

Trabajo Científico

Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de la concentración sérica de iohexol, un marcador de filtración glomerular

Development and validation of an analytical method for the determination of serum concentration of iohexol, a marker of glomerular filtration

Olivid M Huerta S,¹ Lourdes González F,¹ Alejandro Treviño B,² Clemente C Meza C,²
Gilberto Castañeda Hernández¹

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

²Hospital Juárez de México

Resumen

Desarrollamos un método analítico por CLAR, simple, rápido y confiable para la cuantificación de iohexol en suero humano. La extracción del iohexol se llevó a cabo por precipitación de proteínas con ácido perclórico (5% v/v en agua) y se usó sulfapiridina como estándar interno (EI). La mezcla fue separada en una columna C18 (Nova pack 4µm, 3.9X150 mm) a 40°C utilizando como fase móvil una mezcla de metanol:agua (6:94 v/v) a un flujo de 2 mL/min, con detección UV a 254 nm. El tiempo de retención fue 1.9 minutos para el iohexol y de 5.2 minutos para el EI. El recobro de iohexol fue de 99.0-104.2% y la curva de calibración fue lineal ($r = .999$) en un intervalo de concentraciones de 10 a 1000 µg/mL ($n=6$).

Abstract

A simple, fast and reliable analytical method for the quantification of iohexol in human serum by HPLC was developed. Iohexol extraction was done by protein precipitation with perchloric acid (5%, v/v in water). Sulfapyridine was used as internal standard (IS). The mixture was separated using a C18 column (Nova Pack, 4µm, 3.9X150 mm) at 40°C eluted with a mobile phase of methanol:water (6:94 v/v) at a flow rate of 2 mL/min. UV detection was carried out at 254 nm. Retention times were 1.9 minutes for iohexol and 5.2 minutes for the IS. Extraction recovery of iohexol in serum was 99.0-104.2% and the calibration curve was linear ($r = 0.999$) in a concentration range from 10 to 1000 µg /mL ($n=6$).

Palabras clave: filtración glomerular; Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución; depuración de iohexol

Key words: glomerular filtration; Liquid Chromatography High Resolution; iohexol clearance

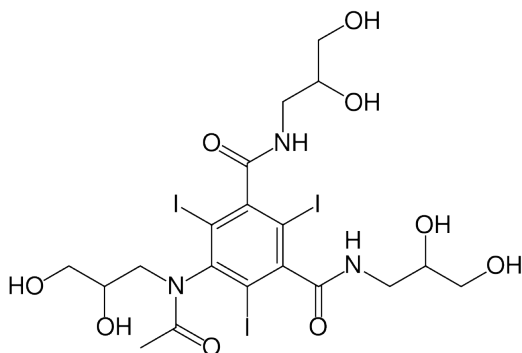
Correspondencia:

Olivid Marisol Huerta Sánchez
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508,
Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero,
CP. 07360 México, D.F.
Tel. y Fax: 57 47 38 00, Ext. 5415
e-mail: siete_huert@hotmail.com

Fecha de recepción: 30 de agosto de 2011
Fecha recepción modificaciones: 15 de diciembre de 2011
Fecha de aceptación: 17 de enero de 2012

Introducción

El Iohexol (Figura 1) es un medio de contraste radiológico no iónico¹ monomérico, triyodado y soluble en agua.^{2,3} Su nombre comercial es Omnipaque® y tiene un peso molecular de 821 Da. El iohexol no se une a proteínas plasmáticas y es 100% filtrado a través de los glomérulos, y no se presentan procesos de secreción ni reabsorción tubular.^{1,4} Sus características fisicoquímicas permiten que pueda ser usado para determinar la filtración glomerular (FG) y por lo tanto, como marcador exógeno de la función renal.⁵



1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxiopropil)-5-[N-(2,3-dihidroxiopropil)acetamido]-2,4,6-triiodobenceno-1,3-dicarboxamida

Figura 1. Estructura química del iohexol

La filtración glomerular se mide tradicionalmente como la depuración renal de una sustancia en particular o marcador desde el plasma. Por lo tanto, podemos definir a la filtración glomerular como el volumen de plasma que se puede limpiar completamente del indicador en una unidad de tiempo.⁶

La determinación de la filtración glomerular juega un papel importante en la práctica clínica nefrológica. Es crucial para diagnosticar enfermedades crónicas renales o evaluar el riesgo de desarrollarlas, para seguir la evolución de las mismas y para determinar el inicio de diálisis crónica. El primer paso para determinar la filtración glomerular es la selección de un marcador que cumpla con diversas características que permita de forma confiable la evaluación del funcionamiento renal. Muchos de los marcadores usados en la actualidad en la práctica clínica diaria son endógenos, por lo que están sujetos a procesos fisiológicos o bien son dependientes de las características propias de cada individuo, por lo que la estimación de la filtración glomerular puede resultar poco precisa.

El uso de iohexol para la determinación del índice de filtración glomerular ha tenido una creciente aceptación como alternativa al uso marcadores radiactivos, como el ⁵¹Cr-EDTA, ^{99m}Tc-DPTA o ¹²⁵I-iothalamato.⁷ Además, la depuración de

iohexol es considerada tan exacta y guarda una estrecha relación con la depuración de inulina, que hasta la actualidad sigue siendo el “estándar de oro” para la medición de la filtración glomerular.⁸ Por lo tanto, la determinación del índice de filtración glomerular con la depuración de iohexol puede ser ampliamente utilizado en la práctica clínica. Sin embargo, los métodos para la determinación de este compuesto resultan ser muy laboriosos y costosos⁹ o bien no se encuentran disponibles, por lo que surge la necesidad de desarrollar otro método para su cuantificación.

Por lo anterior, en nuestro laboratorio desarrollamos un método analítico que permitiera la cuantificación de un marcador de filtración glomerular (iohexol) de forma confiable. El método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución desarrollado demostró ser confiable a través de la validación siguiendo los parámetros de recuperación absoluta, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, selectividad, límite de cuantificación y límite de detección indicados en la NOM-177-SSA-1-1998.¹⁰

Aplicando el método se obtuvieron los perfiles intravenosos provenientes de seis pacientes diagnosticados con daño renal y administrados con Omnipaque®, a partir de los cuales se determinó la depuración de iohexol y se obtuvo la filtración glomerular de cada uno de ellos. De esta forma se puede considerar al método para su aplicación en la práctica clínica diaria.

Material y método

Químicos y reactivos

El iohexol (99.9%) y el estándar interno (sulfapiridina, 99.9%) fueron provistos por Sigma-Aldrich de México, el metanol por J.T. Baker, y el ácido perclórico por Reactivos de química Meyer. Agua calidad HPLC obtenida a través del Milli-Q Regent Water System y filtrada a través de membrana de nylon (47 mm, tamaño de poro .45 µm, Sigma-Aldrich, EUA).

Desarrollo del método

Para la determinación de iohexol en suero humano se usó como método analítico la cromatografía de líquidos de alta resolución, acoplado a UV, utilizando el equipo de HPLC de la marca Hitachi EliteChrome, con un detector UV modelo L-2400, con un inyector manual de 200 µL de loop, una bomba primaria, una columna, y un detector ultravioleta de longitud de onda variable y fijada a 254 nm ya que esta resultó ser la longitud de onda de máxima absorción para el iohexol tras un barrido a lo largo del espectro en la región UV.

Para iniciar el desarrollo del método, se decidió hacer uso de una columna C18, la cual es la columna de primera elección

cuando se realiza cromatografía de fase inversa, así mismo se probaron distintas proporciones de acetonitrilo - agua, metanol - agua y acetonitrilo-isopropanol-agua como fases móviles, ya que estos disolventes son los de uso común en este tipo de cromatografía.

Por otro lado, se optó por desarrollar el método para la cuantificación por adición de un estándar interno, con lo cual se realizó una búsqueda de moléculas con propiedades fisicoquímicas y cromatográficas similares a las del iohexol, haciendo inyecciones de estas moléculas disueltas en agua de forma similar al fármaco en estudio, para determinar si eran viables a ser utilizadas como estándar interno en la cuantificación. Se encontró que todas aquellas moléculas con propiedades similares a las del analito de interés (como el ácido p-aminohipúrico) presentaban una señal cromatográfica muy cercana o parecida al iohexol, por lo que se inició la búsqueda del estándar interno con propiedades más hidrofóbicas para tratar de alargar el tiempo de retención del mismo, hallando que la sulfapiridina mostraba una buena separación del iohexol.

En primer lugar se utilizaron las columnas, Symetry C18 y μ Bondapak C18 para la determinación de iohexol y diferentes fases móviles probadas en cada una de ellas.

Se encontró que la señal cromatográfica del iohexol en las columnas Symetry C18 y μ Bondapak C18 se presentaba muy cercana a la del frente de solvente, aún cambiando las proporciones de los componentes acuoso y orgánico de la fase móvil.

Aunque se logró una pequeña separación del frente de solvente con el iohexol haciendo uso de una fase móvil constituida por acetonitrilo:agua (9:91) y con la columna Symetry C18 no existió una adecuada resolución. Se siguieron probando otras fases móviles aumentando la cantidad de la parte acuosa, pero con todas ellas no se produjo una buena separación. Lo mismo ocurrió con la columna μ Bondapak.

Se probaron fases constituidas por acetonitrilo: isopropanol: agua, con el fin de aumentar la viscosidad de la fase móvil y así retardar la salida del iohexol. Sin embargo, esto provocó la deformación de la señal cromatográfica del analito de interés. Esta deformación se vio reflejada con la aparición de dos señales cromatográficas por parte del iohexol, lo que indicaba la separación de la mezcla recémica de este compuesto, por lo que decidimos probar otro tipo de disolvente para la preparación de la fase móvil y que no provocara dicha separación ya que se pretendía cuantificar a ambos isómeros puesto que la presentación comercial que es administrada contiene ambas moléculas.

Posteriormente, se prepararon fases móviles constituidas por metanol:agua, observando señales cromatográficas deformes de iohexol tanto en las columnas Symmetry como en la μ Bondapak, esto ocasionó que surgiera la idea de hacer uso de otro tipo de columna, en este caso la C18 Nova-Pak de Waters, encontrando una muy buena separación del iohexol con el frente de solvente y la sulfapiridina (EI) a una proporción metanol:agua 5:95. Sin embargo, los tiempos de retención eran muy grandes (15 minutos) con un flujo de 1.2 mL/min como se había trabajado con anterioridad, por lo que se decidió sólo aumentar el flujo a 2 mL/min. Aún bajo estas condiciones, los tiempos de retención tanto para iohexol como para la sulfapiridina resultaron muy largos, por lo que la proporción de la fase móvil tuvo que cambiarse a metanol:agua 6:94, logrando de esta forma las condiciones cromatográficas idóneas para la determinación del iohexol en suero humano.

Condiciones cromatográficas

La separación del iohexol y el estándar interno se llevó a cabo a través de un columna C18 (Nova pack, 4 μ m, 3.9X150 mm), utilizando como fase móvil una mezcla de metanol:agua (6:94 v/v), a un flujo de 2 mL/min. La fase móvil fue filtrada y desgasificada pasando a través de filtros nylon de 0.45 μ m (Millipore BedFord MA) en vacío. Las alturas de los picos se integraron mediante el sistema de operación WinNonlin 6.2[®] de Pharshigt[®].

Soluciones de calibración y control

Las soluciones de referencia de iohexol (100, 1000 y 10 000 μ g/mL) y el estándar interno (1 mg/mL) fueron preparados en agua. Un total de seis concentraciones de iohexol 10, 15, 50, 100, 500 y 1000 μ g/mL en suero libre de fármaco se utilizaron para la calibración. Tres niveles de concentración de iohexol como puntos control, 25 μ g/mL (bajo), 75 μ g/mL (medio) y 750 μ g/mL (alto) comprendidos dentro del intervalo de la curva de calibración fueron preparados también en suero para llevar a cabo la validación del método. El intervalo de concentraciones empleadas para la calibración se obtuvieron a partir de los datos obtenidos tras evaluar las muestras piloto de la farmacocinética tanto de voluntarios sanos como de pacientes diagnosticados con daño renal.

Para el análisis de las soluciones se utilizaron tubos cónicos de 1.5 mL de capacidad a los cuales se les adicionaron 100 μ L de suero (matriz biológica), 100 μ L de sulfapiridina como estándar Interno y el volumen correspondiente de las soluciones de referencia de iohexol para obtener las concentraciones que conformaron la curva y para los tres niveles de concentración necesarios para la validación, se agregó el volumen necesario de ácido perclórico, para la extracción del iohexol, del EI y la precipitación de proteínas, (tal como lo describe Rohit S. Soman en 2005²), en un volumen final de 1 mL.

Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se mezclaron 100 μL de suero, 100 μL de la solución de referencia del EI y se adicionan 800 μL de ácido perclórico al 5%. Las soluciones que conforman la curva de calibración, los puntos control y las muestras fueron sometidas a agitación por 100 segundos en un vortex, posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 12 000 rpm. Se tomaron 100 μL del sobrenadante y fueron inyectados al equipo cromatográfico previamente preparado con las condiciones descritas.

Ensayo de validación

La validación del método cromatográfico se realizó conforme a ciertos parámetros establecidos en la NOM-177SSA1-1998 bajo sus criterios de aceptación.

Para evaluar la selectividad del método se evaluó por triplicado y en forma individual la fase móvil, el ácido perclórico, el suero, el Iohexol junto con el suero y el suero con el E.I.

Se utilizó el suero libre de fármaco proveniente de seis fuentes independientes aplicando el método analítico previamente descrito. Se verificó que no hubiera interferencia alguna en los tiempos de retención de los analitos de interés y los productos endógenos de la matriz biológica. Así mismo, a la matriz biológica además de adicionar el iohexol y el EI otros fármacos que comúnmente son administrados a los pacientes con daño renal (tacrolimus y ácido micofenólico), fueron evaluados a fin de determinar si existía alguna interferencia en las señales cromatográficas.

La linealidad del método se evaluó mediante la construcción de la curva de calibración por sextuplicado y a partir de pesadas independientes. Se analizaron por triplicado las concentraciones baja, media y alta de iohexol en el suero para determinar el recobro. Se compararon estos resultados con las respuestas de las soluciones del fármaco en las mismas concentraciones y en el mismo disolvente (agua).¹⁰

Para determinar el límite de cuantificación se analizó por quintuplicado la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ que es la más baja en el intervalo de trabajo.¹⁰

El límite de detección se realizó mediante el análisis por triplicado de cuatro concentraciones menores a la concentración que fue determinada como límite de cuantificación (10 $\mu\text{g/mL}$).¹⁰ Estas concentraciones fueron obtenidas por dilución. La precisión del método se efectuó mediante la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad, en las cuales se determinó el coeficiente de variación de los puntos bajo, medio y alto expresado como coeficiente de variación. Por su parte, la repetibilidad se evaluó tras el análisis por quintuplicado de los tres niveles de la concentración control en el suero en un mismo

día. Por otro lado, la repetibilidad se efectuó con el estudio de las muestras en los tres niveles de concentración por triplicado durante tres días.¹⁰

De los datos obtenidos en repetibilidad y reproducibilidad se determinó la exactitud, en la que se evaluó el porcentaje de variación del valor nominal de los puntos bajo, medio y alto. Las muestras de suero preparadas a los tres niveles de concentración 25, 75 y 750 $\mu\text{g/mL}$ (baja, media y alta) fueron almacenadas a -20°C y procesadas para su análisis a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas para evaluar la estabilidad de las muestras.

Muestras de pacientes

Las muestras a analizar (suero) fueron obtenidas de pacientes diagnosticados con daño renal a los cuales se les administró 5 mL de Ominipaque® en una presentación de 350 mg de yodo por mililitro^{11,12} y que se encontraban hospitalizados en el Hospital Juárez de la Ciudad de México.

Resultados

Un cromatograma típico de suero libre de iohexol se muestra en la Figura 2 (A), la fase móvil y ningún compuesto sérico mostraron interferencia al inyectarse bajo las condiciones del método desarrollado. Así mismo no se encontraron señales cromatográficas tras inyectar tacrolimus y ácido micofenólico. Los tiempos de retención entre el Iohexol y el EI mostraron una resolución mayor a 1.5, obteniendo para el iohexol un tiempo de retención de 1.9 min, y de 5.2 min para el EI (Figura 2) (B).

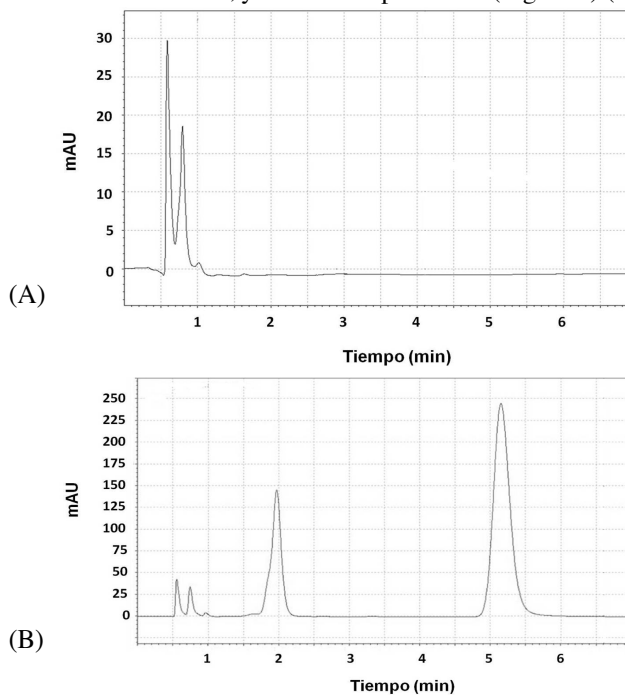


Figura 2. (A) Cromatograma de suero libre (blanco) de iohexol. (B) Cromatograma distintivo de iohexol (100 $\mu\text{g/mL}$) y Sulfapiridina (100 $\mu\text{g/mL}$)

Para la linealidad se evaluó la respuesta producida en el cromatógrafo con el método desarrollado. La respuesta en este caso fue la relación de alturas entre la señal del pico del iohexol a diferentes concentraciones del fármaco en suero y la altura de la señal del pico del EI a una concentración constante. El método fue lineal en intervalo de evaluación de 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de determinación (r) de 0.999 ($n=6$), tras realizar una regresión lineal simple. Se encontró que la ecuación que mejor describe tal relación lineal fue $y = 0.0065x + 0.0112$. (Figura 3).

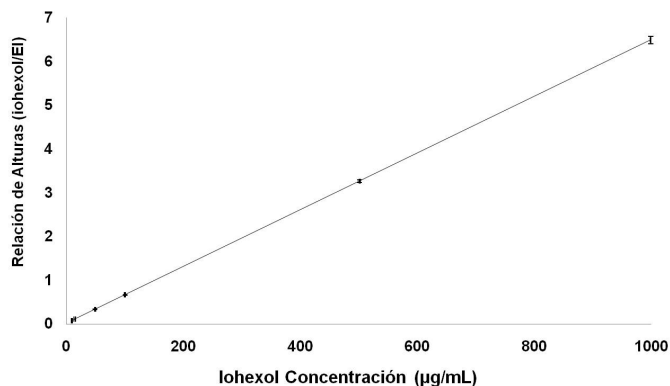


Figura 3. Linealidad del método

El recobro de los niveles de concentración analizados mostraron porcentajes de razones entre 99.0 a 104.2% en los tres niveles de concentración.

Realizadas las diluciones de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo como límite de detección una concentración de 1.6 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluó el límite de cuantificación y se obtuvo un C.V en porcentaje evaluando la exactitud del punto (Tabla 1).

Tabla 1. Límite de cuantificación del método.

Concentración Teórica	Concentración Experimental (media \pm SD., $\mu\text{g/mL}$)	(CV %)	Exactitud (%)
10	10 \pm 1.095	11.15	98.21

Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un coeficiente de variación no mayor del

20%¹⁰. Por lo tanto, el límite de 10 $\mu\text{g/mL}$ se considera como un adecuado límite de cuantificación del método ya que se obtuvo un C.V. < al 20%.

Para la precisión, se evaluaron la repetibilidad y la reproducibilidad, en las cuales se determinó el coeficiente de variación y exactitud expresado en porcentaje de los puntos bajo, medio y alto mostrados (Tabla 2). El criterio de aceptación para la repetibilidad y la reproducibilidad con un C.V < 15% y para la exactitud el valor para los tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) debe estar dentro de $\pm 15\%$ del valor nominal para cada punto.

Tabla 2. Precisión y exactitud del método

Concentración Teórica	Intradía			Interdía		
	Concentración Experimental (media \pm SD., $\mu\text{g/mL}$)	(CV %)	Exactitud (%)	Concentración Experimental (media \pm SD., $\mu\text{g/mL}$)	(CV %)	Exactitud (%)
25	25 \pm 1.33	4.76	103.61	25 \pm 0.58	2.24	104.24
75	75 \pm 1.23	1.65	99.03	75 \pm 1.16	1.50	103.22
750	750 \pm 26.90	3.50	102.43	750 \pm 9.43	1.24	100.90

En los datos obtenidos de las muestras de suero durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas a una temperatura de -20°C , con las concentraciones baja, media y alta de los puntos control, se obtuvo una cantidad de iohexol dentro del $\pm 15\%$ de la concentración establecida durante estos días de almacenamiento, por lo que el análisis de las muestras es confiable después de este tiempo y bajo estas condiciones.

Una vez validado el método se analizaron las muestras de los pacientes diagnosticados con daño renal, donadas por el área de investigación del Hospital Juárez de México.

Para cada paciente se obtuvo todo el perfil farmacocinético del iohexol, conformado por diez puntos de muestreo durante seis horas. A continuación se muestra un Cromatograma obtenido tras el análisis de una muestra del perfil farmacocinético de un paciente.

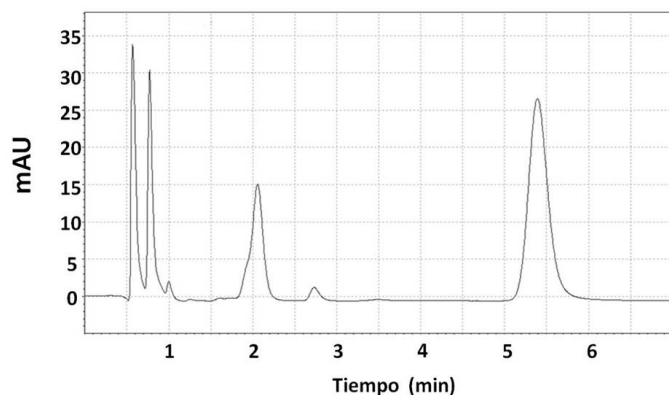


Figura 4. Cromatograma distintivo de un punto del perfil farmacocinético de un paciente.

Como se observa en el Cromatograma anterior existe una buena definición de la respuesta cromatográfica tanto del iohexol como del EI, no encontrándose interferencias con algún otro componente de la matriz biológica.

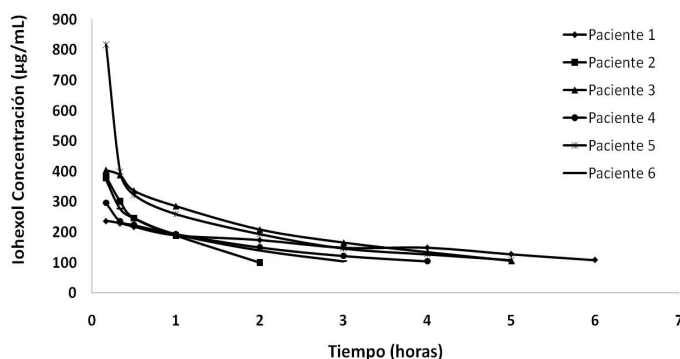


Figura 5. Concentraciones de iohexol vs. tiempo de seis pacientes con daño renal.

La Figura 5 representa la concentración de iohexol en suero en los pacientes a lo largo del tiempo. Los valores de aclaramiento de iohexol estimados fueron de 38.6, 113.6, 42.1, 51.7, 35.9 y 72.4 mL/min por 1.73 m² para los pacientes del 1-6 respectivamente. Un total de 120 muestras de suero fueron analizadas mediante el método descrito. La precisión de las soluciones de control de calidad en el día de análisis de cada muestra fueron menos del 10%.

La concentración máxima (C_{max}) medida a los 10 min después de la administración de la dosis fue de 418.2 ± 205.0 µg/mL en un intervalo de 296.8 a 816.8 µg/mL. La mínima concentración medida (C_{min}) después de la administración fue de 105.5 ± 3.2 µg/mL (intervalo de: 100.1 a 108.8 µg/mL).

Discusión

La valoración de la filtración glomerular es de utilidad para identificar la presencia de enfermedades renales crónicas (ERC), monitorizar su progresión, prevenir complicaciones, evitar fármacos nefrotóxicos y realizar ajustes de dosis de fármacos de eliminación renal.^{13,14} La filtración glomerular varía en relación a la edad, el género y la masa corporal situándose alrededor de 120 mL/min/1.73 m² en individuos adultos jóvenes sanos. Los valores de FG inferiores a 60 mL/min/1.73 m² se asocian a un aumento de la prevalencia de las complicaciones de la ERC y del riesgo cardiovascular asociado.¹⁵

Distintas sustancias, exógenas y endógenas, se han utilizado para conocer la FG a partir de su depuración renal o plasmático. Sin embargo están sujetas a diversas limitaciones, como: la variabilidad biológica, múltiples interferencias analíticas e importantes problemas de estandarización entre otros.⁷

El creciente interés y relevancia de este tema al no existir curación definitiva para la mayor parte de sujetos con ERC, y estando el trasplante renal limitado por la disponibilidad de órganos, la mejor estrategia en el momento actual es concentrar esfuerzos en la prevención de la progresión de esta enfermedad mediante el desarrollo de métodos que permitan la medición de la filtración glomerular por medio de marcadores que ofrezcan una confiable valoración de ésta.

La demanda de métodos fiables y fáciles de realizar para la determinación de la filtración glomerular se ha incrementado considerablemente, por ello la determinación de la depuración del iohexol con este método puede ser ampliamente aceptado para su estimación. Un método rápido, preciso y específico para la determinación de la FG es necesario para asegurar el éxito de la investigación, ya que los métodos que hasta hace poco existían son muy laboriosos o bien no están actualmente disponibles para la estimación de iohexol en fluidos biológicos.

Así que en este trabajo se realizaron pruebas para determinar el aclaramiento de iohexol y por lo tanto de la filtración glomerular, de tal forma que se pueda determinar este fármaco de una forma rápida y simple ya que indudablemente es una característica primordial para su establecimiento en la rutina clínica diaria.

El método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación de iohexol establecido mostró un excelente rendimiento analítico en lo que se refiere a la precisión, a la exactitud, a la recuperación de la extracción (que se logró mediante la precipitación de proteínas con el ácido perclórico, lográndose una recuperación mayor al 95%), la sensibilidad y la

especificidad. Este método ofrece una gran ventaja sobre los métodos analíticos reportados previamente en donde los tiempos de análisis necesarios fueron de más de 10 minutos^{2,9} mientras que el tiempo de corrida de las muestras en este método logró ser reducido a menos de 6 minutos, lo que permite un tiempo más rápido de análisis y alto rendimiento. Además, este método requiere un mínimo volumen de muestra (100 µL), mientras que los métodos establecidos anteriormente a menudo requerían más cantidad.⁹ El límite inferior del método de cuantificación fue de 1.6 µg/mL que es 10 veces más sensible que otros métodos por HPLC reportados. Así mismo, el método permite una simple preparación de la muestra clínica ya que toma pocos minutos realizarla. Este método ofrece una elevada especificidad ya que no existieron sustancias interferentes endógenas o exógenas en las muestras de los pacientes quedando exento de causar un error significativo en el resultado final.

Además, el método se realiza de una forma sencilla lo que permite que sea fácil para un operador aprender la técnica de una forma rápida y así generar resultados reproducibles. El método resultó ser muy económico puesto que se necesitaron pequeñas cantidades de disolvente orgánico para la preparación de la fase móvil. Por otro lado, una sola columna de análisis bajo las condiciones cromatográficas establecidas presentó un alto número de platos teóricos que se evaluaban cada semana, lo que indica que el tiempo de vida de la columna se prolongó durante todo el período de validación del método y estudio clínico.

Al aplicar el método cromatográfico establecido se pudo evaluar el estadio de la enfermedad crónica renal establecido por la National Kidney Foundation¹⁶ de cada uno de los pacientes. Encontrándose que el paciente dos presentaba un estadio de tipo 1, el paciente seis un estadio de tipo 2 y el resto se encontraba en un estadio de tipo 3, lo cual correlacionaba directamente con lo diagnosticado previamente.

Conclusiones

El método desarrollado y validado para la cuantificación de iohexol en suero de humano presentó las ventajas de ser sencillo, económico y permite analizar un mayor número de muestras en un periodo de tiempo corto con respecto a otros métodos reportados en la bibliografía. Este método es capaz de cuantificar el iohexol con precisión y exactitud en muestras séricas de humano de 100 µL. Este método demostró su aplicabilidad en la clínica ya que cuantifica de forma confiable a un buen marcador de funcionamiento renal.

Agradecimientos

Al hospital Juárez de México por las muestras otorgadas para el estudio. Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 225139 otorgada a la M. en C. Olivid Marisol Huerta para realizar estudios de Maestría, en el departamento de Farmacología.

Referencias

1. Olsson B, Aulie A, Sveen K, Andrew E. Human pharmacokinetics of iohexol. A new nonionic contrast medium. *Invest Radiol.* 1983; 18(2):177-182.
2. Soman RS, Zahir H, Akhlaghi F. Development and validation of an HPLC-UV method for determination of iohexol in human plasma. *J Chromatogr B.* 2005; 816(1-2):339-343.
3. Chemists, Building community for. ChemSpider. 2009. <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=e59761c5-e5c9-42f9-b73f-fb5ad6556d6e>. Acceso 20 Ene 2009.
4. Edelson J, Shaw D, Palace G. Pharmacokinetics of iohexol, a new nonionic radiocontrast agent, in humans. *J Pharm Sci.* 1984; 73(7):993-995.
5. Nilsson-Ehle, eJIFCC 13. 2009. <http://www.ifcc.org/eiifcc/vol13no2/131200105.htm>. Acceso 20 Feb 2009.
6. Moteo RF, Andrade SJ. Hemodinámica Glomerular, Filtración Glomerular y Flujo Plasmático Renal. 1ª Ed. Distrito Federal: Prado; 2000, p.200.
7. Perrone RD, Stenman TI, Beck GJ, Skibinski CI, Royal HD, Lawlor M, Hunsicker LG. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: Simultaneous comparison of 125 I-iothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTcDTPA, and Inulina. *Am J Kidney Dis.* 1990; 16(3):224-235.
8. Schwartz GJ., Furth S, Cole SR, Warady B, Muñoz A. Glomerular filtration rate via plasma iohexol disappearance: Pilot study for chronic Kidney disease in children. *Kidney Int.* 2006; 69(11):2070-2077.
9. Farthing D, Sica DA, Fakhry I, Larus T, Ghosh S, Farthing C, Vranian M, Gehr T. Simple HPLC-UV Method for Determination of Iohexol, Iothalamate, p-Aminohippuric Acid and n-Acetyl-p-Aminohippuric Acid in Human Plasma and Urine with ERPF, GFR, and ERPF/GFR Ratio Determination Using Colorimetric Analysis. *J Chromatogr B.* 2005; 826(1-2):267-272.
10. NOM-177SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que se deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

11. Arvidsson A, Hedman A y Scand J. Plasma and renal clearance of iohexol—a study on the reproducibility of a method for the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990; 50(7):757-761.
12. Lundqvist S, Hietala SO, Groth S, Sjödin JG. Evaluation of single sample clearance calculations in 902 patients: A comparison of multiple and single sample techniques. *Acta Radiol.* 1997; 38(1):68-72.
13. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004; 351(13):1296-1305.
14. Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Clin Proc.* 2005; 80(10):1270-1277.
15. Deen WM, Maddox DA, Robertson CR, Brenner BM. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. VII. Response to reduced renal mass. *Am J of Physiol.* 1974; 227(3):556-562.
16. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease. *Am J Kidney.* 2002; 39:266.