....	11
Tabla 1-2. Clasificación general de los antibióticos beta-lactámicos (Marín y Gudiol., 2003).....	15
Tabla 1-3. Datos requeridos para la validación según ISP (Merino <i>et al.</i> , 2010).	29
Tabla 1-4. Esquema general para el desarrollo de un plan de validación.	39
Tabla 1-5. Condiciones cromatográficas determinación antibióticos beta-lactámicos	41
Tabla 4-1. Diseño experimental para la determinación de ceftazidima e imipenem por cromatografía líquida (HPLC).	47
Tabla 5-1. Diseño factorial experimental para la determinación de las condiciones de trabajo para ceftazidima e imipenem.	54
Tabla 5-2. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para ceftazidima en columna C18....	55
Tabla 5-3. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para ceftazidima en columna C8....	55
Tabla 5-4. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para imipenem en columna C18.	56
Tabla 5-5. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para imipenem en columna C8.	56
Tabla 5-6. Condiciones de trabajo elegidas para el desarrollo del método de validación.	57
Tabla 5-7. Prueba de linealidad para la determinación de Ceftazidima.....	58
Tabla 5-8. Resultados ensayos t student para determinar correlación lineal.	59
Tabla 5-9. Prueba de linealidad para la determinación de Imipenem.	60
Tabla 5-10. Resultados ensayos t student para determinar correlación lineal.	60
Tabla 5-11. Resultados regresión de la curva desviación estándar vs linealidad de la concentración. Valores de Limite de Detección y Límite de Cuantificación.....	62
Tabla 5-12. Resultados regresión de la curva desviación estándar vs linealidad de la concentración. Valores de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.....	64
Tabla 5-13. Resultados de precisión para el método de determinación de ceftazidima.....	65
Tabla 5-14. Resultados precisión intermedia ceftazidima (50 ppm).....	65
Tabla 5-15. Resultados de precisión para el método de determinación de ceftazidima.....	66
Tabla 5-16.....	67
Tabla 5-17. Resultados exactitud para la determinación de ceftazidima a diferentes concentraciones.	68
Tabla 5-18. Resultados exactitud para la determinación de ceftazidima para las 9 mediciones ensayadas.	69
Tabla 5-19. Resultados exactitud para la determinación de imipenem a diferentes concentraciones.	70
Tabla 5-20. Resultados exactitud para la determinación de imipenem para las 9 mediciones ensayadas.	70
Tabla 5-21. Variación de parámetros experimentales en la respuesta obtenida para ceftazidima.	71
Tabla 5-22. Variación de parámetros experimentales en la respuesta obtenida para Imipenem.....	73
Tabla 5-23. % Recuperación después de degradación artificial de ceftazidima según agentes que se indican.....	74
Tabla 5-24. Respuesta del imipenem a las diferentes exposiciones de degradación sometidas.	75
Tabla 5-25. % Recuperación de degradación artificial de imipenem según agentes que se indican.	77

Tabla 5-26. Respuesta del imipenem a las diferentes exposiciones de degradación sometidas.	78
Tabla 8-1. Cromatogramas de ceftazidima obtenidos a las diferentes condiciones de trabajo analizadas.....	84
Tabla 8-2. Cromatogramas de imipenem obtenidos a las diferentes condiciones de trabajo analizadas.....	86
Tabla 8-3. Áreas bajo la curva promedio y desviación estándar para concentraciones seleccionadas de ceftazidima	88
Tabla 8-4. Áreas bajo la curva promedio y desviación estándar para concentraciones seleccionadas de imipenem.....	89
Tabla 8-5. Área bajo la curva para concentraciones seleccionadas para ceftazidima.....	90
Tabla 8-6. Área bajo la curva para concentraciones seleccionadas para imipenem.....	90
Tabla 8-7. Áreas y porcentajes de recuperación de ceftazidima para las diferentes inyecciones.	91
Tabla 8-8. Áreas y porcentajes de recuperación de ceftazidima para las diferentes inyecciones.	92
Tabla 8-9. Áreas y porcentajes de recuperación para las diferentes inyecciones para ceftazidima. ..	93
Tabla 8-10. Áreas y porcentajes de recuperación del imipenem para las diferentes inyecciones.....	94
Tabla 8-11. Áreas y porcentajes de recuperación del imipenem para las diferentes inyecciones.....	95
Tabla 8-12. Áreas y porcentajes de recuperación para las diferentes inyecciones para Imipenem....	96
Tabla 8-13. Áreas bajo la curva de para concentraciones seleccionadas de ceftazidima.....	97
Tabla 8-14. Comparación entre el porcentaje de ceftazidima y el detectado por HPLC.	97
Tabla 8-15. Áreas bajo la curva de para concentraciones seleccionadas de Imipenem.	98
Tabla 8-16. Comparación entre el porcentaje de ceftazidima y el detectado por HPLC.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1-1. Dinámicas farmacocinéticas entre la administración de beta-lactámicos mediante infusión intermitente y continua (Aguilar <i>et al</i> , 2005).....	12
Figuras 1-2. Estructura química de los beta-lactámicos (Flores <i>et al</i> , 1998).....	13
Figuras 1-3. Núcleos de antibióticos beta-lactámicos y el grupo antibiótico al cual pertenecen (Flores <i>et al</i> , 1998).....	14
Figuras 1-4. Núcleo cefalosporínico (Flores <i>et al</i> , 2009).....	16
Figuras 1-5. Estructura química de ceftazidima (Flores <i>et al</i> , 1998).....	18
Figuras 1-6. Núcleo carbapenémico (Flores <i>et al</i> , 1998).	18
Figuras 1-7. Estructura química de imipenem (Flores <i>et al</i> , 1998).....	20
Figuras 5-1. Ceftazidima a las condiciones elegidas (condición 3).	57
Figuras 5-2. Imipenem a las condiciones elegidas (condición 3).	58
Figuras 5-3. Regresión lineal para la determinación de sensibilidad del método para la determinación de ceftazidima. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.	62
Figuras 5-4. Regresión lineal para la determinación de sensibilidad del método para la determinación de Imipenem. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %...	63
Figuras 8-1. Regresión lineal para la determinación de Ceftazidima por cromatografía líquida (HPLC). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.....	88
Figuras 8-2. Regresión lineal para la determinación de Imipenem por cromatografía líquida (HPLC). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.....	89

Dedicatoria

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis de grado es inevitable que te asalte un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, hubiese sido imposible sin la participación de personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término.

Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos. Debo agradecer de manera especial y sincera a la Profesora Jacqueline Concha por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación persona. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A la Profesora Yanneth Moya por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis como co-directora de esta.

A mis amigos que me apoyaron y creyeron en mí en todo momento.

Quise dejar para el final un agradecimiento muy especial que es a mis Padres Juan Olivares y Marta Torres que siempre creyeron en mí y que sin su apoyo incondicional y en todo momento nada de esto habría sido posible y a mi hermano Juan Luis que tuvo que soportarme mientras realizaba este trabajo y

A todos ellos muchas gracias.

RESUMEN

La ceftazidima e imipenem son antibióticos beta-lactámicos con mecanismo de acción tiempo dependiente y de uso restringido en el ámbito hospitalario. Por estos motivos obtener diseños de tratamientos que aseguren niveles plasmáticos de los antibacterianos por encima de la concentración inhibitoria mínima, inclusive en sus primeras dosis, es fundamental para garantizar la efectividad de la terapia farmacológica.

Actualmente no existen métodos efectivos, con resultados confiables, rápidos, y de fácil manejo para la medición de estos antibióticos en plasma. En este trabajo se plantea el desarrollo de una técnica de determinación de ceftazidima e imipenem mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo en plasma cumpliendo los parámetros que indica el Instituto de Salud Pública de Chile y la Farmacopea americana, que eventualmente permitirá, de acuerdo a los resultados obtenidos, la monitorización de ceftazidima e imipenem en los casos que sea necesario y en el momento oportuno teniendo los resultados en forma rápida y confiable.

ABSTRACT

Ceftazidime and imipenem are beta-lactam antibiotics, their action is time dependent and their use is restricted in the hospital setting. For these reasons to obtain an effective dosing regimen, able to ensure plasma levels above the minimum inhibitory concentration, even during the first doses, is fundamental to ensure a successful treatment using these pharmacological agents.

Currently there are not effective methods which provide swift and valid results and that are easy to implement in order to measure the levels of these antibiotics of plasma. In this thesis we propose the development and implementation of a technique to measure plasma plasma levels of ceftazidime and imipenem using high performance liquid chromatography. Following the parameters set by The Institute of Public Health of Chile and the United States Pharmacopeia. This technique would allow, in accordance with the results obtained, the monitoring of ceftazidime and imipenem, in case where there is a clinical need and at an optimal time. Furthermore this technique would be able to provide rapid and reliable results.

1 INTRODUCCION

1.1 Antibióticos

Los antibióticos constituyen uno de los hitos más importantes de la historia de la medicina, al reducir las cifras de mortalidad con su introducción en la clínica a principios de la década de los 40 (Sánchez, 2006). Actualmente existe una gran cantidad de antibióticos, algunos, modernos, que representan armas poderosas, otros, más antiguos, que han caído en cesación. Sin embargo, penicilinas, vancomicina y tetraciclinas, cuando son utilizados racionalmente, y dejando de lado algunas cepas bacterianas resistentes, siguen exhibiendo la eficacia del momento de su descubrimiento (Gonzales y Calvo, 2005).

1.2 Clasificación según farmacocinética y farmacodinamia

De acuerdo con la actividad y la duración de su efecto, los antimicrobianos se clasifican en dos grandes categorías (**Tabla 1-1**): tiempo-dependiente y concentración-dependiente. En el caso de los primeros éstos se caracterizan porque el éxito de la terapia viene dado por mantener concentraciones por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y por el mayor tiempo posible inter-dosis (tiempo por encima de CIM). Mientras que los antibióticos concentración-dependiente deben su éxito terapéutico al logro de un buen pico sérico de concentración (Pico/CIM) o una buena área bajo la curva (AUC/CIM), dependiendo de cada droga (Calvo *et al.*, 2004). Cabe señalar que en terapia antimicrobiana, la concentración inhibitoria mínima ha sido el indicador más utilizado. Esta se define como la concentración más baja de fármaco que previene el crecimiento visible de microorganismos transcurridos 18 y 24 horas de cultivo. Con este criterio, un antibiótico será capaz de inhibir el desarrollo de bacterias si un antibiótico se mantiene en el organismo en concentraciones por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo (Aguilar *et al.*, 2005).

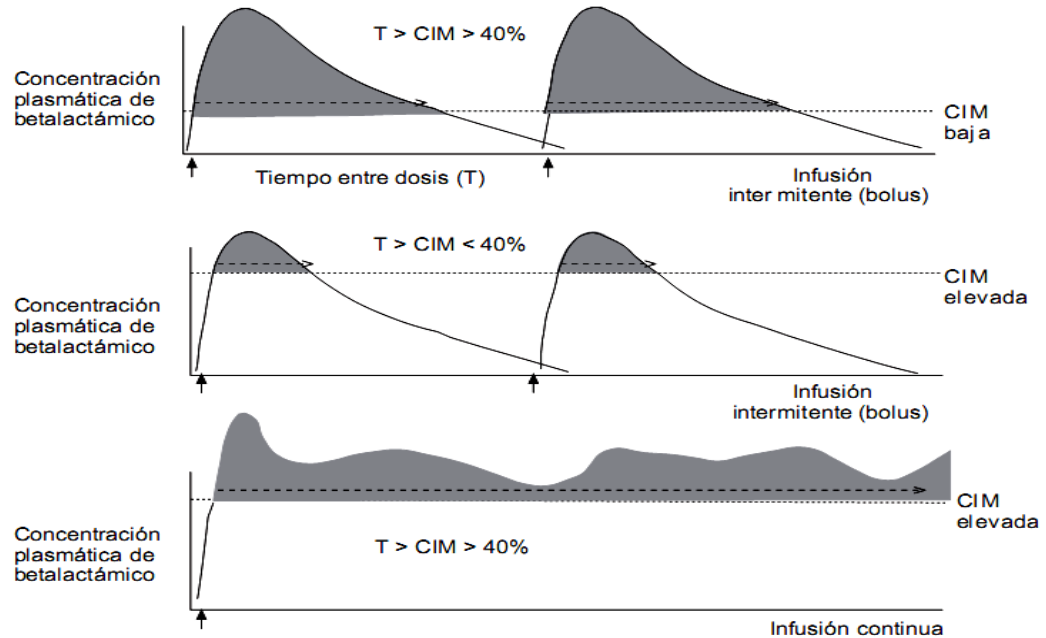
Tabla 1-1. Clasificación de antimicrobianos en función de patrón de actividad (Roberts *et al.*, 2010).

Patrón de actividad	Antimicrobiano	Objetivo del tratamiento
Concentración dependiente y prolongados efectos persistentes	Aminoglucósidos Fluoroquinolonas Daptomicina Cetolidos Polienos Equinocandinas	Alcanzar máximas concentraciones en el sitio de la infección
Tiempo dependientes con moderados a prolongados efectos persistentes	Grupo MLS (macrólidos, lincosaminas, streptograminas) Tetraciclinas Glicopéptidos Oxazolidinonas Triazoles	Aumentar la cantidad de medicamento administrado
Tiempo dependiente con mínimo o ningún efecto persistente	Betalactámicos	Prolongar el tiempo de exposición de la bacteria al medicamento

Tal como se observa en la tabla, la actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica de los β -lactámicos se relacionan con el tiempo durante la concentración plasmática del antimicrobiano que excede la CIM ($T > CIM$). Para la mayoría de infecciones se considera adecuado que el tiempo que supera la CIM sea como mínimo del 40% del intervalo entre dosis; pero en pacientes neutropénicos o con meningitis es recomendable que sea de un 100% por encima de la CIM (Flores *et al.*, 1998).

En la **Figura 1-1** se muestran las dinámicas farmacocinéticas entre la administración de betalactámicos mediante infusión intermitente y continua. Los diagramas dan cuenta de como la forma de administracion influye en el tiempo en que el antibiotico β -lactámico permanece sobre la CIM. Asimismo se puede observar que la efectividad del tratamiento se relaciona directamente con el tiempo en que el β -lactámico se encuentra por sobre la CIM. La determinación de la concentración plasmática del antibiótico en una forma rápida, (por ejemplo en una administración por bolos), podria entrega una información valiosa al

terapeuta de manera de realizar las acciones correctivas que permitan asegurar su permanencia por sobre el CIM.

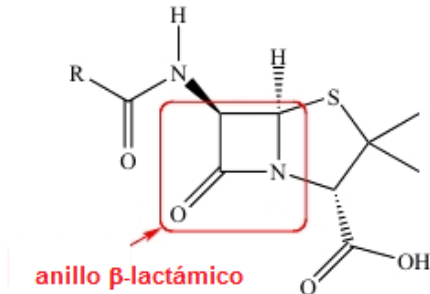


Figuras 1-1. Dinámicas farmacocinéticas entre la administración de beta-lactámicos mediante infusión intermitente y continua (Aguilar *et al*, 2005).

1.3 Antibióticos Beta-lactámicos

Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Su acción es principalmente bactericida y su efecto es lento y dependiente del tiempo. A lo largo de los años se han desarrollado nuevos integrantes en esta familia que han permitido aumentar el espectro de acción incorporando fármacos que presentan mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos. Sin embargo la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones (Marín y Gudiol, 2003). Con la denominación de antibióticos beta-lactámicos existen de origen natural o semi-sintético que se caracterizan por presentar en su estructura un anillo beta-lactámico (**Figura 1-2**). Este anillo tiene la propiedad de presentar afinidad por las enzimas que catalizan la síntesis de una estructura que es única de la célula

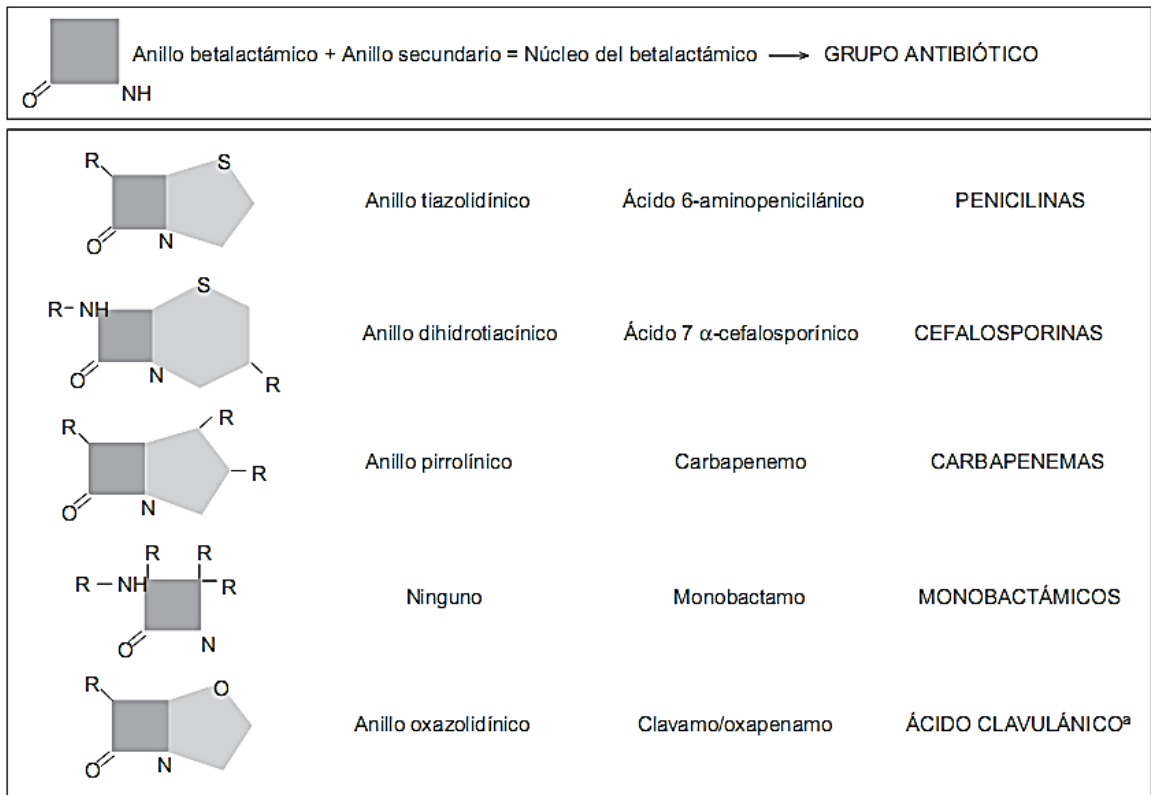
bacteriana: la pared celular. Esta propiedad le confiere a estos antibióticos una baja toxicidad, con un alto índice terapéutico.



Figuras 1-2. Estructura química de los beta-lactámicos (Flores *et al.*, 1998).

Es importante destacar que para que el antibiótico beta-lactámico sea activo, es preciso que este unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los dos anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos, agrupados según su estructura y espectro antimicrobiano en penicilinas, cefalosporinas, inhibidores de las beta-lactamasas, carbapenemos y monolactamos.

En la **Figura 1-3** se representa de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos de antibióticos beta-lactámicos. Las diferencias en la conformación química presente en las diferentes familias y las que existen entre miembros de cada familia conlleva a distintos espectros de acción y distintos grados de resistencia a beta-lactamasas las cuales se mencionan en la **Tabla 1-2**.



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figuras 1-3. Núcleos de antibióticos beta-lactámicos y el grupo antibiótico al cual pertenecen (Flores *et al*, 1998).

Procurando el uso racional de estos antimicrobianos, se ha determinado que algunos de los integrantes de esta familia, debido a su importancia epidemiológica, poseen restricción en su dispensación, es decir, son protegidos del uso indiscriminado en el hospital. Dos ejemplos de ello son la ceftazidima que pertenece a la familia de las cefalosporinas, que se reserva para infecciones graves que involucren a *Pseudomona aeruginosa* (Flores *et al*, 1998), y el imipenem que pertenece a la familia de los carbopenem con un rango muy amplio de actividad antibiótica y su uso es reservado para gérmenes que han presentado resistencia a tratamiento antimicrobianos de primera línea (Aguilar *et al*, 2005).

Tabla 1-2. Clasificación general de los antibióticos beta-lactámicos (Marín y Gudiol., 2003).

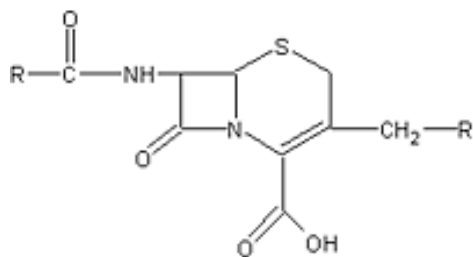
A. Penicilinas	B. Cefalosporinas
1. Naturales	1. De primera generación (cocos grampositivos)
Penicilina G (benzil) (sódica, potásica)	Cefalotina
Penicilina G procaina	Cefaloridina
Penicilina G benzatina	Cefazolina
2. Acido-resistentes	Cefapirina
Penicilina V	Cefalexina
Feneticilina	Cefacetile
Propicilina	Cefaloglicina
3. Resistentes a β -lactamasas (antiestafilococicas)	Cefadroxilo
Meticilina	Cefradina
Nafcilina	2. De segunda generación (anaerobias y gram negativos)
Isoxazolilpenicilinas	Cefuroxima
• Cloxacilina	Cefamandol
• Dicloxacilina	Cefoxitina
• Flutoxacilina	Cefmetazol
• Oxacilina	Cefatricina
4. Aminopenicilinas (amplio-espectro)	Cefaclor
Ampicilina	Cefotiam
• Bacampicilina	Cefonidic
• Metampicilina	Ceforanida
• Pivampicilina	Cefprocilo
• Talampicilina	3. De tercera generación(se amplía su espectro de acción)
Amoxicilina	Cefotaxima
Hetacilina	Ceftizoxima
Epicilina	Ceftazidima
Ciclacilina	Moxalactam
5. De amplio espectro (antipseudomonas)	Cefzulodima
Carbenizilinas	Cefoperazona
• Carfecilina	Ceftriaxona
• Carindacilina	Cefotetan
Ticarcilina	Cefmenoxima
Ureidopenicilinas	Cefixima
• Azlocilina	Cefpodoxima
• Mezlocilina	Ceftibuteno
Apalcilina	4. De cuarta generación (antipseudomona)
Piperacilina	Cefepima
6. Amidinopenicilinas	Cefpiroma
Mecilinam	C.Monobactamicos(gramnegativas aerobias)
Pivmecilinam	Aztreonam
6. Resistentes a β -lactamasas (gramnegativas)	Carumonam
Temocilina	D.Carbapenemes(amplio espectro resistentes a β -lactamasas)
	Imipenem
	Meropenem

1.3.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas, corresponden a una clase de antibióticos beta-lactámicos, son similares a las penicilinas, pero más estables ante muchas beta-lactamasas bacterianas y, por lo tanto, tienen un espectro de actividad más amplio (Zamora *et al*, 2009)

La primera cefalosporina fue aislada de cepas del hongo *Cephalosporium acremonium* de una alcantarilla en Cerdeña en 1948 por el científico italiano Giuseppe Brotzu. Él notó que estas cepas producían una sustancia eficaz contra la salmonela, *Salmonella typhi*. Del líquido de cultivo del hongo, se obtuvieron 3 antibióticos diferentes, denominados P (contra gram positivos), N (contra gram negativos y positivos) y C (parecido al N pero de menor potencia). La cefalosporina C fue aislada en la Escuela de Patología "Sir William Dunn" de la Universidad de Oxford y una molécula más eficaz derivada fue comercializada por la compañía Eli Lilly en la década de los sesenta (Flores *et al*, 1998).

La estructura química de las cefalosporinas deriva del ácido-7-cefalosporánico (Figura 1-4) que, de la misma forma que la penicilina, tiene un anillo beta-lactámico, y, además, un anillo dihidrotiazínico. La actividad antimicrobiana intrínseca de las cefalosporinas naturales es baja, pero la adición de diversos sustituyentes ha originado cientos de compuestos potentes y de baja toxicidad (Marín *et al*, 1998).



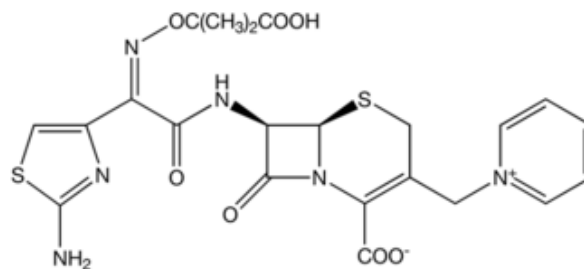
Figuras 1-4. Núcleo cefalosporínico (Flores *et al*, 2009)

Las cefalosporinas actúan de la misma manera que las penicilinas: interfiriendo en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana, e inhibiendo la transpeptidación final, necesaria para la reticulación. Esto genera un efecto bacteriolítico.

Son agrupadas en grupos denominados "generaciones" por sus características antimicrobianas. Las primeras cefalosporinas fueron agrupadas en la "primera generación" mientras que más adelante, cefalosporinas de espectro extendido fueron clasificadas como cefalosporinas de segunda generación. Cada nueva generación de cefalosporinas presenta más potencia frente a bacterias gram-negativas, características antimicrobianas perceptiblemente mayores que la generación precedente; actualmente se diferencian cuatro generaciones de cefalosporinas. Cabe destacar que las cefalosporinas de primera generación tienen mayor espectro de acción frente a estafilococo y estreptococo que las generaciones más recientes (Flores *et al*, 1998).

1.3.1.1 Ceftazidima

La ceftazidima es una cefalosporina de tercera generación considerada por algunos como antibiótico estratégico, pues es de los que se protegen del uso indiscriminado en el medio hospitalario. Se usa de forma controlada y se recomienda cuando se han transitado otros pasos en la política de antibiótico, y no se ha obtenido una respuesta adecuada. Una dosis de 500 miligramos en niños y 1 gramo en adultos por vía parenteral a los 5 minutos alcanza una concentración 45 y 90 µg/ml respectivamente (Flores *et al*, 1998). La unión a proteínas plasmáticas es de un 10 %, no es metabolizada en el organismo excretándose inalterada, en su forma activa, en orina por filtración glomerular; aproximadamente un 80 - 90 % de la dosis es recuperada en orina a las 24 horas.



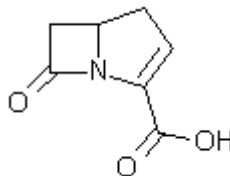
Figuras 1-5. Estructura química de ceftazidima (Flores *et al*, 1998).

1.3.1.2 Organismos sensibles a Ceftazidima

La ceftazidima tiene un espectro antibacteriano que incluye: *Streptococos*, *Stafilococos*, *E. Coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus* y enterobacterias (especialmente *Pseudomona sp*) y Bacteroides, es de uso restringido con el fin de evitar la aparición de resistencias bacterianas (Flores *et al*, 1998).

1.3.2 Carbapenem.

Los carbapenems corresponden a un tipo de antibióticos beta-lactámicos con amplio espectro de actividad bactericida y son sumamente resistentes a las beta-lactamasas. Esta clase de antibióticos fueron descubiertos originalmente del microorganismo *Streptomyces cattleya*, el cual, produce su propio antibiótico llamado tienamicina. Los carbapenems son sustancias de estructura beta-lactámica que se caracterizan por tener condensado con el anillo principal beta-lactámico otro no saturado de cinco átomos doble enlace entre 2 y 3 y que en la posición 1 tiene un átomo de carbono (**Figura 1-6**) (Arias *et al*, 1998).



Figuras 1-6. Núcleo carbapenemico (Flores *et al*, 1998).

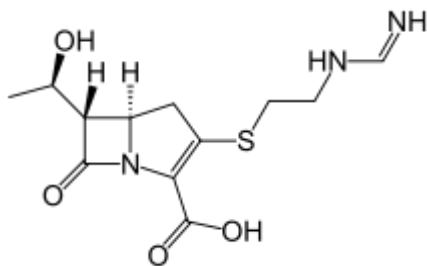
Las características que diferencian a los carbapenems de las penicilinas y cefalosporinas, es que en su anillo presenta un átomo de carbono en la posición 1, en sustitución del átomo de azufre que comúnmente tienen la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, de ahí se deriva su nombre. Junto con ello, presentan una insaturación entre el carbono 2 y el carbono 3 del anillo pentamérico. Es el más amplio de todos los antibióticos beta-lactámicos, los cuales incluyen bacterias Gram positivas y gram negativas, pero no actúan en bacterias que se desarrollan intracelularmente como *Chlamydia*. Su administración es únicamente por vía intravenosa, dado que su absorción por vía oral es muy poca. Se utilizan comúnmente en los hospitales para tratar infecciones severas. Sin embargo se han investigado formas nuevas de administración de estos antibióticos, incluyendo la vía oral (Rivero *et al*, 1998).

1.3.2.1 Imipenem

Es un antibiótico betalactámico de uso intravenoso desarrollado en 1985. Pertenece al subgrupo de los carbapenem. Se deriva de un compuesto llamado tienamicina que es producido por la bacteria *Streptomyces cattleya*. El imipenem interfiere con la síntesis de la pared celular de las bacterias sensibles. Es un medicamento altamente resistente a la hidrólisis por beta-lactamasas. Debe ser administrada por vía intravenosa o intramuscular porque no es absorbida eficazmente en el tracto gastrointestinal (Flores *et al*, 1998).

Imipenem actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana en varias bacterias gram-negativas y gram-positivas. Es estable en presencia de beta-lactamasas (penicilinas y cefalosporinas) producidas por diferentes bacterias. Su efecto neto se considera bactericida. Una dosis 500 mg en 20 a 30 minutos, 1000 mg durante 40 a 60 minutos. Para bacterias sensibles se prefiere la dosificación de 500 mg cada 6 horas, para bacterias menos sensibles (*Pseudomona aeruginosa*) se utiliza 1000 mg cada 6 a 8 horas alcanzando concentraciones séricas pico 21-58 µg/mL (Rivero *et al*, 1998).

La vida media de eliminación sérica es de una hora y el 20 % del fármaco se une a las proteínas del plasma. Se excreta por los riñones del 70-80 %, aunque no se observan concentraciones urinarias elevadas, ya que se hidroliza en el túbulo proximal por la enzima dehidropeptidasa y produce metabolitos nefrotóxicos (Flores *et al*, 1998).



Figuras 1-7. Estructura química de imipenem (Flores *et al*, 1998).

1.3.2.2 Organismos sensibles a Imipenem

El imipenem tiene un gran espectro antibacteriano que incluye bacterias Gram-negativas, tanto aerobias como anaerobias. Es especialmente potente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y especies de *Enterococcus*. No es efectivo contra *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia cepacia* ni *Stenotrophomonas maltophilia*. Imipenem, como otros medicamentos del grupo carbapenem, son de uso restringido con el fin de evitar la aparición de resistencias bacterianas (Flores *et al*, 1998).

1.4 Monitorización a niveles plasmáticos de los antibióticos

En la monitorización farmacológica, la posibilidad de ajustar la dosis de los antimicrobianos a partir de la determinación de sus concentraciones en plasma y/o tejidos infectados ha constituido un gran avance, debido a que permite individualizar el tratamiento farmacológico adaptándolo a la necesidad de cada paciente, para ello se pueden utilizar criterios clínicos, monitorizando parámetros vitales o parámetros bioquímicos (Flores *et al*, 1998). En la práctica clínica existen múltiples fármacos de uso frecuente que requieren de

monitorizaciones de niveles plasmáticos en forma periódica (Roberts J. *et al*, 2010). No obstante, la monitorización de niveles plasmáticos no está indicada para todos los fármacos, es decir, se aplican sólo a aquéllos de difícil manejo que cumplen los requisitos siguientes:

1. Amplia variabilidad interindividual, por lo que es impredecible la relación entre la dosis y la concentración plasmática o el efecto terapéutico. Los pacientes presentan múltiples características farmacocinéticas difíciles de predecir, que conlleva a la dosis necesaria para conseguir un efecto terapéutico sea muy diferente de unos sujetos a otros. La presencia de una enfermedad asociada es una de las principales indicaciones para medir los niveles plasmáticos, debido a las múltiples alteraciones farmacocinéticas que pueden aparecer.
2. Buena correlación entre las concentraciones plasmáticas y el efecto terapéutico o tóxico.
3. Estrecho rango terapéutico. Cuando existen pocas diferencias entre las dosis terapéuticas y las dosis tóxicas.
4. Dificultad para reconocer los efectos beneficiosos o tóxicos.

Si bien no es difícil manejar las dosis de ceftazima e imipenem en pacientes, su monitorización puede garantizar un tratamiento adecuado tanto en la dosis como en la vía de administración necesaria para el antibiótico, alcanzando también una concentración por encima de la CIM el mayor tiempo posible y en especial, las primeras 24 horas (Kumar *et al*, 2009). Esto incidirá directamente en un aumento de la recuperación y supervivencia, disminuyendo su estadía intrahospitalaria y reduciendo los costos relacionados con esta.

Adicionalmente, uno de los problemas o limitaciones para llevar a cabo la monitorización de antibióticos está en la variabilidad de procesos llevados a cabo para su determinación, tanto en la obtención de las muestras, como las técnicas utilizadas para su determinación, el sistema de corrección de dosis y los tiempos de respuestas, que varían dependiendo de cada hospital o centro de atención de salud, ya que cada uno posee su propio protocolo para esto, haciendo difícil realizar una comparación de resultados y de estudios multicéntricos que permitan la evaluación de ventajas clínicas en su aplicación (USP XXIX, 2006). Existen en

la actualidad distintas formas para la medición de beta-lactámicos los cuales han ido evolucionando con el tiempo, hasta llegar actualmente, a la determinación de niveles muy bajos (Robets J. *et al*, 2006).

1.5 Consideraciones analíticas de las muestras a analizar

1.5.1 Tratamiento de muestras biológicas

Hoy en día la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cromatográfica rápida y exacta. Varios métodos han sido desarrollados para la separación de ceftazidima e imipenem utilizando para ello HPLC. Algunos de ellos describen métodos que utilizan gradientes de elusión incluyendo buffer, metanol y acetonitrilo. En el análisis de sustancias por HPLC normalmente se trabaja con muestras biológicas que en general no se pueden inyectar directamente en el cromatógrafo, principalmente porque las proteínas precipitan en la columna, lo que aumenta la presión y como consecuencia se produce el derrumbamiento de la fase estacionaria. Esto explica, junto a otras razones, que sea necesario realizar un acondicionamiento previo de la muestra. Dicho acondicionamiento puede ser muy variado dependiendo tanto del tejido o fluido biológico del que se trate, como de la sustancia a analizar, y puede ir desde una simple precipitación hasta una combinación de varias técnicas (Quattrochi *et al*, 1992).

Según la complejidad del acondicionamiento a veces es necesario o no el uso de un estándar interno para la cuantificación de la sustancia en el medio biológico, siendo requisito cuanto más complejo sea el tratamiento requerido para el análisis de la muestra problema (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

1.5.2 Precipitación de proteínas

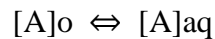
Las proteínas presentes en las matrices biológicas se deben eliminar antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteización y es una forma particular de separación de sustancias. Se realiza adicionando solventes orgánicos, sales, ácidos o cationes o bien por ultrafiltración. Los solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y en condiciones adecuadas, inducen su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteizar. Estos solventes orgánicos son utilizados en proporción 1/1. Tiene la ventaja que al no ser tan enérgicos no degradan la muestra. El principal problema que pueden plantear es que al ser precipitantes suaves queden proteínas disueltas en el sobrenadante y que éstas sean inyectadas con el consiguiente deterioro de la columna (Quattrochi *et al*, 1992).

Ciertos ácidos (túngstico, tricloroacético (TCA), perclórico, metafosfórico, y una mezcla de ácido túngstico y metafosfórico) forman sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente. El más utilizado es el ácido tricloroacético, precipitante enérgico que normalmente se utilizan entre 10-20% y en una relación de volumen 1/10 - 1/5. Uno de los problemas que se plantean, es que la sustancia a analizar se degrade con él y por tanto, si bien se consigue una buena precipitación, su uso no sería adecuado por razones obvias. Otro problema que se puede plantear es que se acidifique mucho la muestra. Es importante recordar que las columnas de cromatografía líquida de fase reversa de sílice, que son comúnmente utilizadas, tienen su máxima estabilidad en un margen de pH 3 a 7, si bien se consideran estables en un margen de pH de 2 a 8, a pH mayores o menores la sílice se derrumba en el interior de la columna lo que explica el uso de fases móviles tamponadas (Quattrochi *et al*, 1992).

1.5.3 Extracción líquido - líquido

En determinadas ocasiones, dada la complejidad de los medios biológicos, es necesario recurrir a la realización de una extracción de la sustancia a determinar con un solvente orgánico tipo benceno, ciclohexano o cloruro de metilo, de forma que lo primero que se realiza es añadir un tampón para llegar a un pH determinado y alcanzar un coeficiente de reparto adecuado para que la sustancia sea extraíble por el disolvente orgánico (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

La extracción líquido - líquido es la distribución (partición) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está representado por el equilibrio:



Donde $[A]_o$ es la concentración de analito en la fase orgánica, y $[A]_{aq}$ es la concentración de analito en la fase acuosa. La distribución (coeficiente de distribución) está dado por la relación de concentración de analito en las dos fases, es decir:

$$K = \frac{[A]_o}{[A]_{aq}}$$

Donde K es el coeficiente de partición de actividades de A (Quattrochi *et al*, 1992).

Hay que tener cuidado de no inyectar nada que no sea miscible con la fase móvil que se utiliza, siendo necesario evaporar el disolvente orgánico a sequedad, re-disolver posteriormente el residuo seco en un vehículo hidroalcohólico (generalmente la misma fase móvil utilizado en la determinación con lo cual se minimizan las posibles interferencias) (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

1.5.4 Extracción por pares iónicos

En el caso de la determinación de una sustancia ionizada, extraerla con un disolvente orgánico es difícil. En esos casos se tienen dos opciones:

1. Realizar extracciones con un disolvente orgánico para extraer impurezas, y quedarse con la fase acuosa.
2. Recurrir a la formación de un par iónico; para ello se utiliza un contra-ión (tetrabutilamonio, ácido pentanosulfónico, ácido heptanosulfónico, etc.) de manera que se forma un complejo neutro y más apolar, cuanto mayor sea la cadena hidrocarbonada del contra-ión. Este complejo se puede extraer con un disolvente orgánico tipo benceno o cloruro de metileno, entre otros.

Al realizar este tipo de acondicionamiento es necesario la utilización de una fase móvil de par iónico, con un contra-ión igual o diferente al utilizado en la extracción, según la sustancia y las características del análisis (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

1.5.5 Reacción de derivatización precolumna

Una de las limitaciones de la cromatografía líquida es que el detector puede no ser sensible a determinadas sustancias, lo cual ha llevado a desarrollar técnicas auxiliares entre las que se encuentran los procesos de derivatización. Esta técnica permite mediante una transformación química de los compuestos que se analizan obtener derivados con una estructura química y un comportamiento totalmente diferente, pero más fácilmente cromatografiables, modificando indirectamente la eficacia o la sensibilidad del detector y haciendo posible el análisis (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

1.5.6 Dilución

Es una técnica muy utilizada en el análisis de sustancias en orina. En dicho tipo de muestras, si la orina es normal, no existen generalmente proteínas y el problema es que la muestra está muy concentrada, por lo que se recurre a la dilución con agua o con fase móvil. En algunos casos, antes de la inyección, se hace pasar la muestra a través de un filtro millipore de 0,45 μm o, lo que es más común, se centrifuga para precipitar las partículas que puedan existir (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

1.5.7 Bases de la separación cromatográfica

La cromatografía es una técnica de separación de sustancias que fue empleada por primera vez por el botánico Ruso Tswett en 1906 para el aislamiento de diversos pigmentos vegetales. El paso pasar un extracto de hojas verdes en éter de petróleo a través de un tubo o columna de vidrio rellena de carbonato cálcico finamente pulverizado. Se separaron así una serie de bandas coloreadas correspondientes a los distintos pigmentos, lo que explica el nombre de cromatografía (en griego "escritura en color") dado por Tswett a este tipo de separación. El paso posterior de un disolvente a través de la columna, de manera continua, permitió que las diversas bandas fueran sacadas o eluidas de la columna en el disolvente que sale por el extremo de la misma (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

Los procedimientos cromatográficos se pueden clasificar según el método y según la técnica. El método se refiere al estado físico de la fase estacionaria y móvil implicada, así como los procesos fundamentales que regulan la retención de los componentes de la muestra en la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o un líquido disperso en un soporte sólido inerte y la fase móvil un líquido o un gas. Surgen así los métodos cromatográficos: cromatografía gas - líquido (CGL), cromatografía líquido-líquido (CLL), cromatografía gas - sólido (CGS) y cromatografía líquido - sólido (CLS). Estos métodos cromatográficos atendiendo a las fuerzas que retienen a la muestra en la fase estacionaria se pueden clasificar en cromatografía de partición, cromatografía de adsorción

y cromatografía de intercambio iónico (Domínguez-Gil y Martín A., 1997). En este trabajo se menciona a la cromatografía líquida.

1.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en sus variadas formas, encuentra aplicaciones en todas las ramas de la ciencia. Puede ser usada en una amplia variedad de muestras iónicas y muestras complejas encontradas en las ciencias biológicas (Quattrochi *et al*, 1992).

La técnica se basa en la habilidad de una columna cromatográfica, empacada con una fase estacionaria, para separar los componentes de una mezcla. Esta mezcla de componentes es disuelta en una fase móvil o eluyente, y pasada a través de la columna. Un adecuado sistema de detección localiza los analitos presentes en el eluyente, midiendo sus propiedades físicas o químicas. Un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo, o volumen de eluyente, muestra una serie de picos llamados cromatograma (Quattrochi *et al*, 1992).

De los métodos de análisis por HPLC publicados sobre el 80% se realizan usando columnas en fase reversa. En este método, la fase estacionaria es de polaridad menor que el eluyente y los componentes de la muestra son eluidos en orden de polaridad. El componente más polar eluye primero. La retención y la selectividad pueden ser alteradas por cambios de la polaridad de la fase estacionaria o, (más fácilmente) del eluyente (Puentes, 2004).

Las ventajas que presenta la cromatografía en fase reversa son variadas:

- Puede separar muestras de un amplio rango de polaridades.
- Permite la elección dentro de una amplia variedad de fases estacionarias.
- Usa fases móviles relativamente económicas.
- Hay un rápido equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- Provee una separación rápida, simple y reproducible (Puentes, 2004).

Mientras que las limitaciones que presenta son:

- Muchas fases unidas a la sílica son estables sólo entre pH 3 y 8.
- La presencia de grupos silanoles no reactivos en la superficie de la sílica pueden producir colas en los picos, incrementar los tiempos de retención y causar irreproducibilidad en análisis entre columnas.
- Los mecanismos de retención de fase reversa aún no han sido completamente entendidos (Puentes, 2004).

La fase estacionaria más comúnmente usada es el octadecilsilano (ODS), la cual tiene grupos alquílicos C-18, químicamente unidos. Otras fases estacionarias tienen cadenas alquílicas más cortas, C-8, o grupos fenólicos y ciclohexílicos (Anexo N° 1, esquema N° 8). Los tiempos de retención aumentan cuando aumenta el número de átomos de carbono unido en la fase estacionaria. Los solventes usados generalmente en fase reversa son mezclas acuosas o soluciones buffer. Los solventes orgánicos miscibles en agua más frecuentemente usados son metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano (THF) (Puentes, 2004).

1.7 Validación de método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento

Según el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) la validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método sean confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. Existen dos criterios para validar una metodología la que depende de los antecedentes que se dispone, tal como (Merino *et al*, 2010):

- Métodos no normalizados: que corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- Método normalizado con una modificación significativa.

La validación de un método analítico establece y reúne la evidencia documentada que el proceso analítico entrega, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados exactos y precisos dentro de los parámetros de calidad establecidos previamente. El propósito de validar es demostrar que el o los métodos son adecuados para poder realizar los análisis propuestos en las condiciones establecidas, entregando seguridad y confianza en los resultados obtenidos (USP XXIX, 2006).

Según la USP XXIX (2006) y la guía de validación de métodos del ISP (2010) los métodos analíticos se clasifican en diferentes categorías. El método en el cual se enfocará en este proyecto se encuentra en la categoría "I" y es clasificado dentro de los "métodos cuantitativos para la determinación del principio activo como materia prima o en formulaciones farmacéuticas", y como un método nuevo según el ISP. Los parámetros de validación que se deben tener en cuenta difieren según los requisitos que exigen legalmente los distintos organismos (USP XXIX, 2006, Merino *et al*, 2010). Para este tipo de método debe evaluarse: especificidad, linealidad, sensibilidad, límites, precisión, exactitud y robustez (**Tabla 1-3**).

Tabla 1-3. Datos requeridos para la validación según ISP (Merino *et al*, 2010).

---Método Cuantitativo---				
	Método Cualitativo	Normalizado	Modificado	Nuevo
Especificidad	Si	No	Si	Si
Linealidad	No	Si	Si	Si
Sensibilidad	No	Si o No	Si	Si
Límites	Si	Si o No	Si	Si
Precisión	No	Si	Si	Si
Exactitud	No	Si o No	Si o No	Si
Robustez	No	No	Si o No	Si
Aplicabilidad	Si	Si	Si	Si

De esta forma, las características de desempeño analítico realizadas serán:

1.7.1 Selectividad y Especificidad

La selectividad de un método analítico es la capacidad de medir un analito en presencia de interferencia, tales como excipientes, enantiómeros y productos de degradación que pueden estar presente en la matriz de la muestra, así como también la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra. La selectividad de un método analítico se puede determinar comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias (Domínguez-Gil y Martin A., 1997).

En el caso de matrices complicadas como muestras naturales o fluidos biológicos donde la complejidad de la matriz dificulta la identificación de los picos cromatográficos, se deberá recurrir a otros tipos de métodos para la determinación de la selectividad (Domínguez-Gil y Martin A., 1997).

En muchos casos, la determinación de la especificidad no puede seguir modelos tan sistemáticos, como por ejemplo, evaluar las rutas de degradación y métodos de ataques para luego crear un ensayo de degradación artificial. Entonces la determinación de este parámetro dependerá del arte o ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias:

El tiempo de retención, sirve como primera base para la identificación del pico, pero esto a veces no resulta suficiente. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, de hombros, si es posible por la derivación de la señal, etc.) puede servir como primera aproximación (Quattrochi *et al*, 1992).

1.7.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta (Quattrochi *et al*, 1992).

La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ejemplo cálculo de regresión por cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

Para establecer la linealidad se deben investigar un mínimo de cinco concentraciones y estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión

$$Y = bX + a$$

También se recomienda considerar los siguientes intervalos. Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120% de la concentración de ensayo. Para la determinación de una impureza: de 50 a 120% de la especificación. Para la determinación de uniformidad de contenido: un mínimo de 70 a 130% de la concentración de ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica (Hubert, 1998).

1.7.3 Sensibilidad (Límite de Detección y Límite de Cuantificación)

1.7.3.1 El límite de detección

Es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas. Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales (Quattrochi *et al*, 1992).

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección. Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta. Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto (Quattrochi *et al*, 1992).

1.7.3.2 El límite de cuantificación

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleada para el analito de la muestra. Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental (Quattrochi *et al*, 1992).

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal-ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta. Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto (Quattrochi *et al*, 1992).

Para el límite de detección y cuantificación se aplica la siguiente fórmula en el caso de procedimientos cromatográficos, tales como HPLC y cromatografía gaseosa (Quattrochi *et al*, 1992):

$$L(x) = \frac{K \times S_{bl}}{b}$$

$L(x)$ = Límite de Cuantificación o Detección.

K = Constante ≥ 3 . Usualmente $K = 3$ para Límite de Detección y $K = 10$ para Límite de Cuantificación.

S_{bl} = Desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones

1.7.4 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones (Quattrochi *et al*, 1992).

El estimador S de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{X} el estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- **Repetitividad.** Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo

laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.

- **Precisión intermedia.** Expresa las variaciones intralaboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- **Reproducibilidad.** Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.).

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra. La precisión así obtenida se denomina “del método” puesto que incluye todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental. También se puede determinar directamente la precisión del “sistema instrumental”, hallando la variabilidad de respuesta de una solución patrón (Quattrochi *et al*, 1992).

La repetitividad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (como por ejemplo, tres concentraciones /tres repeticiones de cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100% del valor declarado (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

Los criterios de aceptación para la precisión dependen mucho del tipo de análisis. Para análisis de control de calidad de productos farmacéuticos se acepta para el parámetro de precisión un coeficiente de variación de un 1%, para muestras biológicas se acepta un coeficiente de variación de 15%. Para muestras en alimento la precisión es dependiente de la matriz de la muestra, la concentración del analito y de la técnica de análisis, acá el coeficiente de variación puede variar entre un 2% hasta un 20%. (Huber, 1998).

1.7.5 Exactitud

La exactitud de un método analítico se define como la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deben corregirse. La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto. Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada. Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones, etc. que se traducen, inevitablemente, en una disminución de la recuperación. Un estudio de exactitud permite establecer el porcentaje de recuperación promedio. Si el porcentaje es bajo se pueden utilizar factores de corrección. Otra alternativa es utilizar el método de patrón interno que se añade en las primeras fases de preparación de la muestra. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico (Domínguez-Gil y Martín A., 1997).

Para la determinación, en el caso de la valoración de una sustancia, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de pureza conocida (como por ejemplo una sustancia de referencia) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida (Quattrochi *et al*, 1992).

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les han agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método. Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse sobre muestras (sustancia o producto farmacéutico) a las que se les han agregado cantidades conocidas de impurezas. Si es imposible obtener muestras de las impurezas y/o los productos de degradación, es aceptable comparar los resultados obtenidos por un método independiente (método farmacopeico u otro método analítico validado). En ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de impureza comparando su respuesta con la respuesta de la sustancia, en estos casos debe emplearse el factor de respuesta si se conoce.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida del analito en la muestra, o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza (Quattrochi *et al*, 1992).

Para la determinación del % de recuperación se utiliza la siguiente formula:

$$R = (X_i - X_0) \times 100$$

Donde X_i es el valor medido y X_0 el valor verdadero (Domínguez-Gil y Martín A., 1997). Las concentraciones deberán cubrir el rango concerniente y particularmente incluir una concentración cercana al límite de cuantificación. La recuperación esperada va a depender de la matriz de la muestra, el procedimiento de proceso de la muestra y de la concentración del analito. (Huber, 1998).

1.7.6 Robustez

Es una medida de la capacidad de un método analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.

(Quattrochi *et al*, 1992). A continuación (**Tabla 1-4**) se presenta un resumen del plan de validación de un método normalizado.

Tabla 1-4. Esquema general para el desarrollo de un plan de validación.

	Realizar	Criterio de aceptabilidad
Linealidad	3 curvas de calibración con 4 estándares incluido el blanco, determinar el valor de coeficiente de correlación promedio de las 3 curvas.	$r > 0,99$
Limites	10 ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración cercano al LOD esperado, determinar la desviación estándar de las concentraciones obtenidas (S_o), calcular el valor de LOD como $LOD = 3,29 \times S_o$.	para un LMP $> 0,1$ ppm un LOD $< 1/10$ LMP y para un LMP $< 0,1$ ppm un LOD $< 1/5$ LMP.
Precisión		
a) Repetitividad	En un mismo día 10 ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración, en lo posible en el nivel medio de la curva, determinar el promedio de las concentraciones obtenidas (X) y la desviación estándar de las concentraciones obtenidas (S_r). Determinar el CVr%.	$CV_h = (2(1-0.5.\log c))/2$, en el cual c es el valor de la concentración del analito expresado en potencia de 10.
b) Reproducibilidad	En un total de 10 días 10 ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración, en lo posible en el nivel medio de la curva, determinar el promedio de las concentraciones obtenidas (X) y la desviación estándar de las concentraciones obtenidas (S_{Ri}). Determinar el CVRi%.	$CVR_i = 2x(2(1-0.5.\log c))/3$, en el cual c es el valor de la concentración del analito expresado en potencia de 10
Veracidad		
a) Sesgo	Determinar en un mismo día a lo menos 6 mediciones (n) de un material de referencia o material de referencia certificado, determinar el promedio (X) y desviación estándar (S) de las concentraciones obtenidas de las 6 mediciones, luego calcular el valor del sesgo del valor promedio (X) respecto del valor asignado (X_a), como $s = X - X_a$, determinar el valor de t calculado para el sesgo, comparar con el t crítico (5,95%) que es 2,571.	Si $t \text{ calc} < t \text{ crit}$, el sesgo es aceptable.
c) Recuperación	Medir una matriz de muestra blanco, determinar el promedio de las concentraciones obtenidas para C_o . Posteriormente realizar un fortificado en dicha matriz blanco en un nivel de concentración (C_a) cercano al LMP o punto medio de la curva de calibración. Tomar 6 sub-muestras del material fortificado y realizar el ensayo analítico, determinar el promedio de la concentración del analito en la muestra fortificada (C_e). Calcular el % de recuperación obtenido.	Si el %R se encuentra dentro del rango de %R según AOAC para el nivel de fortificación realizado (C_a), es aceptable

S: Desviación estándares, el promedio de lejanía de los valores obtenidos (lecturas) respecto del promedio

LOD: score que es el logaritmo en base 10 del cociente

LMP: Límite máximo permitido, nivel máximo o tolerancia establecida para un analito en una reglamentación.

CV: Coeficiente de Variación, desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje

1.8 Condiciones cromatográficas para la determinación de ceftazidima e imipenem por HPLC

Considerando que los métodos por cromatografía líquida de alto rendimiento existentes en la literatura para la determinación de ceftazidima e imipenem en plasma son muchos y variados (**Tabla 1-5**), algunos de ellos mostrando buena sensibilidad pero con largos procedimientos en la preparación de la muestra, por ejemplo hacer precipitar las proteínas presentes o realizar la separación de elementos liposolubles en el plasma u otros métodos que son simples pero algunos de los reactivos que ocupan pueden presentar un problema a la hora de ser desechados.

Es por esto que el propósito de este trabajo es realizar un método por cromatografía líquida de alto rendimiento rápido y sencillo para la determinación de la concentración de estos antibióticos en plasma, así como su validación y aplicaciones presentando así la siguiente hipótesis.

Tabla 1-5. Condiciones cromatográficas determinación antibióticos beta-lactamicos

Método	Antibiótico(s)	Columna/marca	Condiciones de operación	Referencia
Nº 1	Ceftazidima Meropenem Ceftriaxona Ampicilina Cefazolina Ertapenem Cefalotina Piperacilina Benzilpenicilina Flucloxacilina Dicloxacilina Ticarclina	Columna en fase reversa C18 (300x3.9 mm).	Fase móvil Acetonitrilo y búffer fosfato (48 + 52, V/V). Flujo 1 mL/min Detector con arreglo de diodos y PDA UV a 260 hasta 340nm Temperatura ambiente (25° C)	McWhinney <i>et al</i> , 2010
Nº2	Cefepima Ceftazidima Cefuroxime Meropenem Piperacilina	Columna analítica C8 (250mm-4.6mm i.d.) Rellena con partículas 5µm de diámetro,	Fase móvil acetonitrilo y fosfato de un tampón Flujo 1 ml/min Detector con arreglo de diodos a 200 hasta 400 nm Temperatura ambiente (25° C)	Denooz & Charlier, 2008
Nº3	Cefotaxima	LiChrosorb RP-18 (5µm;Merck) de 250 x 4 mm	Fase móvil a) Metanol-fosfato monopotásico 0,01M (50:50), ajustado a pH 2,58 con ácido fosfórico (85%). b)Metanol-agua-ácido acético (30:70:0,1), ajustado a pH 3,4 con ácido acético glacial. c)Metanol-acetato de sodio 0,01M (80:20), pH 4,5. d)Metanol-fosfato monosódico 12,5M (20:80), ajustado a pH 2,6 con ácido fosfórico (85%). e)Acetonitrilo-ácido acético (13:87), pH 3,3. Flujo 0,6 ml/min, 0,75 ml/min, 0,6 ml/min, 0,6 ml/min, 1,0 ml/min Detector UV modelo L-7400 a 240nm hasta 270nm Temperatura ambiente 25° C	Gonzales & Diaz, 1998

Nº4	Cefotaxima	columna Bondapak C18 300 x 3,9 mm (10 µm)	Fase móvil metanol, ácido acético y agua (30:70:0,1 v/v) Flujo 0,5 ml/min Detector UV-VIS L-4250 a 254nm	Sordo <i>et al</i> , 2001
Nº5	Ceftazidima	Columna RP 18 de 3,9 mm x 30 cm (5 µm)	Fase móvil Metanol y tampón fosfato. Flujo 1.5 ml/min Detector UV-VIS a 260nm Temperatura ambiente (25° C)	USP XXIX, 2006
Nº6	Imipenem	Columna Viosfer de 25 cm C18 (10 µ)	Fase móvil 0.1M Borate buffer (pH = 7.2)-methanol (90:10, v/v) Flujo 1,5 ml/min Detector UV a 313 nm. Temperatura ambiente (25° C)	Carluccia <i>et al</i> , 2006

2 HIPÓTESIS

La utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de arreglo de diodos para determinar ceftazidima e imipinem proporciona datos precisos, reproducibles y confiables., cumpliendo con los estándares de validación que recomienda el Instituto de Salud Pública de Chile.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que cumpla con los requerimientos establecidos por el Instituto de Salud Pública de Chile, para la cuantificación de ceftazidima e imipenen en plasma.

3.2 Específicos

1. Seleccionar, a partir de los antecedentes bibliográficos recopilados las condiciones cromatográficas operacionales para la determinación de ceftazidima e imipenen.
2. Elaborar un plan de validación de la metodología establecida para ceftazidima e imipenem en plasma.
3. Evaluar los parámetros de validación de la metodología analítica seleccionada, de acuerdo a criterios establecidos por el ISP.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron 2 métodos analíticos para determinar ceftazidima e imipenem respectivamente en plasma. Previo a la determinación fue necesario realizar una extracción de los componentes presentes en la matriz de la muestra y que por sus características, podrían interferir en la separación cromatográfica de ceftazidima e imipenem y su posterior cuantificación.

4.1 Instrumentos y equipos

- Equipo HPLC Jasco PU 2087 Plus.
- Detector UV-Visible Jasco con lámpara de deuterio modelo UV- 2075 plus.
- Bomba cuaternaria Jasco modelo PU-2089 plus.
- Columna HPLC KYA TECH HiQ sil C18HS tamaño de partícula 5µm y tamaño de poro de 100 Å.
- Columna HPLC KYA TECH HiQ sil C8 tamaño de partícula de 5µm y tamaño de poro de 120 Å.
- Balanza analítica digital Denver Instrument Company® modelo AA200. 120 ± 0.0001 g .Medidor de pH Hanna Instrument® modelo HI9321.
- Centrifuga Eppendorf 5810 R.
- Agitador magnético RT5 Power IKAMAG , de IKA.
- Baño de ultrasonido Modelo AS2060B, Chican Co.
- Manta calefactora Thermo electron modelo Hot pocket.

4.2 Reactivos

- Ceftazima Laboratorio Vitalis 1g >98% de pureza.
- Imipenem + Cilastatina Laboratorio Libra 1g (500mg imipenem, 500mg cilastatina), >98% de pureza.
- Agua Ultra pura calidad HPLC.
- Acetonitrilo para HPLC (Merck, USA).

- Metanol calidad HPLC (Merck, USA).
- Peroxido de hidrogeno 30% (Sigma-Aldrich, Germany).
- Hidróxido de Sodio 1N (Merck Chemicals, Germany).
- Acido Clorhídrico 32% p.a EMSURE (Merck Chemicals, Germany).
- Cloroformo (Merck, USA).

4.3 Materiales de laboratorio

- Tubos de centrifuga fondo cónico desechables de 50 mL.
- Vasos precipitados 100, 250, 500 mL (Material de vidrio clase A).
- Filtros de membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro 0,2 μm .
- Jeringas de plástico desechables de 10 mL.
- Probeta graduada de 200, 500 y 1000 mL.
- Tubos Eppendorf 1,5 mL.
- Jeringa HPLC 50 μL Hamilton 80565.
- Micropipeta 20, 100, 1000 μL .
- Guantes desechables de látex.

4.4 Metodología

El desarrollo de los métodos para la determinación de ceftazidima e imipenem en plasma por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se realizó en las siguientes etapas:

4.4.1 Extracción de antibióticos desde plasma

Un volumen 200 μL de plasma se ponen en un tubo de polipropileno de 1,8 mL para microcentrifuga. Se añade acetonitrilo (600 μL) para precipitar las proteínas y se mezcla durante 30 seg. El precipitado de proteínas se separa por centrifugación durante 5 min a $14000 \times g$. El sobrenadante se elimina y se añade 600 μl de cloroformo. Se 30 segundos

para particionar el acetonitrilo y los componentes liposolubles en la fase orgánica del cloroformo y se centrifuga por 5min a 1700 x g para separar las fases. Una alícuota (100 µL) de la fase acuosa superior se utiliza para el análisis cromatografico de antibióticos (McWhinney *et al*, 2010).

4.4.2 Condiciones Cromatográficas

Para la implementación de la técnica analítica, especialmente para establecer las condiciones cromatográficas, se revisó bibliografía que contenía estudios para la determinación de ceftazidima e imipenem (**Tabla 1-5**). Se probaron diversos métodos, a los cuales se les realizaron ciertas modificaciones de manera de conseguir una separación adecuada de la sustancia en estudio, diseñando el siguiente modelo experimental (**Tabla 4-1**):

Tabla 4-1. Diseño experimental para la determinación de ceftazidima e imipenem por cromatografía líquida (HPLC).

<i>Condiciones</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
Columna	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1
Metanol	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
Buffer	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
Flujo	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
Temperatura	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1

Previo a la inyección de los estándares la columna se equilibra durante 30 min con la fase móvil.

4.4.2.1 Preparación de la solución estándar de trabajo.

4.4.2.1.1 Cefotaxima

Una solución madre basada en la máxima posología comercial de cefotaxima se preparó en un volumen de 100 mL, en este caso, 1000 mg/100 mL lo que corresponde a 10 mg/mL. Por lo tanto, la solución madre estándar fue de 10 mg/mL disuelta en buffer fosfato 0,1 N a pH 7.

4.4.2.1.2 Imipenem

Una solución madre basada en la máxima posología comercial imipenem se preparó en un volumen de 100 mL, en este caso, 500 mg/100 mL lo que corresponde a 5 mg/mL. Por lo tanto, la solución madre estándar fue de 5 mg/mL disuelta en buffer fosfato 0,1 N a pH 7. Los estándares de trabajo fueron preparados diariamente por dilución de la solución madre con fase móvil.

Para la curva de calibración de cefotaxima se prepararon los estándares siguientes: 25, 50, 100, 150, 200 ppm y de 25, 50, 65, 80, 100 ppm para imipenem respectivamente. Este rango de concentraciones se determinó debido a las concentraciones esperadas luego de dosis terapéuticas obtenidas en la literatura (Flores *et al*, 1998).

4.4.2.2 Preparación de la fase móvil

Una mezcla de metanol calidad HPLC y Buffer fosfato 0,1 N a pH 7 se ocupó en una proporción 40:60, respectivamente. Previo a la elusión a través de la columna, la fase móvil fue filtrada a través de filtros con tamaño de poro de 0,2 μm (millipore).

4.4.2.3 Preparación del Buffer

Para la preparación de la fase móvil se disolvieron 6,8995g de fosfato de potasio mono básico y 7,098g de fosfato de potasio di-básico en 1Lt. de agua ultra pura de grado HPLC cada uno, respectivamente. Luego se toman 195 mL de la solución de fosfato de potasio

monobásico y 305 mL de fosfato de potasio di-básico, se mezclan y se diluyen a un total de 1 L. con agua ultra pura de grado HPLC. El pH de la solución resultante es de 7,0.

4.4.3 Validación del método HPLC

4.4.3.1 Selectividad o Especificidad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medida debido solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra. Estos componentes pueden ser excipientes de un fármaco, producto de degradación, subproductos o productos laterales de la síntesis de un fármaco, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, etc. En el caso del análisis de un principio activo o fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación. De ser así, la especificidad puede medirse añadiendo un 1% de cada posible interferencia al estándar de fármaco puro, verificando la separación cromatográfica. Se realizaron ensayos agregando una fracción solución estándar previamente expuestas a las siguientes degradaciones artificial:

- 1) Hidrolisis, calentando a 80°C durante 1 hora.
- 2) Hidrolisis básica, calentando a 80°C con NaOH 1N durante 1 hora.
- 3) Hidrolisis acido, calentando a 80°C con HCL 1N durante 1 hora.
- 4) Fotolisis, por exposición de una solución a la luz solar de manera directa por 1 hora.
- 5) Oxidación, por calentamiento de una solución de la droga con gotas de peróxido de hidrogeno.

Se aceptara una degradación máxima de 20% de la concentración inicial (Quattrochi *et al*, 1992).

4.4.3.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Para su determinación se preparó una serie de 5 concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200 ppm para ceftazidima y 25, 50, 65, 80, 100 ppm para imipenem. La cuantificación fue realizada por análisis de regresión del área del pico contra la concentración del estándar. Se inyectó por triplicado cada concentración obteniéndose un total de 15 inyecciones. La determinación se realizó en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis. Se determinaron los coeficientes de correlación y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación (Quattrochi *et al*, 1992).

4.4.3.3 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Se debe diferenciar entre dos tipos de sensibilidad:

- Sensibilidad de calibración, correspondiente a la pendiente de la curva de calibrado.
- Sensibilidad analítica, correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de cuantificación y detección.

4.4.3.4 El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

El LOD corresponde, según la USP XXIX (2006), a la menor concentración del analito que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc).

Y se puede calcular mediante la siguiente formula:

$$LOD = 2 t_{(1-\alpha;v)} x Sbl$$

El LOQ corresponde, según la USP XXIX (2006), a la menor concentración del analito que se puede determinar con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, y se expresa en unidades de concentración. (Quattrochi *et al*, 1992).

$$LOQ = 10 x Sbl$$

Los límites de cuantificación y detección se calcularon a partir de la curva de regresión. Para esto, se utilizaron 3 concentraciones bajas de ceftazidima y de imipenem, 10, 15 y 25 ppm para cada una, luego se hizo la extracción a concentración cero:

- Se determina la pendiente de la curva de calibrado en el rango apropiado b.
- Se realiza otra curva de calibrado, a partir de las nuevas concentración que fueron inyectadas por triplicado, determinando la ecuación de la nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero. Obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y.
- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración de la segunda curva de calibrado y se calcula la recta correspondiente a concentración versus desviación estándar correspondiente a cada concentración de la segunda curva de calibrado, y se calcula la recta correspondiente a concentración versus desviación estándar y se extrapola la desviación estándar a concentración cero obteniéndose el estimado Sbl, correspondiente a la desviación estándar del blanco. (Quattrochi *et al*, 1992).

4.4.3.5 Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales. La precisión del método analítico se estudió evaluando la dispersión de 6 inyecciones de un estándar de concentración de 50 ppm. Y se midió en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo instrumento, mismo día). La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por S o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). Ambos estimadores, la desviación estándar y la desviación estándar relativa, permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media) (Quattrochi *et al*, 1992). El criterio de aceptación puede ser variable y depende de los objetos, pero se acepta en general una RSD del sistema de no más de 2%, según como lo indica la USP XXIX (2006).

4.4.3.6 Precisión intermedia

Como su nombre lo indica, la precisión intermedia se determina bajo condiciones que son intermedias entre la repetitividad y la reproducibilidad de las condiciones, que representan las dos condiciones extremas para determinar la precisión de la validación de un método. Las condiciones de repetitividad se obtienen mediante el mismo método en muestras idénticas, en el mismo laboratorio y por el mismo operador utilizando el mismo equipo en cortos periodos de tiempo. En las condiciones de reproducibilidad se realiza el mismo método en muestras idénticas en laboratorios diferentes, lo que implica necesariamente diferentes operadores y aparatos (Quattrochi *et al*, 1992).

La precisión intermedia se realizó con una muestra de concentración de 50 ppm tanto para ceftazidima como para imipenem, la cual se inyectó por 2 analistas, en 2 días diferentes, pero en el mismo equipo. Luego se calculó la desviación estándar y RSD.

4.4.3.7 Exactitud

La exactitud de un método o también conocido como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el promedio del valor obtenido y el valor verdadero. El diseño para este trabajo consistirá en la utilización de 3 concentraciones del analito preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de la linealidad del sistema: en general se estudian concentraciones correspondientes al 50-80-100-120-150% del valor esperado, en este caso se utilizarán las concentraciones de un 80, 100 y 120%, siendo el valor esperado 50 ppm aproximadamente, es decir las soluciones tenían una concentración de 40, 50 y 60 ppm (Quattrochi *et al*, 1992).

4.4.3.8 Robustez

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, de analistas, laboratorios, fuentes de columnas, etc. Es evidente que un método debe ser “robusto” frente a cambios de analistas e instrumentos, pero no necesariamente debería serlo frente a todos los cambios que se estudien. Así, es de esperar que la modificación de algún factor, por ejemplo pH de la fase móvil, produzca en algún caso cambios drásticos en la separación. En este caso se intentará trabajar con un valor de pH tal que una ligera modificación no produzca cambios importantes en la respuesta. Si esto no es posible se informará que el pH es crítico para la separación, indicando el rango en el cual es posible variarlo sin alterar los resultados. Deberá evaluarse la eventual variación de los resultados (precisión, resolución, asimetría, eficiencia, etc) ante cambios de variables tales como columna, cambios de pH de la fase móvil, de temperatura, de composición de fase móvil, etc, así como el intervalo entre la preparación de la solución a inyectar y la inyección misma (Quattrochi *et al*, 1992).

5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Validación metodología analítica

5.1.1 Determinación de las condiciones de trabajo

Para la determinación de las condiciones de trabajo se realizó un diseño experimental factorial con las condiciones encontradas en la literatura de los diferentes métodos para la determinación de ceftazidima e imipenem (**Tabla 5-1**), quedando el siguiente diseño:

Tabla 5-1. Diseño factorial experimental para la determinación de las condiciones de trabajo para ceftazidima e imipenem.

<i>Condiciones</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
	<i>alto</i>	<i>bajo</i>								
Columna	C18	C8	C18	C18	C18	C18	C8	C8	C8	C8
Metanol	80	40	40	80	40	80	40	80	40	80
Buffer	0.1	0.01	0.01	0.01	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01
Flujo	1.2	0.8	0.8	1.2	0.8	1.2	1.2	0.8	1.2	0.8
Temperatura	35	25	25	25	35	35	25	25	35	35

Las condiciones de trabajo dadas por el diseño experimental factorial utilizado, se realizaron por duplicado, dando los resultados que se muestran a continuación en las **Tablas 5-2 y 5-3**, para ceftazidima y las **Tablas 5-4 y 5-5** para imipenem. En lo relativo a los cromatogramas estos se presentan en el **Anexo 8A**.

Tabla 5-2. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para ceftazidima en columna C18.

<i>Parámetros</i>	<i>N°1-1</i>	<i>N°1-2</i>	<i>N°2-1</i>	<i>N°2-2</i>	<i>N°3-1</i>	<i>N°3-2</i>	<i>N°4-1</i>	<i>N°4-2</i>
Tiempo retención	2,306	2,267	1,693	1,64	2,253	2,293	1,533	1520
Altura	2657	2856	1407	1846	2876	3069	1801	2109
Área	276,2	249,2	258,8	280,5	256,8	254,2	257,5	254,6
AS USP	3,09	2,6	0,9	1,23	2,37	2,04	1,24	1,19
Left Half Width	0,322	0,296	0,154	0,085	0,253	0,293	0,1	0,092
NTP USP (platos teóricos)	432,3	530,1	679	801,79	2309	2253,8	728,2	947,5
Presión Mpa	8,9	9	10,3	10,	7,9	7,9	9,7	9,8

Tabla 5-3. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para ceftazidima en columna C8.

<i>Parámetros</i>	<i>N°5-1</i>	<i>N°5-2</i>	<i>N°6-1</i>	<i>N°6-2</i>	<i>N°7-1</i>	<i>N°7-2</i>	<i>N°8-1</i>	<i>N°8-2</i>
Tiempo retención	1,573	1,8	2,067	1,867	2,707	2,713	3,267	3,293
Altura	2671,	2640	1760	1240	296	298	2178	2119
Área	134,4	157,5	298,2	225,9	333,6	328,5	297,5	355,3
AS USP	1,59	1,68	1,24	1,15	1,31	1,33	1,57	1,07
Left Half Width	1,573	0,049	0,118	0,122	0,064	0,054	0,073	0,132
NTP USP (platos teóricos)	4153,7	4359,8	1015,4	762,9	4117	4089	3499,1	2407,2
Presión Mpa	15,7	16	7,6	7,9	5,5	5,3	7,1	6,5

Tabla 5-4. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para imipenem en columna C18.

Parámetros	Nº1-1	Nº1-2	Nº2-1	Nº2-2	Nº3-1	Nº3-2	Nº4-1	Nº4-2
Tiempo retención	2,52	2,547	1,507	1,573	2,486	2,416	1,56	1,573
Altura	2606,9	2590	869,2	912	301,5	238,7	1421,1	1707,2
Área	258,8	277	157,3	201,9	226,1	128,2	215,5	217,1
AS USP	1,31	1,48	2,27	2,01	5,67	4,93	1,64	1,5
Left Half Width	0,073	0,07	0,27	0,072	0,138	0,147	0,072	0,07
NTP USP (platos teóricos)	4287,7	3878,45	141,08	404,31	5985,06	3728,23	799,04	1009,86
Presión Mpa	8,3	8,3	8,2	8,3	9,3	8,9	9,6	9,7

Tabla 5-5. Resultados de las condiciones de trabajo probadas para imipenem en columna C8.

Parámetros	Nº5-1	Nº5-2	Nº6-1	Nº6-2	Nº7-1	Nº7-2	Nº8-1	Nº8-2
Tiempo retención	1,547	1,6	2,333	2,36	18,359	18,553	3,24	3,573
Altura	2748	2876,4	363,3	339,7	184,2	191,1	812,24	826,6
Área	148,4	140,6	169,5	162,4	17,3	18,5	724,5	266,5
AS USP	1,09	1,45	1,86	1,46	1,4	1,48	1,51	0,83
Left Half Width	0,073	0,04	0,163	0,2	0,057	0,058	0,175	0,356
NTP USP (platos teóricos)	2580	4165	224	231	3322	3343	636	976
Presión Mpa	17,7	17,5	8,3	8,5	8,5	8,4	7,5	7,4

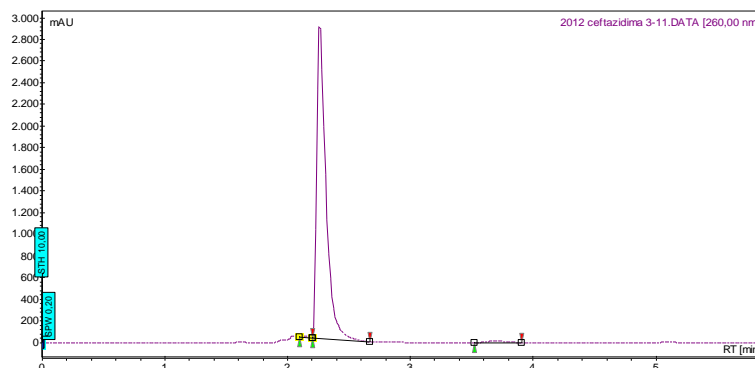
Considerando los resultados tales como el tiempo de retención, left half width o factor de cola que se desea que sea menor a 2 ($t < 2$), la eficiencia (N) o número de platos teóricos que se desea mayor a 2000 ($N > 2000$), se eligió la condición 3. Siendo el modelo que mejor cumple con las condiciones anteriores dando un factor de cola promedio para ceftazidima de 0,2730 y para imipenem de 0,1425, un numero de platos teóricos promedio para ceftazidima de 2281 y para imipenem de 4857 y a esto sumado al análisis de los gráficos obtenidos (Anexo 8A), a las distintas condiciones de trabajo se determinó que las condiciones de trabajo para el desarrollo del método de validación son las siguientes:

Tabla 5-6. Condiciones de trabajo elegidas para el desarrollo del método de validación.

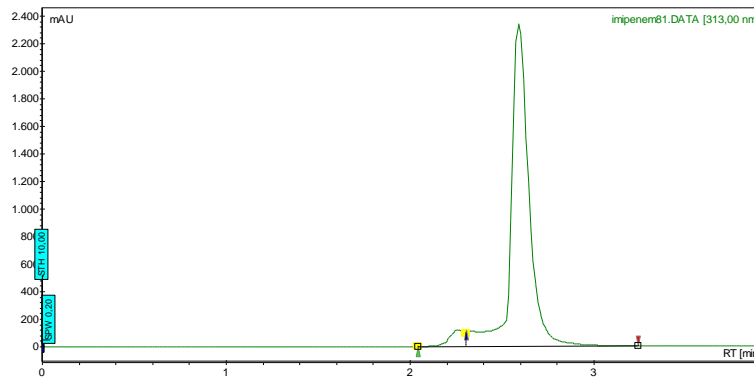
<i>Condiciones</i>	<i>Ceftazidima</i>	<i>Imipenem</i>
Columna	C18	C18
Metanol	40%	40%
Buffer	60% 0.1N	60% 0.1N
Flujo	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Temperatura	35°C	35°C
Longitud de onda	260 nm	313 nm

Es importante destacar que todos los resultados que se presentaran a continuación fueron obtenidos a las mismas condiciones de trabajo para el desarrollo tanto de ceftazidima como de imipenem por lo explicado anteriormente.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos a las condiciones elegidas **Figura 5-1**, para ceftazidima y **Figura 5-2**, para imipenem.



Figuras 5-1. Ceftazidima a las condiciones elegidas (condición 3).



Figuras 5-2. Imipenem a las condiciones elegidas (condición 3).

5.1.2 Parámetros de linealidad

5.1.2.1 Ceftazidima

A partir de la solución estándar de ceftazidima, se prepararon 6 diluciones del fármaco a concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 ppm. Cada concentración se inyectó por triplicado y se determinó la regresión lineal (**Anexo 8B**). Se obtuvo la curva de regresión lineal y los datos se presentan en la **Tabla 5-7**.

Tabla 5-7. Prueba de linealidad para la determinación de Ceftazidima.

Resultados	Ceftazidima
Ecuación de la recta	$Y=1,413x + 11,261$
Coefficiente de correlación múltiple	0,9996
Coefficiente de determinación R^2	0,9991
R^2 ajustado	0,9989
Error típico	3,5413
Observaciones	6
Intercepción	11,2609
Pendiente	1,4129
p-value	0,0024

Para determinar si existe correlación lineal significativa con una probabilidad del 95% se calculó un $t_{\text{calculado}}$, y se comparó con el t_{tabulado} , que se muestran en la **Tabla 5-8**.

Tabla 5-8. Resultados ensayos t student para determinar correlación lineal.

Resultados	Ceftazidima
$t_{\text{calculado}}$	70,682
t_{tabulado}	2,571

El coeficiente de correlación r y r^2 es de 0,9996 y 0,9992, respectivamente. Muchos autores plantean que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Como el valor de r obtenido es mayor a esta cifra (0,9996) se dice que el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, esto quiere decir que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Además, para determinar si la correlación lineal es significativa, se realizó un test t de Student con una probabilidad del 95%, siendo la hipótesis nula que no existe correlación lineal. En este caso el t_{tabulado} resulto ser de 2,571 y el $t_{\text{calculado}}$ resulto con un valor de 70,682; esto se interpreta de la siguiente forma: al ser $t_{\text{calculado}} > t_{\text{observado}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula de no linealidad y esto indicaría que existe correlación lineal, esto se ve reflejado en el p -value que fue de 0,0024 lo que indica que es significativo.

Luego, la evidencia indicaría que la respuesta del equipo fue significativamente lineal, o sea directamente proporcional a las distintas concentraciones, en el rango de las concentraciones que van desde 25 ppm hasta 200 ppm de ceftazidima.

5.1.2.2 Imipenem

A partir de la solución estándar de Imipenem, se prepararon 6 diluciones del fármaco a concentraciones de 25, 50, 65, 80 y 100 ppm. Cada concentración se leyó por triplicado y se determinó la regresión lineal (**Anexo 8B**). Se obtuvo la curva de regresión lineal y los datos se presenta en la **Tabla 5-9**.

Tabla 5-9. Prueba de linealidad para la determinación de Imipenem.

Resultados	Imipenem
Ecuación de la recta	$Y=1,3169X + 2,4367$
Coefficiente de correlación múltiple	0,9993
Coefficiente de determinación R^2	0,9986
R^2 ajustado	0,9983
Error típico	1,5029
Observaciones	6
Intercepción	-1,7757
Pendiente	0,7583
p-value	0,0062

Para determinar si existe correlación lineal significativa con una probabilidad del 95% se calculó un $t_{\text{calculado}}$, y se comparó con el t_{tabulado} , que se muestran en la **Tabla 5-10**.

Tabla 5-10. Resultados ensayos t student para determinar correlación lineal.

Resultados	Imipenem
$t_{\text{calculado}}$	53,4150
t_{tabulado}	2,5710

El coeficiente de correlación r y r^2 es de 0,9993 y 0,9990 respectivamente. Se plantea que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Como el valor de r obtenido es mayor a esta cifra (0,9993) se dice que el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, esto quiere decir que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

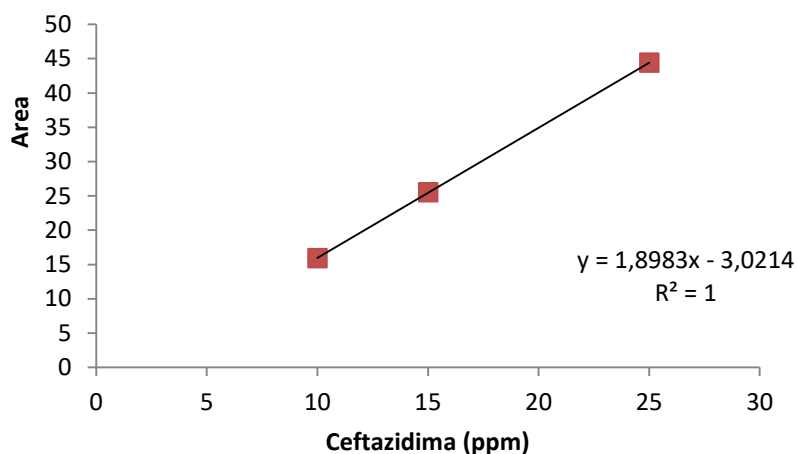
Además, para determinar si la correlación lineal es significativa, se realizó un test t de Student con una probabilidad del 95%, siendo la hipótesis nula que no existe correlación lineal. En este caso el t tabulado resultó ser de 2,571 y el $t_{\text{calculado}}$ resultó con un valor de 53,415; esto se interpreta de la siguiente forma: al ser $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula de no linealidad y esto indica que si existe correlación lineal, esto se ve reflejado en el p -value que fue de 0,0062 lo que indica que es significativo.

Luego, la evidencia indicaría que la respuesta del equipo fue significativamente lineal, o sea directamente proporcional a las distintas concentraciones, en el rango de las concentraciones que desde 25 ppm hasta 100 ppm de imipenem.

5.1.3 Parámetros de sensibilidad

5.1.3.1 Ceftazidima

Para la determinación de la sensibilidad se calculó una nueva curva de regresión lineal con concentraciones más pequeñas 10, 15, 25 ppm mostrando los resultados de esta en la **Figura 5-3**.



Figuras 5-3. Regresión lineal para la determinación de sensibilidad del método para la determinación de cefotazidima. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

Posteriormente con los datos obtenidos se calculan los límites (LOQ y LOD) y se presentan en la **Tabla 5-11**.

Tabla 5-11. Resultados regresión de la curva desviación estándar vs linealidad de la concentración. Valores de Limite de Detección y Límite de Cuantificación.

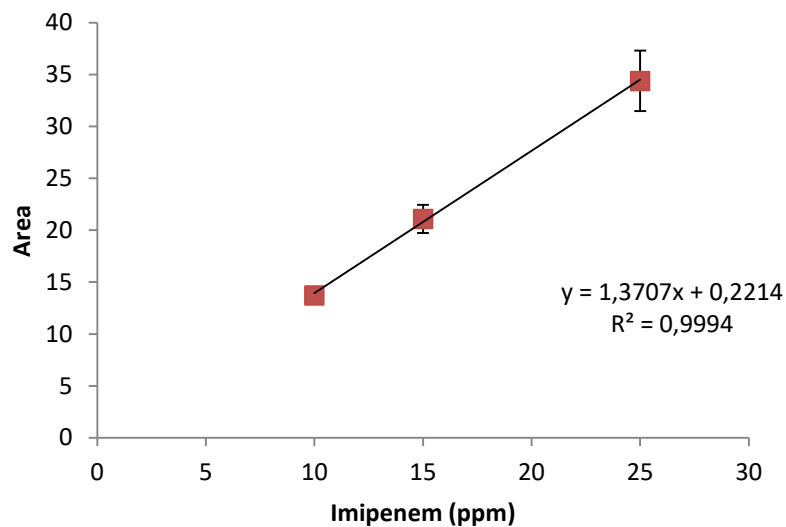
Resultados	Cefotazidima
Ecuación de la recta	$Y = 0,0153x + 0,5334$
Coefficiente de correlación	0,9264
Límite de Detección	2,7073ppm
Límite de Cuantificación	7,537ppm

El ensayo de determinación de sensibilidad mostro un coeficiente de correlación r de 0,9999 lo que indica linealidad en el rango ensayado. Los parámetros de sensibilidad

calculados, límite de cuantificación y límite de detección, que se muestran en la **Tabla 5-11**, permitieron determinar que la cantidad mínima que se puede detectar con este método corresponde a 2,7073 ppm y que la cantidad mínima que se puede cuantificar en forma confiable para la determinación es de 7,537 ppm. Estos valores nos indican que la sensibilidad del método es adecuada para la determinación de ceftazidima.

5.1.3.2 Imipenem

Para la determinación de la sensibilidad se calculó una nueva curva de regresión lineal con concentraciones más pequeñas 10, 15, 25 ppm, mostrando los resultados de esta en la **Figura 5-4**.



Figuras 5-4. Regresión lineal para la determinación de sensibilidad del método para la determinación de Imipenem. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

Posteriormente con los datos obtenidos se calculan los límites (LOQ y LOD) y se presentan en la **Tabla 5-12**.

Tabla 5-12. Resultados regresión de la curva desviación estándar vs linealidad de la concentración. Valores de Limite de Detección y Limite de Cuantificación.

Resultados	Imipenem
Ecuación de la recta	$Y = 0,0116x + 0,3115$
Coefficiente de correlación	0,8665
Límite de Detección	1,1189ppm
Límite de Cuantificación	3,1150ppm

El ensayo de determinación de sensibilidad mostro un coeficiente de correlación r de 0,9997 lo que indica linealidad en el rango ensayado. Los parámetros de sensibilidad calculados, límite de cuantificación y límite de detección, que se muestran en la **Tabla 5-12**, permitieron determinar que la cantidad mínima que se puede detectar con este método corresponde a 1,1189 ppm y que la cantidad mínima que se puede cuantificar en forma confiable para la determinación 3,1150 ppm. Estos valores nos indican que la sensibilidad del método es adecuada para la determinación de imipenem.

5.1.4 Parámetros de precisión.

5.1.4.1 Ceftazidima.

La precisión del método analítico se realizó midiendo 10 inyecciones del estándar realizadas por el mismo analista, el mismo día y en el mismo equipo. Los resultados obtenidos se ven la **Tabla 5-13**.

Tabla 5-13. Resultados de precisión para el método de determinación de ceftazidima.

Parámetro estadístico	Ceftazidima 50ppm
Recuperación	95,4834
S	0,2746
RSD % teórico	9,9200
RSD % real	0,2876
Intervalo de confianza al 95 % de confianza	93,2214 – 97,7454

En la **Tablas 5-14** se presentan los resultados para la precisión intermedia del método.

Tabla 5-14. Resultados precisión intermedia ceftazidima (50 ppm).

Parámetro estadístico	Condición 1	Condición 2
Recuperación	95,4126	96,1557
S	0,3012	0,4663
RSD % teórico	9,9200	9,9200
RSD % real	0,3157	0,4849
n	20	20

(1) Condición 1. Dos analistas, diferentes días, mismo equipo.

(2) Condición 2. Dos analistas, mismo día, mismo equipo.

Este parámetro fue evaluado con 2 pruebas: precisión (repetitividad) y precisión intermedia. Para la repetitividad, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 5-13**, la media o el porcentaje de recuperación fue de un 95,4834% y la desviación estándar fue de un 0,2746%. Para comprobar que tan preciso fue el método realizado por un mismo operario,

en un mismo día y en un mismo equipo, se calculó el error relativo, que resultó ser de un 0,2876% que es menor al 9,92% que corresponde al RSD teórico o máximo permitido.

Los resultados de la precisión intermedia para las distintas condiciones o circunstancias que son ajenas a la metodología analítica, se muestran en la **Tabla 5-14** Condición 1 y Condición 2. En la **Tabla 5-14** (condición 1), indica que el coeficiente de variación fue de 0,3157% y el error relativo fue de 0,3012%, mientras que en la **Tabla 5-14** (condición 2), se presenta el coeficiente de variación de 0,4849% y error relativo de un 0,4663% aproximado. Para ambos casos el error es menor al 9,92% permitido para las concentraciones de trabajo, indicando que el método es confiable y que la determinación de ceftazidima no se ve afectada por la variación de analista y día en que se realice la cuantificación.

5.1.4.2 Imipenem

La precisión del método analítico se realizó midiendo 10 inyecciones del estándar realizadas por el mismo analista, el mismo día y en el mismo equipo. Los resultados obtenidos se ven la **Tabla 5-15**.

Tabla 5-15. Resultados de precisión para el método de determinación de ceftazidima.

Parámetro estadístico	Imipenem 50ppm
Recuperación	98,6000
S	0,6315
RSD % teórico	9,9200
RSD % real	0,6405
Intervalo de confianza al 95 % de confianza	96,3380 – 100,8620

En la **Tablas 5-15** se presentan los resultados para la precisión intermedia del método.

Tabla 5-16. Resultados precisión intermedia.

Parámetro estadístico	Condición 1	Condición 2
Recuperación	99,0406	98,5850
S	0,4856	0,6269
RSD % teórico	9,9200	9,9200
RSD % real	0,4903	0,6359
n	20	20

(1) Condición 1. Dos analistas, diferentes días, mismo equipo.

(2) Condición 2. Dos analistas, mismo día, mismo equipo.

Este parámetro fue evaluado con 2 pruebas: precisión (repetitividad) y precisión intermedia. Para la repetitividad, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 5-15**, la media o el porcentaje de recuperación fue de un 98,6000% y la desviación estándar fue de un 0,6315%. Para comprobar que tan preciso fue el método realizado por un mismo operario, en un mismo día y en un mismo equipo, se calculó el error relativo, que resultó ser de un 0,6405% que es menor al 9,92% que corresponde al RSD teórico o máximo permitido.

Los resultados de la precisión intermedia para las distintas condiciones o circunstancias que son ajenas a la metodología analítica se muestran en la **Tabla 5-16** condición 1 y condición 2. En la **Tabla 5-16** (condición 1), se indica que el coeficiente de variación fue de 0,4903% y el error relativo fue de 0,4856%, mientras que en la **Tabla 5-16** (condición 2), se presenta el coeficiente de variación de 0,6359% y error relativo de un 0,6269% aproximado. Para ambos casos el error es menor al 9,92% permitido para las concentraciones de trabajo, indicando el método es confiable y que la determinación de imipenem no se ve afectada por la variación de analista y día en que se realice la cuantificación.

5.1.5 Parámetros de exactitud

5.1.5.1 Cefotaxidima

Se leyeron 3 concentraciones que corresponden al 80, 100 y 120% de la concentración esperada de la solución estándar siendo el 100% de esta correspondiente a 50 ppm y cada una se realizó por triplicado, se calculó el % de recuperación para cada concentración individual, que se presenta en la **Tabla 5-17**, cabe destacar que estas lecturas se realizaron en plasma sanguíneo de 3 voluntarios, la cual se enriqueció con cefotaxidima para alcanzar las concentraciones a las que se iba a trabajar.

Tabla 5-17. Resultados exactitud para la determinación de cefotaxidima a diferentes concentraciones.

Parámetro estadístico	40ppm	50ppm	60ppm
Porcentaje	80%	100%	120%
Promedio	79,3191	96,9648	119,8004
S	0,2830	0,3562	0,5103
% de recuperación	99,5028	97,0120	99,7157

Se calculó el porcentaje de recuperación para las 3 concentraciones en conjunto, como se muestra en la **Tabla 5-18**.

Tabla 5-18. Resultados exactitud para la determinación de ceftazidima para las 9 mediciones ensayadas.

Parámetro estadístico	Ceftazidima
Promedio de recuperación	98,7435
S	0,3832
RSD	0,3881
$t_{\text{observado}}$	1,0930
t_{tabulado}	2,306

La recuperación desde el plasma con ceftazidima de concentraciones individuales correspondiente al 80%, 100% y 120% de la concentración nominal que aparece en la **Tabla 5-17**, en todos los casos fue cercana al 100% con una desviación estándar menor o igual a 0,5103%. Por otra parte el promedio de los valores de recuperación para las 3 concentraciones anteriores (**Tabla 5-18**), corresponde a un 98,7435% con una desviación estándar del 0,3832%. Para evaluar la significancia estadística de estos resultados, se realizó un test t de Student, resultando un test $t_{\text{observado}} < t_{\text{calculado}}$ ($1,0930 < 2,3060$), indicando que el método tiene la exactitud requerida y se descarta algún error sistemático. Luego, los métodos empleados indica la concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero.

5.1.5.2 Imipenem

Se leyeron 3 concentraciones que corresponden al 80, 100 y 120% de la concentración esperada de la solución estándar siendo el 100% de esta 50 ppm y cada una se realizó por triplicado, se calculó el % de recuperación para cada concentración. Individualmente que se

presenta en la **Tabla 5-19**, cabe destacar que estas lecturas se realizaron en plasma sanguíneo de 3 voluntarios, la cual se enriqueció con imipenem para alcanzar las concentraciones a las que se iba a trabajar.

Tabla 5-19. Resultados exactitud para la determinación de imipenem a diferentes concentraciones.

Parámetro estadístico	40ppm	50ppm	60ppm
Porcentaje	80%	100%	120%
Promedio recuperación	79,6770	98,5090	119,7711
S	0,0877	0,2320	0,4018
% de recuperación	99,7860	98,0534	99,1765

Se calculó el porcentaje de recuperación para las 3 concentraciones en conjunto, como se muestra en la **Tabla 5-20**.

Tabla 5-20. Resultados exactitud para la determinación de imipenem para las 9 mediciones ensayadas.

Parámetro estadístico	Imipenem
Promedio de recuperación	99,1150
S	0,1964
RSD	0,1982
t _{observado}	1,502
t _{tabulado}	2,306

La recuperación desde el plasma con imipenem de concentraciones individuales correspondiente al 80%, 100% y 120% de la concentración nominal que aparece en la **Tabla 5-19**, en todos los casos fue cercana al 100% con una desviación estándar menos o igual a 0,4018%. Por otra parte el promedio de los valores de recuperación para las 3 concentraciones anteriores (**Tabla 5-20**), corresponde a un 99,1150% con una desviación estándar del 0,1964%. Para evaluar la significancia estadística de estos resultados, se realizó un test t de Student, resultando un test $t_{\text{observado}} < t_{\text{calculado}}$ ($1.502 < 2,306$), indicando que el método tiene la exactitud requerida y se descarta algún error sistemático. Luego, los métodos empleados indican la concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero.

5.1.6 Parámetros de robustez

5.1.6.1 Ceftazidima

Este parámetro evalúa como varía la respuesta del método después de cambios comunes pero deliberados en el método. Se evaluaron 15 respuestas a distintos cambios de variables tales como temperatura y flujo como se muestra en la **Tabla 5-21**.

Tabla 5-21. Variación de parámetros experimentales en la respuesta obtenida para ceftazidima.

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Flujo	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Temperatura	34	34	34	35	35	35	36	36	36
Presión	9	9	9	9,1	9	9	9	9	9,1
Área	75,9	74,6	78,6	78,9	76,3	74,6	75,8	74,8	78,1
Altura	684,1	706,6	696,2	732,9	745,2	743	754,2	7,348	744,1
Tiempo inicio	2,23	2,241	2,237	2,213	2,24	2,197	2,21	2,19	2,198
Tiempo retención	2,489	2,492	2,477	2,493	2,427	2,28	2,444	2,451	2,492
Tiempo final	2,898	2,896	2,898	2,903	2,925	2,92	2,801	2,781	2,811

Parámetro	10	11	12	13	14	15
Flujo	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9
Temperatura	35	35	35	35	35	35
Presión	8,9	9	9	9,2	9,3	9,3
Área	77,8	77,9	76,8	77,3	78,2	76,4
Altura	691,2	695,1	700,3	756,3	763,2	759
Tiempo inicio	2,333	2,267	2,24	2,235	2,202	2,233
Tiempo retención	2,533	2,507	2,427	2,267	2,32	2,28
Tiempo final	3,067	3,213	3,147	2,827	2,853	2,867

Las respuestas analizadas fueron tiempo de retención y el área cromatografica. Respecto al área cromatografica ninguna de las variables estudiadas como temperatura, preparación de la muestra y flujo de la fase móvil, resulto alterar significativamente al área cromatografica, por lo que consecuentemente no se altera significativamente la masa hallada versus la masa real, esta evidencia indica que el método es robusto respecto de estas variables.

5.1.6.2 Imipenem

Este parámetro evalúa como varia la respuesta del método después de cambios comunes pero deliberados en el método. Se evaluaron 15 respuestas a distintos cambios de variables tales como temperatura y flujo como se muestra en la **Tabla 5-22**.

Tabla 5-22. Variación de parámetros experimentales en la respuesta obtenida para Imipenem.

Parámetros	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Flujo	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9
Temperatura	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Presión	8,9	9	8,9	9,1	9,1	9	9,3	9,5	9,3
Área	62,8	67,9	68,8	68,9	66,3	64,6	66,5	70,2	66,1
Altura	691,2	695,1	700,3	732,9	745,2	743	756,3	763,2	759
Tiempo inicio	2,452	2,391	2,401	2,373	2,33	2,401	2,235	2,202	2,233
Tiempo retención	2,501	2,498	2,492	2,52	2,451	2,49	2,4	2,392	2,42
Tiempo final	2,845	2,833	2,801	2,8	2,777	2,781	2701	2,693	2,697

Parámetros	10	11	12	13	14	15
Flujo	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Temperatura	34	34	34	36	36	36
Presión	8,9	9	9	9	9	9,1
Área	65,8	68,9	70,2	70,8	64,8	68,1
Altura	684,1	706,6	696,2	754,2	7,348	744,1
Tiempo inicio	2,107	2,08	2,373	2,36	2,389	2,412
Tiempo retención	2,187	2,147	2,467	2,444	2,451	2,492
Tiempo final	2,307	2,28	2,627	2,801	2,781	2,811

Las respuestas analizadas fueron tiempo de retención y el área cromatografica. Respecto al área cromatografica ninguna de las variables estudiadas como temperatura, preparación de la muestra y flujo de la fase móvil resulto alterar significativamente al área cromatografica, por lo que consecuentemente no se altera significativamente la masa hallada versus la masa real, esta evidencia indica que el método es robusto respecto de estas variables.

5.1.7 Parámetros de especificidad

5.1.7.1 Ceftazidima

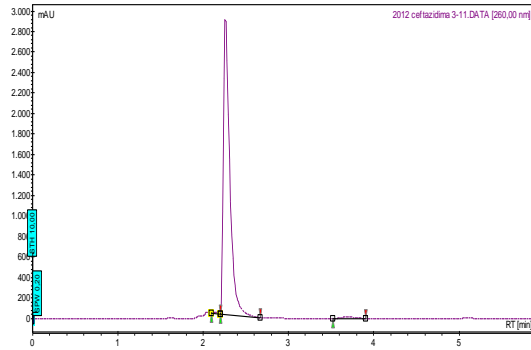
Se realizó un ensayo de degradación bajo distintas condiciones, termólisis, hidrolisis acida y básica, fotólisis y oxidación, y se calculó el porcentaje de recuperación, el cual se presenta en la **Tabla 5-23**.

Tabla 5-23. % Recuperación después de degradación artificial de ceftazidima según agentes que se indican.

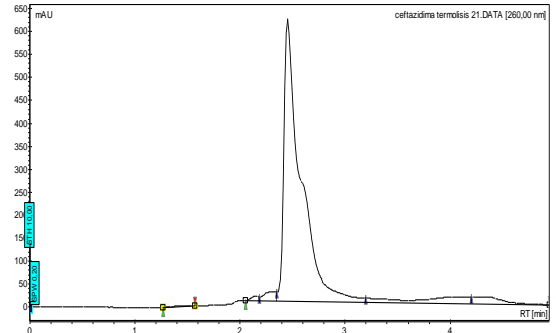
Ensayo	Área	Concentración (ppm)	% Recuperación
Blanco	78,9	47,87	95,74
Termólisis	57,525	32,74	65,48
Hidrolisis básica	45,65	24,34	48,68
Hidrolisis acida	43,5	22,81	45,63
Fotólisis	59,65	34,25	68,49
Oxidación	41,55	21,44	42,87

Los cromatogramas obtenidos en las distintas condiciones expuestas, se muestran en las **Tabla 5-24**.

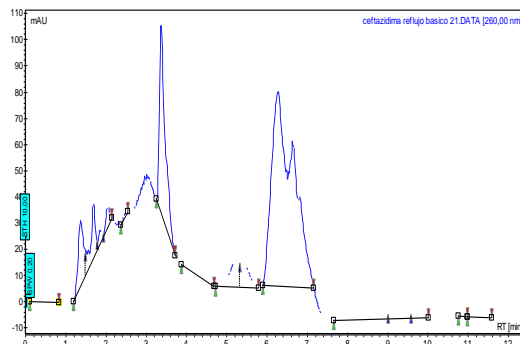
Tabla 5-24. Respuesta del imipenem a las diferentes exposiciones de degradación sometidas.



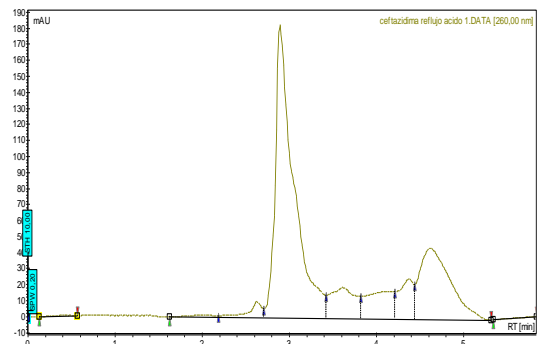
A: Sin exponer a degradacion utilizado como blanco



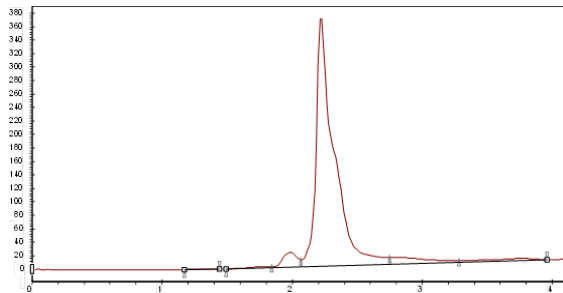
B: Efecto al ser expuesta a termolisis



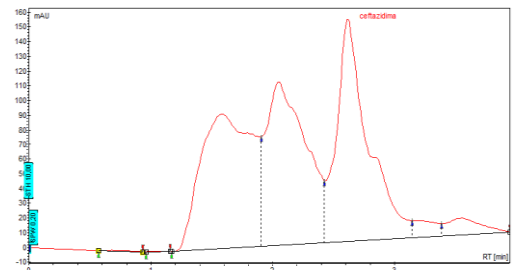
C: Efecto al ser expuesto a hidrolisis basica



D: Efecto al ser expuesto a hidrolisis acida



E:Efecto al ser expuesto a la luz solar



F: Efecto al ser expuesto a oxidacion

Este parámetro evaluó si la respuesta del equipo era específica para ceftazidima y la influencia de procesos tales como la oxidación, la hidrólisis ácida o alcalina, la degradación por aumento de la temperatura y exposición solar, con la finalidad de observar si se generaban productos de degradación como se muestran en la **Tabla 5-24**.

En exposición a termólisis **Tabla 5-24 B**, se muestran al imipenem con un porcentaje de recuperación de 65,48%, esto indica que es relativamente estable frente a la temperatura, aunque su porcentaje de recuperación no supera el 80%, indicando que es termolábil.

En la exposición a hidrólisis básica **Tabla 5-24 C**, se muestra un porcentaje de recuperación de 48,65%, también es posible observar que se producen varios productos de degradación entre 1 min y 4 min y entre los 6 min y 7 min, esto indica que es sensible a ser expuesta a condiciones básicas.

En la hidrólisis acida **Tabla 5-24 D**, se observa que afecta considerablemente su porcentaje de recuperación, obteniéndose un resultado de 45,63%, indicando que el fármaco es sensible a la acidez.

En la exposición a la luz solar o fotólisis **Tabla 5-24 E**, se obtiene un porcentaje de recuperación de 68,49%, siendo el porcentaje de recuperación más alto, sin embargo, no supera el 80%, esto indica que la ceftazidima es fotolábil.

En la exposición a oxidación **Tabla 5-24 F**, se produce la mayor degradación con un 42,87% aproximado de recuperación, también es posible observar que se producen varios productos de degradación entre 1 min y los 3 min, indicando que la ceftazidima es muy sensible a la oxidación.

5.1.7.2 Imipenem

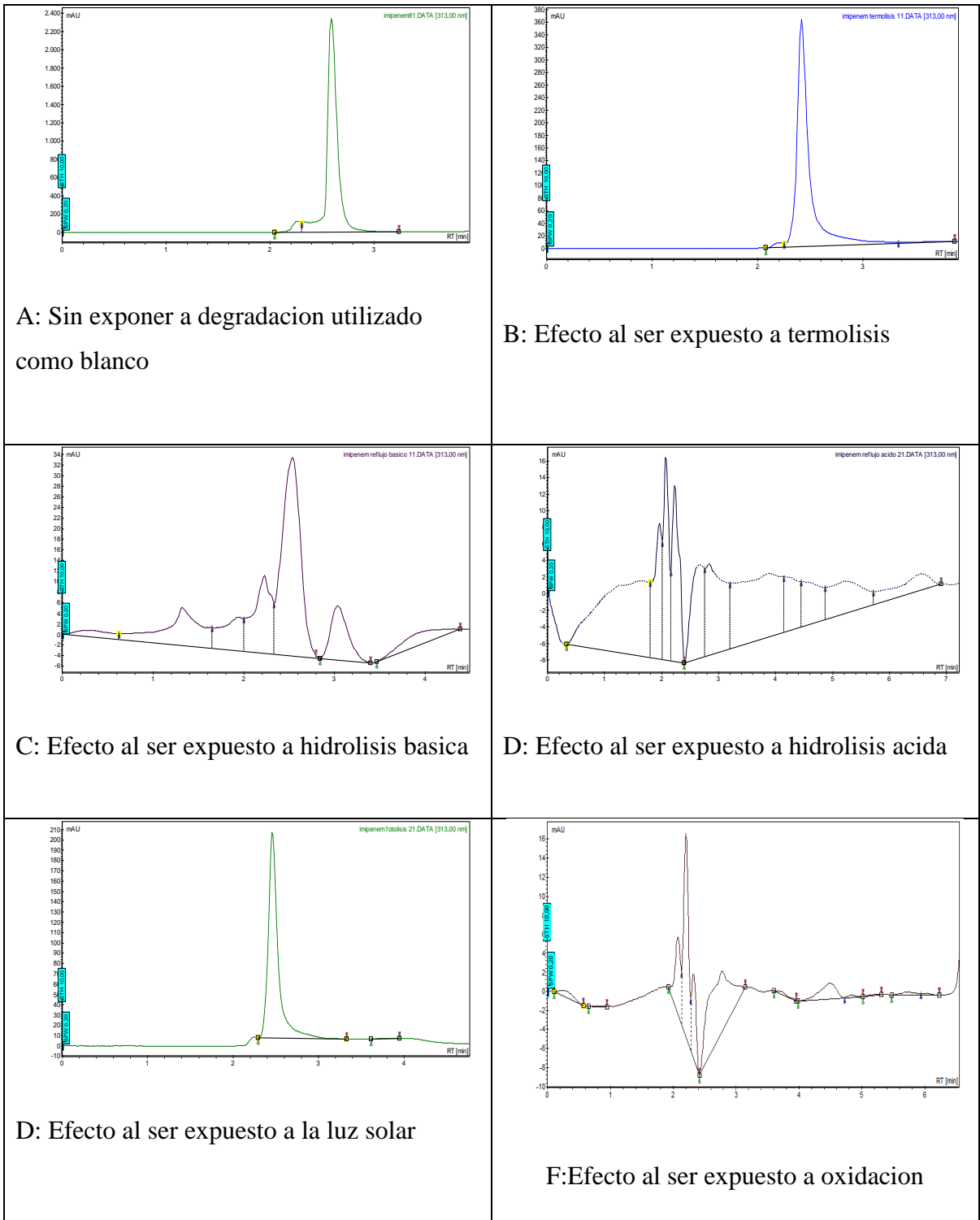
Se realizó un ensayo de degradación bajo distintas condiciones, termólisis, hidrólisis acida y básica, fotólisis y oxidación, y se calculó el porcentaje de recuperación, el cual se presenta en la **Tabla 5-25**.

Tabla 5-25. % Recuperación de degradación artificial de imipenem según agentes que se indican.

Ensayo	Área	Concentración (ppm)	% Recuperación
Termólisis	51,1	36,95	73,91
Hidrólisis básica	7,55	3,88	7,77
Hidrólisis acida	5,45	2,29	4,58
Fotólisis	26,65	18,39	36,77
Oxidación	5,6	2,40	4,80

Los cromatogramas obtenidos en las distintas condiciones expuestas, se muestran en las **Tabla 5-26**.

Tabla 5-26. Respuesta del imipenem a las diferentes exposiciones de degradación sometidas.



Este parámetro evaluó si la respuesta del equipo era específica para ceftazidima y la influencia de procesos tales como la oxidación, la hidrólisis ácida o alcalina, la degradación por aumento de la temperatura y exposición solar, con la finalidad de observar si se generaban productos de degradación como se ve en la **Tabla 5-25**.

En exposición a termólisis **Tabla 5-26 B**, se muestra al imipenem con un porcentaje de recuperación de 73,91%, siendo el porcentaje de recuperación más alto obtenido para estas pruebas, esto indica que es relativamente estable frente a la temperatura, aunque su porcentaje de recuperación no supera el 80%, indicando que es termolábil.

En la exposición a hidrólisis básica **Tabla 5-26 C**, se muestra un porcentaje de recuperación de 7,77%, también es posible observar que se producen varios productos de degradación entre 1 min y 3 min, esto indica que el imipenem es muy sensible a ser expuesta a condiciones básicas.

En la hidrólisis ácida **Tabla 5-26 D**, ocurre la mayor degradación, afectando considerablemente su porcentaje de recuperación, obteniéndose un resultado de 4,58%, también es posible observar que se producen varios productos de degradación entre 2 min y 3 min, indicando que el fármaco es muy sensible a la acidez.

En la exposición a la luz solar o fotólisis **Tabla 5-26 E**, se obtiene un porcentaje de recuperación de 36,77%, esto indica que el imipenem es fotolábil.

En la exposición a oxidación **Tabla 5-26 F**, se obtiene un 4,80% aproximado de recuperación, indicando que el imipenem es muy sensible a la oxidación.

6 CONCLUSIÓN

- Se implementó una metodología analítica en HPLC que permite la detección y cuantificación de los niveles plasmáticos de ceftazidima que cumple con los requisitos establecidos por la FDA e ISP para estos tipos de análisis.
- Se implementó una metodología analítica en HPLC que permite la detección y cuantificación de los niveles plasmáticos de imipenem, que cumple con los requisitos establecidos por la FDA e ISP para estos tipos de análisis.
- Se estableció un método de extracción de ceftazidima e imipenem en plasma, rápido, reproducible y con una buena recuperación. El método resulto ser conveniente por lo sencillo, teniendo en cuenta la naturaleza compleja de la matriz de la muestra, además requiere pequeños volúmenes de plasma.
- La técnica HPLC para la determinación de ceftazidima fue validada y resulto ser confiable, lo que fue establecido por sus características de sensibilidad, precisión, exactitud y especificidad, siendo un método útil para la monitorización de ceftazidima en pacientes con tratamiento de este fármaco.
- La técnica HPLC para la determinación de imipenem fue validada y resulto ser confiable, lo que fue establecido por sus características de sensibilidad, precisión, exactitud y especificidad, siendo un método útil para la monitorización de imipenem en pacientes con tratamiento de este fármaco.

7 BIBLIOGRAFIA

- Aguilar L., Gimenez M., Martin J., Prieto J. Optimización farmacodinamia de la administración de ceftazidima frente a *pseudomonas aeruginosa*: Infusión continua o administración intermitente?. Rev. Esp. Quimioterap., Marzo 2005; Vol 18 (Nº1):21-25.
- Álvarez-Ierma F, Grau S, Marín-casino M, Olaechea P, Sánchez M. Monitorización de concentraciones plasmáticas de antibióticos en hospitales españoles *. 2006;24(1):14-19.
- Arias ER, María D, Herrera L, Hilev D, Muguercia L. Carbapenémicos y monobactámicos. 1998;8(1):66-70.
- Calvo M. V., García M., Martínez J., Fernández M. Farmacocinética clínica. 2004 Pag 629-663.
- Carlucci G., Biordi L., Bologna M. Human Plasma and Aqueous Humor Determination of Imipenem by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection., Journal of Liquid Chromatography, Vol. 16, Iss. 11, 1993.
- Denooz R., Charlier C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2008;864(1-2):161-7.
- Domínguez-Gil A, Hurle y Suarez M. Universidad de Salamanca (1997). Curso de determinación de fármacos por HPLC en fluidos biológicos. Salamanca. Pág.: 107.
- Farmacología de Flores, 1998. Mediavilla A. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. Pag: 1061-1083.

- Gonzales J. y Calvo A . El despertar de la era antibiótica. Rev. Esp. Quimioterap. Septiembre 2005; Vol.18 (Nº 3): 247-251.
- Huber, L. (1998). Validation of analytical methods en www.labcompliance.com.
- Kumar A., Ellis P., Arabi Y., Roberts D., Light B., Peters C., Ahsan M., Chateau D., Parrillo J., Dodek P., Wood G. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock, Chest 2009;136;1237-1248; Prepublished online August 20, 2009; DOI 10.1378/chest.09-0087.
- Marín M. y Gudiol F. Antibióticos betalactámicos, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2003;21(1):42-55.
- Marín RZ, Regateiro AA, Gundián J. Cefalosporinas. 1998;8(1):40-47.
- Martínez L., Rodríguez A., Cruz J. Validación de la técnica para la determinación cuantitativa de cefotaxima sódica por clar. 2001;35(2):104-108.
- McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, et al. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2010;878(22):2039-43.
- Merino L., Daffou B., Rojas F., Guerrero I., Roa L., Rodríguez L., Soto M., Aguilera M., Sandoval S. Guía técnica de los "Aspectos generales sobre la validación de métodos" 2010.
- Puentes, P., Ivens S.A. (2004) Introducción a la cromatografía de líquidos de alto performance. pág: 77.
- Quattrochi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S.I., Laba, R. F. (1992). Introducción a HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. Pag: 381.
- Rivas CSD. Resumen Descubrimiento. 2006:63-77.
- Rivero E., Herrera M., Larrondo H., Lozano D., León D. Carbapenémicos y monobactámicos, Acta Medica 1998;8(1):66-70.
- Sanchez C. Antibióticos, ayer, hoy y mañana. Revista QuímicaViva número 2, año 5, agosto 2006

- Roberts J., Ulldemolins M, Roberts M, McWhinney B, Ungererg J, Patersonh D., Lipmana J. Therapeutic drug monitoring of β -lactams in critically ill patients: proof of concept, *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (2010) 332–339.
- United States Pharmacopeia convention. USP XXIX. Official monographs. Ceftadizima 29 ed. Rockville Mag Printing, 2006:24914.
- United States Pharmacopeia convention. USP XXIX. Validation of compendial methods. 29 ed. Rockville Mag Printing, 2006:1982-4.
- Zamora R., Areau A., Gundia J., Manresa R., Sanchez., Morales R. Cefalosporinas, *Acta Medica* 1998;8(1):40-7.
- The Merck Index (2001) Thirteenth edition. Editorial Staff. USA. Merck & Co, inc.
- Skoog, D., Leary (1994) Análisis instrumental. 5a. Ed. McGraw-Hill, Madrid. pág: 1024.
- Therapeutic Drug Monitoring an Educational Guide (TDM), Siemens.

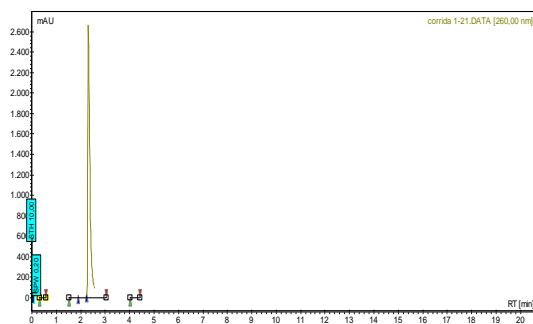
8 ANEXOS

Datos Ocupados en el cálculo de parámetros analíticos para la detección de ceftazidima e Imipenem por HPLC.

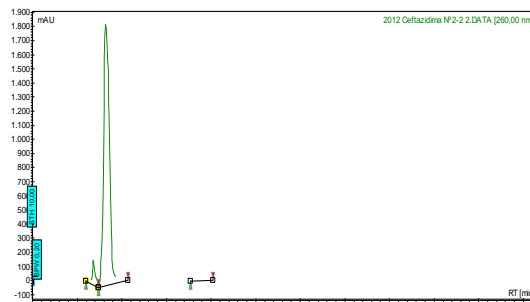
8A Determinación de las condiciones de trabajo

Ceftazidima

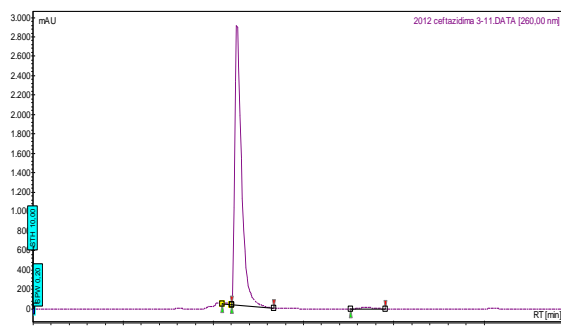
Tabla 8-1. Cromatogramas de ceftazidima obtenidos a las diferentes condiciones de trabajo analizadas.



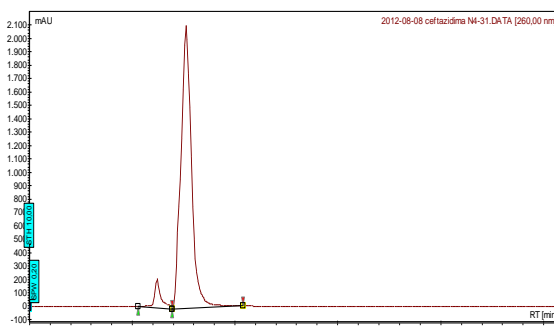
a) Cromatograma obtenido para la condición 1



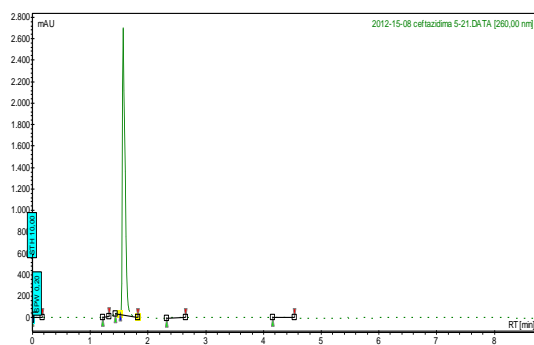
b) Cromatograma obtenido para la condición 2



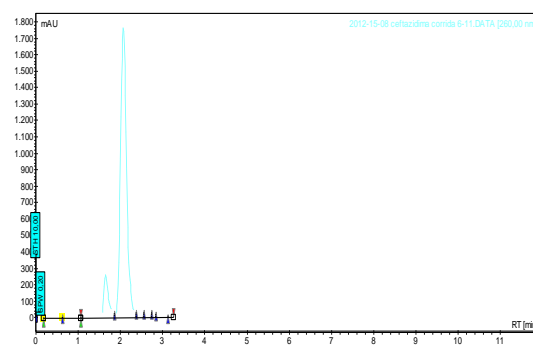
c) Cromatograma obtenido para la condición 3



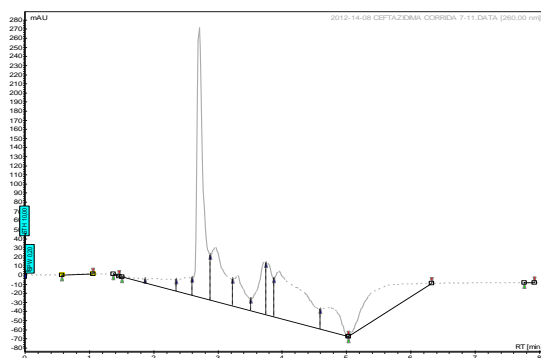
d) Cromatograma obtenido para la condición 4



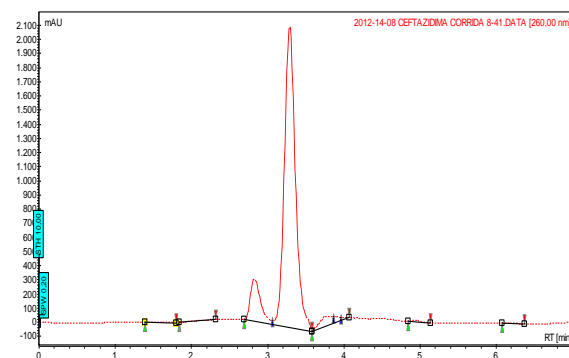
e) Cromatograma obtenido para la condición 5



f) Cromatograma obtenido para la condición 6



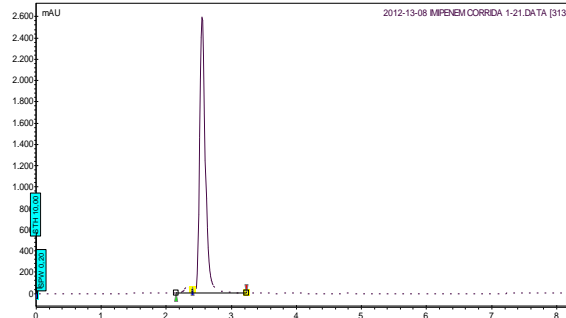
g) Cromatograma obtenido para la condición 7



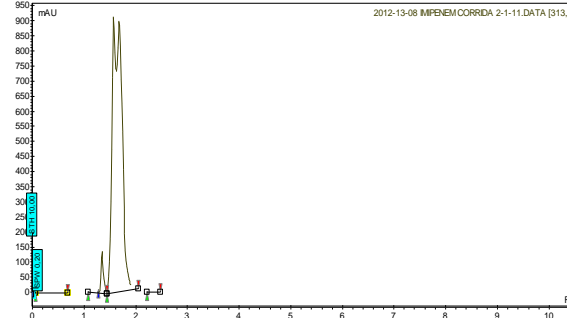
h) Cromatograma obtenido para la condición 8

Imipenem.

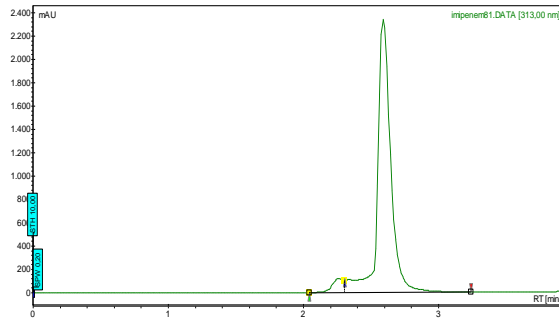
Tabla 8-2. Cromatogramas de imipenem obtenidos a las diferentes condiciones de trabajo analizadas.



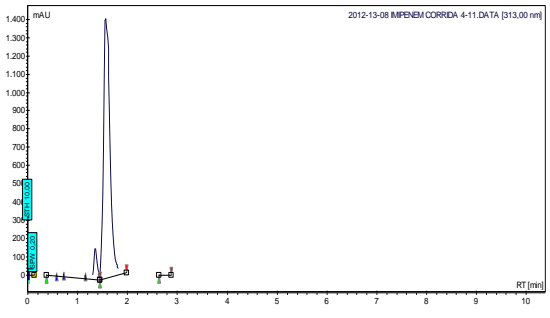
a) Cromatograma obtenido para la condición 1



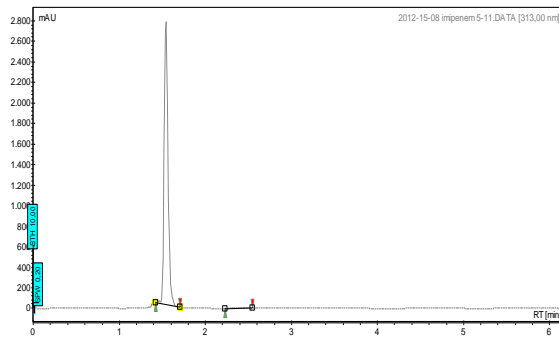
b) Cromatograma obtenido para la condición 2



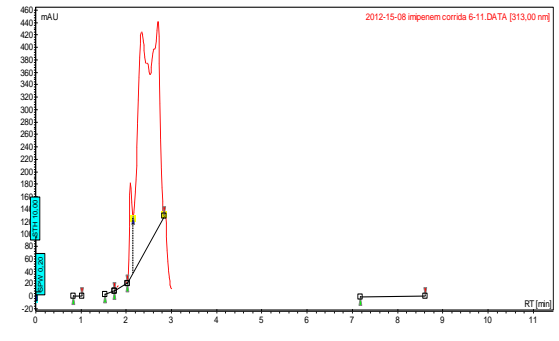
c) Cromatograma obtenido para la condición 3



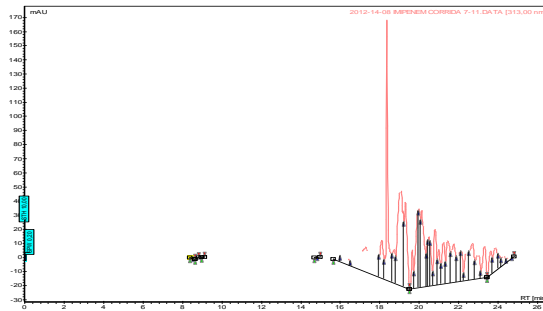
d) Cromatograma obtenido para la condición 4



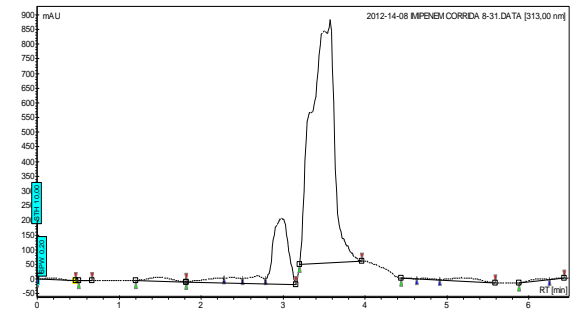
e) Cromatograma obtenido para la condición 5



f) Cromatograma obtenido para la condición 6



g) Cromatograma obtenido para la condición 7



h) Cromatograma obtenido para la condición 8

8B Linealidad.

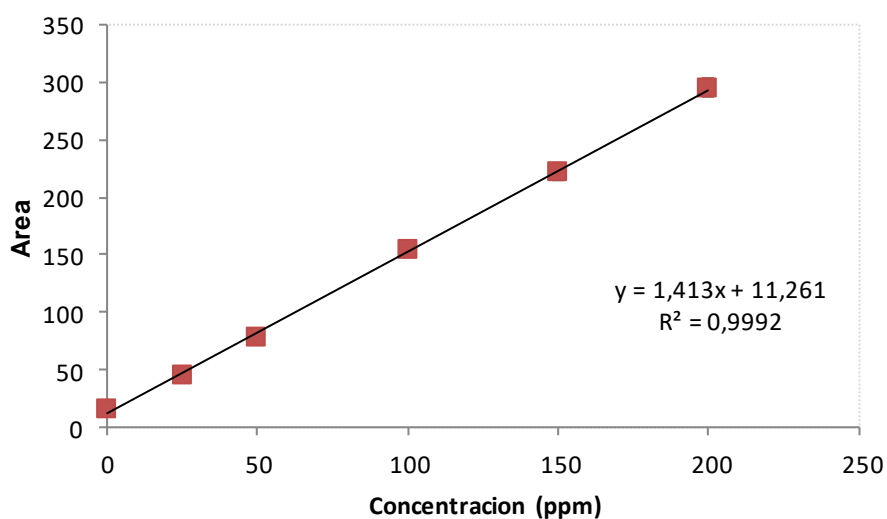
Ceftazidima

Los datos del área bajo la curva que se utilizaron para la curva de calibrado y linealidad del método de ceftazidima se presentan en la **Tabla 8-3**.

Tabla 8-3. Áreas bajo la curva promedio y desviación estándar para concentraciones seleccionadas de ceftazidima

CONCENTRACION PPM	A1	A2	A3	promedio	desviación
0	15,4	15,5	15,4	15,43	0,05
25	45,4	45,0	46,6	45,67	0,68
50	77,8	76,0	77,4	77,07	0,77
100	156,6	147,7	157,5	153,93	4,42
150	227,4	215,8	221,3	221,50	4,74
200	287,3	297,5	302,5	295,77	6,33

El grafico de linealidad resultado de los datos anteriores se muestra en la **Figura 8-1**.



Figuras 8-1. Regresión lineal para la determinación de Ceftazidima por cromatografía líquida (HPLC). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

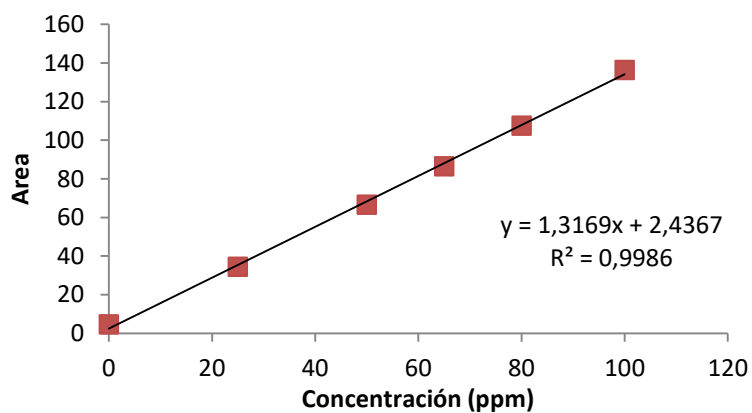
Imipenem

Los datos del área bajo la curva que se utilizaron para la curva de calibrado y linealidad del método de imipenem se presentan en la **Tabla 8-4**.

Tabla 8-4. Áreas bajo la curva promedio y desviación estándar para concentraciones seleccionadas de imipenem.

CONCENTRACION PPM	A1	A2	A3	Promedio	Desviación
	(mUA)				
0	4,3	4,6	4,7	4,53	0,21
25	36	33,4	34	34,47	1,36
50	65,1	64,8	70	66,63	2,92
65	88,7	84,2	86,6	86,50	2,25
80	109,6	109,9	102,9	107,47	3,96
100	139,5	132,5	137,3	136,43	3,58

El grafico de linealidad resultado de los datos anteriores se muestra en la **Figura 8-2**.



Figuras 8-2. Regresión lineal para la determinación de Imipenem por cromatografía líquida (HPLC). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

8C Selectividad

Ceftazidima

Se presentan las áreas bajo la curva para la determinación de los límites de cuantificación y detección para ceftazidima en la **Tabla 8-5**.

Tabla 8-5. Área bajo la curva para concentraciones seleccionadas para ceftazidima.

Conc.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Prom.	Desv.	RSD
10	16,1	16,8	16,3	15,3	15,8	17	14,6	17	14,9	15,1	15,91	0,919	6%
15	24,7	25,9	26,9	26,6	23,4	26,6	25,5	24,2	26,3	25,2	25,53	1,155	5%
25	45,4	45	44,3	43,2	45,7	44,4	42,4	45,8	42,6	45,3	44,41	1,270	3%

Imipenem

Se presentan las áreas bajo la curva para la determinación de los límites de cuantificación y detección para imipenem en la **Tabla 8-6**.

Tabla 8-6. Área bajo la curva para concentraciones seleccionadas para imipenem.

Conc.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Prom.	Desv.	RSD
10	13,8	13,6	14,3	12,9	13,7	14,1	13,4	13,7	14	13,8	14	0,389	3%
15	21	21,6	21,6	21,4	21	21,2	20,6	20,2	21,8	20,4	21	0,543	3%
25	35	33,4	33,7	34,3	34,9	34,4	35,2	34,6	33,9	34,5	34	0,582	2%

8D Precisión

Ceftazidima

Los datos del área bajo la curva y porcentaje de recuperación de ceftazidima, junto con las estadísticas derivadas de estos valores, que permitieron calcular la precisión de la técnica se presentan en la **Tabla 8-7**. Los datos de precisión intermedia evaluados al aplicar la técnica por dos analistas, en diferentes días y con el mismo equipo, se presentan en la **Tabla 8-8** y los correspondientes a precisión intermedia determinados con dos analistas aplicando la técnica el mismo día en el mismo equipo se presentan en la **Tabla 8-9**.

Tabla 8-7. Áreas y porcentajes de recuperación de ceftazidima para las diferentes inyecciones.

N° de inyección	Área	% Recuperado
1	79,6	96,73
2	78,6	95,31
3	79	95,88
4	78,9	95,74
5	78,6	95,31
6	78,2	94,75
7	78,8	95,60
8	78,4	95,03
9	78,8	95,60
10	78,3	94,89
Promedio	78,72	95,48
Desviación	0,40	0,50
RSD		0,52

Tabla 8-8. Áreas y porcentajes de recuperación de ceftazidima para las diferentes inyecciones.

N° de inyecciones	Áreas	% Recuperado
Operario 1		
1	47,73	95,46
2	47,73	95,46
3	47,94	95,88
4	47,09	94,18
5	47,66	95,31
6	47,52	95,03
7	48,29	96,59
8	47,66	95,31
9	48,01	96,02
10	47,66	95,31
Operario 2		
11	47,44	94,89
12	47,73	95,46
13	47,52	95,03
14	47,59	95,17
15	47,37	94,75
16	47,87	95,74
17	48,22	96,45
18	47,80	95,60
19	47,23	94,46
20	48,08	96,16
Promedio	47,71	95,41
Desviación	0,31	0,62
RSD		0,65

2 analistas, diferentes días, mismo equipo.

Tabla 8-9. Áreas y porcentajes de recuperación para las diferentes inyecciones para ceftazidima.

N° de inyecciones	Área	% Recuperado
Operario 1		
1	48,36	96,73
2	47,66	95,31
3	47,94	95,88
4	47,87	95,74
5	47,66	95,31
6	47,37	94,75
7	47,80	95,60
8	47,52	95,03
9	47,80	95,60
10	47,44	94,89
Operario 2		
11	48,36	96,73
12	47,94	95,88
13	48,58	97,15
14	48,50	97,01
15	48,29	96,59
16	48,08	96,16
17	49,21	98,43
18	48,22	96,45
19	48,29	96,59
20	48,65	97,30
Promedio	48,08	96,16
Desviación	0,45	0,91
RSD		0,95

2 analistas, mismo día, mismo equipo.

Imipenem

Los datos del área bajo la curva y porcentaje de recuperación de imipenem, junto con las estadísticas derivadas de estos valores, que permitieron calcular la precisión de la técnica se presentan en la **Tabla 8-10**. Los datos de precisión intermedia evaluados al aplicar la técnica por dos analistas, en diferentes días y con el mismo equipo, se presentan en la **Tabla 8-11** y los correspondientes a precisión intermedia determinados con dos analistas aplicando la técnica el mismo día en el mismo equipo se presentan en la **Tabla 8-12**.

Tabla 8-10. Áreas y porcentajes de recuperación del imipenem para las diferentes inyecciones.

N° de inyección	Área	% Recuperado
1	66,1	96,69
2	67	98,05
3	66,8	97,75
4	67,9	99,42
5	67,6	98,96
6	67	98,05
7	68	99,57
8	66,5	97,29
9	67,8	99,27
10	68,9	100,94
Promedio	67,36	98,60
Desviación	0,83	1,20
RSD		1,22

Tabla 8-11. Áreas y porcentajes de recuperación del imipenem para las diferentes inyecciones.

N° de inyección	Área	% Recuperado
Operario 1		
1	48,65	97,30
2	48,72	97,45
3	49,56	99,12
4	49,71	99,42
5	49,63	99,27
6	50,47	100,94
7	48,95	97,90
8	49,71	99,42
9	49,10	98,21
10	49,94	99,88
Operario 2		
11	48,87	97,75
12	49,79	99,57
13	49,71	99,42
14	49,63	99,27
15	49,79	99,57
16	49,25	98,51
17	49,18	98,36
18	50,24	100,48
18	49,79	99,57
20	49,71	99,42
Promedio	49,52	99,04
Desviación	0,49	0,97
RSD		0,98

2 analistas, diferentes días, mismo equipo.

Tabla 8-12. Áreas y porcentajes de recuperación para las diferentes inyecciones para Imipenem.

N° de inyección	Área	% Recuperado
Operario 1		
1	48,34	96,69
2	49,03	98,05
3	48,87	97,75
4	49,71	99,42
5	49,48	98,96
6	49,03	98,05
7	49,79	99,57
8	48,65	97,29
9	49,63	99,27
10	50,47	100,94
Operario 2		
11	48,12	96,23
12	49,79	99,57
13	48,80	97,60
14	49,41	98,81
15	50,24	100,48
16	48,42	96,84
17	49,48	98,96
18	49,71	99,42
19	49,63	99,27
20	49,25	98,51
Promedio	49,29	98,59
Desviación	0,63	1,25
RSD		1,27

2 analistas, mismo día, mismo equipo.

8E Exactitud

Ceftazidima

En la **Tabla 8-13** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a cada una de las 3 concentraciones ensayadas y en la **Tabla 8-14** se presenta el porcentaje de recuperación correspondiente a cada área de la **Tabla 8-13**.

Tabla 8-13. Áreas bajo la curva de para concentraciones seleccionadas de ceftazidima.

Concentración ppm	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área	Promedio	Desviación
40	67,5	67,3	67,1	67,3	0,2
50	79,8	79,5	80	79,77	0,25
60	95,8	96,3	95,6	95,9	0,36

Concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % de solución estándar siendo 50 ppm el 100.

Tabla 8-14. Comparación entre el porcentaje de ceftazidima y el detectado por HPLC.

% Teórico	% Detectado			% Recuperado		
	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área
80	79,60	79,32	79,04	99,50	66,10	65,86
100	97,01	96,59	97,30	97,01	80,49	81,08
120	119,66	120,37	119,38	99,72	100,31	99,48

Imipenem

En la **Tabla 8-15** se presentan las áreas bajo la curva obtenidas a cada una de las 3 concentraciones ensayadas y en la **Tabla 8-16** se presenta el porcentaje de recuperación correspondiente a cada área de la **Tabla 8-15**.

Tabla 8-15. Áreas bajo la curva de para concentraciones seleccionadas de Imipenem.

Concentración ppm	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área	Promedio	Desviación
40	54,9	54,9	55	54,93	0,058
50	67,1	67,3	67	67,13	0,15
60	80,9	81,3	80,8	81	0,26

Concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % de solución estándar siendo 50 ppm el 100.

Tabla 8-16. Comparación entre el porcentaje de ceftazidima y el detectado por HPLC.

% Teórico	% Detectado			% Recuperado		
	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área	Voluntario 1 Área	Voluntario 2 Área	Voluntario 3 Área
80	79,68	79,68	79,83	79,68	79,68	79,83
100	98,21	98,51	98,05	98,21	98,51	98,05
120	119,16	119,77	119,01	119,16	119,77	119,01