

Nº 16  
251.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
PARA ESPIRONOLACTONA Y FUROSEMIDA,  
EN CAPSULAS DE GELATINA DURA POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE  
ALTA RESOLUCION".**



ESPIONOLACTONA  
FUROSEMIDA

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**CARIDAD BOLAROS RAMIREZ**

MEXICO, D. F.

1992

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**CONTENIDO:**

	<b>PAG.</b>
<b>INTRODUCCION.</b>	<b>1</b>
<b>GENERALIDADES.</b>	
<b>A. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.</b>	<b>3</b>
<b>B. METODOS CROMATOGRAFICOS.</b>	<b>6</b>
<b>C. CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA. DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.</b>	<b>29</b>
<b>D. MONOGRAFIAS.</b>	<b>35</b>
<b>E. DESARROLLO.</b>	<b>41</b>
<b>VALIDACION DEL METODO.</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>76</b>

## INTRODUCCION

Por validación de un método analítico se debe de entender como el proceso mediante el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El objetivo del presente trabajo radica en la validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, para ser utilizado como indicador de control de calidad, en dos principios activos, Espironolactona y Furosemda, en cápsulas de gelatina dura.

Se determinaron ciertos parámetros analíticos considerando como los más importantes: Especificidad, Linearidad, Precisión, Exactitud.

La validación de los procesos surge como un requisito de la Ley General de Salud y de las Buenas Prácticas de Manufactura, vigentes para productos farmacéuticos y equipos médicos y por consiguiente se aplica también a la fabricación de medicamentos, productos biológicos, y equipos médicos.

Dentro de un programa de validación de procesos es indispensable tener validado el método analítico antes de iniciarlo ya que de no ser así, no podemos indicar el nivel de eficiencia de ciertas operaciones (mezclado, agitación, etc.).

A continuación se presentan una serie de definiciones que van de acuerdo con la validación de procesos.

**Validación:** Método científico que a través de documentación permite la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación efectuada en equipos o en procesos y que estas se encuentran bajo control.

**Validación Retrospectiva:** Evidencia documentada, basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de un producto ya en distribución y que está siendo fabricado con efectividad.

**Validación Prospectiva:** Evidencia documentada realizada antes que el producto salga al mercado que demuestra que las operaciones se encuentran bajo control (es aplicable a nuevos productos, reformulaciones o cambios de equipos de proceso).

**Exactitud:** Mediante esta se permite conocer la confiabilidad y efectividad de una medición realizada de acuerdo a una metodología específica.

Por otro lado el progreso de la tecnología ha provocado la invención de instrumentos y aparatos cada día más eficientes y precisos y de ahí que la validación de métodos analíticos sea importante para asegurar también que el instrumento utilizado sea consistente con la metodología empleada.

## GENERALIDADES

### A. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método diseñado satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad del método se expresa en términos de parámetros analíticos. Los parámetros analíticos que deben ser considerados en la validación de técnicas analíticas son los siguientes:

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Especificidad
- Rango
- Tolerancia

Las opiniones respecto a esto pueden diferir con respecto a la terminología y al uso.

**Linealidad:** La linealidad de un sistema o un método analítico, es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales puede ser obtenidos directamente o por medio de una

transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

**Precisión:** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto, usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

**a) Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

**b) Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

**Límite de Detección:** Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Límite de Cuantificación:** Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación

establecidas.

**Especificidad:** Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

**Rango:** El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

**Tolerancia:** La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos en el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque, condiciones ambientales, estabilidad de la muestra analítica, etc.

Generalmente, dependiendo de las características del producto farmacéutico y de las necesidades que se requiera que cumpla el producto, serán los parámetros que se realicen para la validación del método analítico.

Finalmente es importante mencionar que la documentación de cada estudio es un requerimiento básico para demostrar que la metodología que se está utilizando esta validada y que el método es el adecuado para las aplicaciones requeridas del producto.



## B. METODOS CROMATOGRAFICOS.

El análisis de agentes terapéuticos ofrece problemas que exigen utilizar mejores técnicas analíticas. Este problema se hace más patente en formulaciones en las cuales los componentes activos se encuentran en concentraciones muy bajas y los componentes activos presentes pueden causar interferencias que afecten el análisis.

La mayoría de las técnicas de cuantificación no son lo suficientemente selectivas para determinar cada uno de los componentes de una mezcla y en muchos casos es necesario separar previamente el compuesto deseado; una buena separación reduce selectivamente problemas analíticos y permite el uso de las máximas sensibilidades de los instrumentos de medición con un mínimo riesgo de interferencia.

Las técnicas cromatográficas son el recurso analítico más importante con el que se cuenta para la separación, identificación y cuantificación de una amplia variedad de sustancias.

Todas las formas de cromatografía pueden definirse como un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados a través de una fase móvil y son retenidos selectivamente por la fase estacionaria.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido; cuando es un líquido se conoce con el nombre de cromatografía de partición y si es un sólido el proceso se llama cromatografía de adsorción.

De acuerdo al tipo de fase móvil: gas o líquido, la cromatografía se denomina cromatografía de gases o cromatografía de líquidos respectivamente.

#### Desarrollo Histórico.

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezcla de gases y vapores. Al año siguiente, el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de columna en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales.

En una columna de vidrio, rellena de carbonato de calcio, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo, a continuación agregó más éter de petróleo y observó que, a medida que el éter de petróleo pasaba a través de la columna, se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantofilas. De ahí el origen de la palabra cromatografía que, literalmente, significa "color escrito", hoy este método se llama cromatografía líquido-sólido.

La cromatografía permaneció ignorada durante muchos años hasta que, en 1930, el investigador Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución, que son el análisis frontal y el análisis por desplazamiento; técnicas que hoy en día han caído en desuso.

En 1941, Martin y Synge, en busca de una solución al problema de determinar cantidades muy pequeñas de aminoácidos, introdujeron la cromatografía de reparto, lo que les valió el Premio Nobel de Química en 1952. Esta técnica evolucionó con rapidez, llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel y una versión limitada de cromatografía líquido-líquido en columna.

En 1952, Martin y James introdujeron la cromatografía de gases, la cual se ha convertido en una de las técnicas analíticas más útiles para el análisis de compuestos orgánicos volátiles.

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica que por tantos años había permanecido olvidada; este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

#### **Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.**

La separación de los componentes de una mezcla mediante la aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, depende de la combinación correcta de las condiciones de operación es decir, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y el diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, la longitud de onda, etc.

La migración diferencial en la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta, son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención, se mide desde el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado de la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria, dan lugar a los diferentes métodos de Cromatografía de Líquidos; esto es:

#### **Cromatografía líquido-sólido o de Adsorción.**

En la Cromatografía de Adsorción, la fase estacionaria propiamente dicha, es la interfase líquido-sólido. Sus moléculas están unidas en su superficie de forma irreversible por interacciones dipolo-dipolo. La fuerza de interacción con la superficie varía para diferentes compuestos; así mismo, los tiempos de vida de la fase estacionaria como la obtención de una separación varía para diferentes sustancias. Este tipo de

cromatografía es muy usada para compuestos polares y compuestos orgánicos no iónicos.

El mecanismo de separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y de la fase móvil o disolvente para ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Alguno de los sólidos utilizados con más frecuencia son sílica gel y alúmina (si se desea que la fase estacionaria sea polar), cuando se tiene una fase móvil no polar; y cuando se tiene una fase móvil polar se utiliza como fase estacionaria polímeros (fase estacionaria no polar). En muchas ocasiones, debido a una fuerte adsorción o retención de los componentes de la muestra en el sólido activo, es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme, con lo cual se logra un incremento de solubilidad en los componentes de la muestra en la fase móvil. A esta variante se le denomina elución por gradiente o programación de la fase móvil.

#### **Cromatografía líquido-líquido o de Partición.**

En este tipo de cromatografía, la muestra es separada de acuerdo a su coeficiente de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria (distribución). De ahí que los compuestos más afines a la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella en tanto que los menos afines son transportados más rápidamente por la fase móvil.

La separación por distribución se basa en la solubilidad relativa de la muestra en dos fases. La cromatografía de partición en fase normal si la fase estacionaria es más polar que la fase móvil; y la cromatografía de partición en fase inversa si la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. Ambas fases estacionarias pueden ser empacadas por un soporte cubierto o bien por un soporte químico. La cromatografía en fase normal es usada para muchos compuestos orgánicos polares, mientras que la cromatografía en fase inversa es comúnmente usada para compuestos polares débiles.

#### **Cromatografía de Intercambio Iónico.**

La separación por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.

Este tipo de separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplios, y ejemplos característicos de éstos son los péptidos y los aminoácidos. En la fase móvil se puede variar la fuerza iónica o el pH para obtener la elución de los componentes de la mezcla en un tiempo razonable.

En este tipo de cromatografía, la fase móvil consiste de grupos funcionales ácidos o básicos enlazados a la superficie de un polímero (resina o sílica gel). Las especies cargadas en la fase móvil son atraídas por el grupo funcional apropiado

hacia el ion intercambiador y ser separados de esta manera.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, junto con iones de carga opuesta. Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera, las moléculas de las muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, de acuerdo a la expresión siguiente:



#### Cromatografía de Exclusión Molecular.

En esta forma de cromatografía de líquidos las sustancias se separan de acuerdo a su tamaño molecular. Las moléculas pequeñas pueden entrar dentro de la red del empaque de la columna y ser retenidas mientras que las moléculas grandes no pueden hacerlo y son eluidas rápidamente. Por lo tanto el orden de elución será primero, las moléculas de gran tamaño, después las de tamaño intermedio y por último las pequeñas.

Las columnas analíticas son empacadas con partículas de aproximadamente el mismo tamaño. Para la clasificación de moléculas de acuerdo a su tamaño, es prerequisite que las partículas sean totalmente porosas y que los poros tengan un diámetro definido.

Existen modificaciones a los tipos de cromatografía mencionados, como en la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas del soporte. Este empaque se puede considerar de

los más ampliamente empleados ya que es muy estable y la fase estacionaria no se pierde fácilmente por el uso. Esta variante de cromatografía se puede llevar a cabo en fase normal o en fase inversa. En la primera se utilizan empaques polares que funcionan de manera semejante a la cromatografía líquido-sólido (adsorción). La cromatografía de fase inversa, involucra una fase estacionaria relativamente poco polar, como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a los grupos silanos del soporte; se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.

Otra modificación a las técnicas tradicionales de cromatografía es la cromatografía de par iónico que es una combinación de la cromatografía líquido-sólido (o fase enlazada) con la cromatografía de intercambio iónico.

Mezclas de ácidos, bases y sustancias neutras que resultan difíciles de separar por intercambio iónico pueden ser separadas por este tipo de cromatografía. La fase estacionaria usada es la misma que la usada para una cromatografía de fase inversa. Un compuesto orgánico, el cual forma un par iónico con un componente de la muestra de carga contraria, se adiciona a la fase móvil. Este par iónico es una sal, la cual se comporta cromatográficamente como una molécula orgánica no iónica que puede ser separado por cromatografía de fase inversa.

Los parámetros que hay que considerar para que se lleve a cabo una buena separación son, el factor de capacidad, la



resolución, y el número de platos teóricos.

#### Factor de Capacidad.

El factor de capacidad se define como:

$$K' = \frac{V_r - V_o}{V_o}$$

en donde:

$V_r$  = distancia mostrada entre la línea base y el punto de inyección y una perpendicular desde el punto máximo del pico de interés.

$V_o$  = distancia mostrada entre la línea base y el punto de inyección y una perpendicular desde un punto máximo del pico retenido.

Los valores de  $V_r$  y  $V_o$  deben ser expresados en las mismas unidades de medida.

#### Número de Platos Teóricos.

El número de platos teóricos de la columna se define como:

$$N = 16(t^2/w)$$

en donde:

$N$  = número de platos teóricos.

$t$  = tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta el momento de aparecer el pico de interés en el cromatograma.

$w$  = ancho del pico en la base, expresado en unidades de tiempo.

Esta expresión mide la eficiencia de la columna; esto es, la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos y bien separados. A mayor valor de  $N$ , la columna tendrá una mayor eficiencia.

#### Resolución.

La resolución ( $R$ ), indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma y es otro factor importante que considerar en una columna; (figura 1) a mayor valor de  $R$ , la separación será mejor.

La resolución aceptable deberá definirse en el método; de la misma manera, la fórmula para calcular el factor de resolución. Las fórmulas aceptadas son las siguientes:

$$I) \quad R = \frac{2 (t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

en donde:

$t_2$  y  $t_1$  = tiempos de retención de los dos componentes.

$w_2$  y  $w_1$  = anchos de las bases de los picos, obtenidos por extrapolación de los lados de los picos a la línea base.

$$II) \quad R = \frac{2 (t_2 - t_1)}{1.69(w_2/2 + w_1/2)}$$

en donde:

$t_2$  y  $t_1$  = tiempos de retención de los dos componentes.

$w_2/2$  y  $w_1/2$  = el ancho resultante de la extrapolación en los picos, expresados en unidades de tiempo en los cromatogramas a media distancia desde la cima hasta la base.

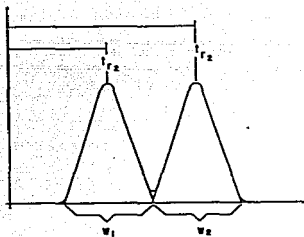


FIGURA 1.

El factor de separación se varía modificando la composición de la fase móvil y/o la estacionaria. La eficiencia se varía con cambios en la longitud de la columna o en la velocidad de flujo de la fase móvil y el factor de capacidad se modifica con cambios en la fuerza de la fase móvil.

El uso de integradores evita errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

#### Instrumental.

En todo tipo de instrumental y no sólo respecto a los cromatógrafos de fase líquida, hay ciertas características de índole general que deben evaluarse al considerar el instrumento ya que con fines de adquisición o de formarse una idea sobre la utilidad que puede prestar como:

##### a) Versatilidad.

El instrumento debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferentes tipos, debe prestarse a las distintas técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como la programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc.

##### b) Sensibilidad.

Un buen instrumento, a más de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad del cromatógrafo depende sobre

todo del sistema de detección que utiliza.

La figura 2 nos muestra los componentes esenciales de un cromatógrafo de líquidos.

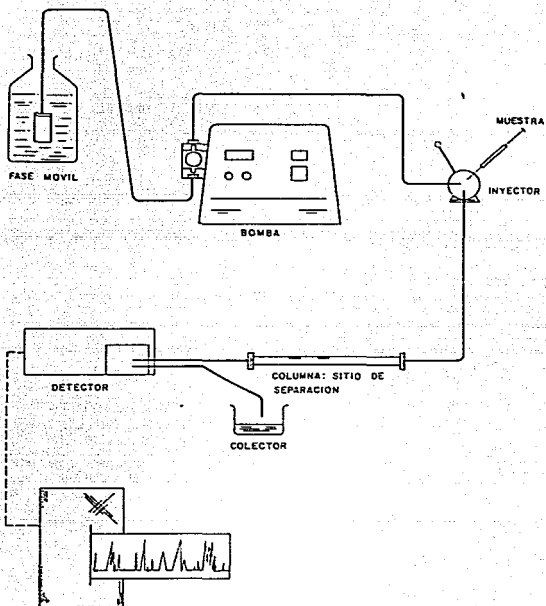


FIGURA 2.

### **Fase Móvil.**

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes para almacenar la fase móvil. Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se gasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Por este motivo, es necesario remover de la fase móvil los gases disueltos. Una forma es aplicar vacío sobre el recipiente que contiene la fase móvil, mientras se agita el líquido con un agitador magnético.

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de líquidos son:

- Disolver la muestra.
- No debe degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Libre de impurezas.

### **Preparación de la Muestra.**

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil

para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben seleccionar con cuidado.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. Además la fase móvil debe ser compatible con el detector empleado, lo cual es particularmente importante en el caso de programaciones de fase móvil, puesto que el cambio de composición de ésta puede afectar el funcionamiento del detector.

#### **Sistemas de Bombeo.**

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna, y debe cumplir con ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.

Existen básicamente dos tipos de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y sus desventajas. Estos tipos son:

- Bombas de flujo constante, que mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas se cuentan las bombas recíprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan el solvente que entra a cámaras con una capacidad de



volumen pequeña; en estas bombas se generan pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.

- Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas; como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante una espiral que empuja el solvente, y la segunda amplifica la presión del solvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del solvente.

- Bombas de presión constante, que tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del solvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de un gas inerte para presurizar el solvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el solvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas, emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del solvente con el gas comprimido.

Estos normalmente son sistemas isocráticos; es decir, que mantienen constante la proporción de los solventes en la fase móvil; sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones de mezclas de solutos con valores muy variables de  $K'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas

que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial, las proporciones iniciales de los solventes. En estos casos los solventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentado cada uno a su respectiva bomba.

Los solventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna.

#### **Sistema de Inyección.**

Un factor importante para obtener una buena resolución en la separación, es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra, es en forma de paquete pequeño, ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; esta tiene que soportar la presión del sistema aunque hay dispositivos que desvían el flujo del solvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector mediante un sistema de válvulas, o bien, se suspende el flujo mientras se introduce la muestra y posteriormente se reanuda. Un sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar.

## Detector.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o al evaluar las cualidades de un cierto diseño, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como:

### - Respuesta.

Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o sólo con uno específico.

### - Sensibilidad.

Defínese la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este es un término relativo puesto que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras. Por otra parte, la sensibilidad no da una idea clara acerca de la cantidad mínima detectable, puesto que ésta puede estar severamente limitada por el nivel de ruido del instrumento.

### - Ruido.

Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc. Se llama cantidad mínima detectable a la cantidad de muestra que produce una señal igual al doble de nivel de ruido del instrumento.

- Linearidad.

Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra; esta propiedad se conoce como linealidad.

- Estabilidad.

Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo, a la vez que ser compatible con programaciones de fase móvil.

Los detectores más utilizados son:

- Detectores Fotométricos:

Fluorescencia.

Absorción Ultravioleta-Visible.

Absorción Infrarroja.

- Detector de Índice de Refracción.

- Detector de Radioactividad.

- Detector Electroquímico.

De los anteriores el más utilizado es el detector ultravioleta y su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Es lógico suponer que la respuesta de este detector será selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorben luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

## Columna.

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se lleva a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es

aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas, y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10 a 250 cm. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos, y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnica de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los

espacios que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

Por otro lado, actualmente se emplean materiales de empaque con partículas muy pequeñas que elevan el área superficial total, pudiendo así reducir las dimensiones de la columna. Otra manera de mejorar la eficiencia y la resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna.

Cuando se tienen valores de  $K'$  muy semejantes, es conveniente el empleo de temperaturas para lograr buenas separaciones.

#### **Tipos de Empaques utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.**

- Octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Octadecil-silano enlazado químicamente a gel de sílice con una porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Partículas de sílica porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Alúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaque de intercambio catiónico fuerte: polímero de fluorocarbón sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.

- Octilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaque de intercambio aniónico fuerte formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílica de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recubrimiento enlazado químicamente a un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.

#### **Registrador.**

Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos. Otras características deseables de los registradores son respuesta rápida de la pluma y la velocidad variable del papel.

### C. CUANTIFICACION EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.

La cuantificación de un compuesto, representado por un pico se realiza casi siempre por comparación con el área de un estándar de concentración conocida. La cuantificación es rara vez realizada por la técnica de normalización de áreas. Esta técnica no es principalmente usada porque requiere que todos los solutos sean eluidos y detectados. Esto no siempre es realizado. Además, los detectores comúnmente usados en cromatografía de líquidos, por ejemplo UV, índice de refracción, y detectores fluorométricos, son detectores más bien de concentración que detectores de masa como en Cromatografía de Gases. Los detectores de concentración responden de manera muy diferente a los diferentes solventes eluidos, así que la exacta cuantificación vía normalización del área requiere que los factores de respuesta sean desarrollados para todos los solutos.

Esta no es práctica, así en la práctica, la cuantificación se hace comparando el área de la muestra con el área de un estándar de concentración y pureza conocida o bien asignada.

La medición del ancho del pico y el área del pico tienen sus desventajas y limitaciones.



## MÉTODOS DE CUANTIFICACION.

### ESTANDARIZACION EXTERNA Y ESTANDARIZACION INTERNA.

Después de que se han determinado las áreas de los picos, en base a la concentración del compuesto, se procede a cuantificar el pico de la muestra mediante la estandarización externa. Estos métodos también tienen sus ventajas y limitaciones.

#### Estándar Externo.

En el método del estándar externo, con inyecciones separadas de muestra y estándar, permiten la cuantificación mediante la comparación de las áreas de los picos; esto es, comparando el área del pico obtenido para la muestra con el área del pico obtenido para el estándar. Es fundamental el control preciso del volumen de inyección cuando se usa el estándar externo.

Las ventajas de usar el estándar externo son:

- 1) Simplicidad en la preparación de las soluciones a analizar.
- 2) Eliminación de buscar un estándar interno.
- 3) Se evitan problemas causados por una coelución del estándar interno y de productos de degradación desconocidos.
- 4) Almacenamiento y pesada de un estándar interno no necesario.

La solución de un estándar externo debe ser de una concentración cercana a la esperada en la solución de la muestra. Se debe asegurar que el área del pico podrá ser

comparable, de esta manera se evita cancelar errores en las medidas. Después cromatografiando ambas soluciones (muestra y estándar), la cantidad contenida se puede calcular con la siguiente fórmula.

$$Cx = \frac{Am \ Ps \ Dm}{As \ Ds \ Pm} Pp$$

en donde:

Cx = Concentración del activo en la muestra.

Am = Área del pico de la muestra.

As = Área del pico del estándar.

Pm = Cantidad en mg de la muestra.

Pp = Cantidad en mg del estándar.

Dm = Dilución de la muestra en ml.

Ds = Dilución del estándar en ml.

Pp = Peso promedio de la muestra.

#### Estándar Interno.

Un estándar interno es una sustancia adicionada a la solución prueba. El radio del área del pico de las especies de interés así como del estándar interno son comparadas de un cromatograma a otro. Renumerados estándares internos para muchos aparatos provocan errores. Así el uso de estándares internos puede ocasionar desventajas en análisis de estabilidad en muestras. Cada muestra puede desarrollar sus productos de degradación los cuales pueden coeluir con el estándar interno, en cuyo caso, la aparición de una pequeña cantidad de degradación podría cambiar sólo muy poco.

Un estándar interno debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- 1) Debe ser completamente separado de los otros picos en el cromatograma
- 2) Debe eluir cerca de los solutos que serán cuantificados.
- 3) Preferiblemente su estructura y el área del pico debe ser parecida al de la muestra a analizar.
- 4) No debe estar presente en la muestra a analizar, no debe potencializar ni ser producto de degradación de la muestra ni degradarla.
- 5) Debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de trabajo (cromatográficas).
- 6) Debe ser fácilmente disponible, razonablemente de alta pureza o ser una sustancia fácil de purificar.

Existen dos variaciones en las técnicas para el uso de estándar interno. Una involucra la determinación de factores de respuesta, y la segunda, una relación entre respuestas. Los factores de respuesta son calculados dividiendo el peso de la muestra entre el correspondiente área del pico. El factor de respuesta es usado para calcular la concentración de la muestra. De la siguiente manera se puede calcular primeramente el factor de respuesta y enseguida la concentración.

$$FR = \frac{Asr \cdot Psi \cdot Dsr}{Así \cdot Dsí \cdot Psr}$$

en donde:

FR = Factor de respuesta.

Asr = Área del pico del estándar de referencia.

Asi = Area del pico del estándar interno.  
 Psr = Cantidad en mg del estándar de referencia.  
 Psi = Cantidad en mg del estándar interno.  
 Dsr = Dilución del estándar de referencia.  
 Dsi = Dilución del estándar interno.

$$Cx = \frac{Am \cdot Psi \cdot Dm \cdot 1}{Asi \cdot Dsi \cdot Pm \cdot FR} Pp$$

en donde:

Cx = Concentración del activo en la muestra.  
 Am = Area del pico de la muestra.  
 Asi = Area del pico del estándar interno.  
 Pm = Cantidad en mg de la muestra.  
 Psi = Cantidad en mg del estándar interno.  
 Dm = Dilución de la muestra.  
 Dsi = Dilución del estándar interno.  
 FR = Factor de respuesta.  
 Pp = Peso promedio de la muestra.

El factor de respuesta es un medio importante no solo porque se usa para calcular la concentración, sino también porque se puede utilizar para checar el cromatógrafo. El factor de respuesta deberá ser relativamente constante de un día a otro. Sino, entonces, se debe demostrar si algunos han sido malos en la preparación de las soluciones del estándar interno o en el cromatógrafo.

El segundo camino para usar el estándar interno es por el uso de relaciones entre las áreas de los picos, el cual es

definido como la relación entre el área del pico de la muestra y el área del pico del estándar interno. Después de que ha sido establecido que la relación entre las áreas de los picos es lineal en el rango deseado, se prepara una solución de la muestra y una solución del estándar a los cuales han sido adicionados la misma cantidad de estándar interno. Después de obtener el cromatograma de la muestra y del estándar, la relación de áreas para la muestra y el estándar se obtienen.

#### Sistema de Adaptabilidad.

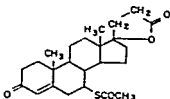
El adaptar un sistema de operación cuando se emplean métodos cromatográficos (líquidos ó gases), es debido a que ciertos factores como la electrónica, el equipo, la operación analítica y la muestra, los cuales constituyen un sistema analítico, pueden llegar a cambiar la función de un sistema.

Esta adaptabilidad se realiza mediante el método establecido, analizando una misma solución estándar repetidamente (6 veces). Con los resultados obtenidos, se obtiene la eficiencia, precisión interna, factor de coeao, resolución, tiempo de retención, curva de calibración, respuesta, forma de picos y recobro experimental. Con dichos datos, se puede obtener la reproducibilidad de respuesta. Los límites se encuentran establecidos en la monografía del producto.

D. MONOGRAFÍAS.

ESPIRONOLACTONA.

a) Fórmula Estructural.



b) Fórmula Condensada.



c) Peso Molecular.

416.57

d) Nombre Químico.

Gama-lactona del ácido 3-(3-oxo-7-alfa-acetiltio-17-beta-hidroxi-14-andostren-17-alfa-il) propiónico.

e) Descripción.

Polvo de color blanco o blanco amarillento, inodoro o con ligero olor a ácido tricloroacético.

f) Solubilidad.

Fácilmente soluble en cloroformo; poco soluble en alcohol, éter; casi insoluble en agua.

g) Propiedades Físicas.

Absorbe en el Infrarrojo.

Absorbe en el Ultravioleta.

Rotación Óptica:  $-33^{\circ}$  -  $-37^{\circ}C$

Punto de Fusión: 205°C.

Resonancia Magnética Nuclear.

Espectrometría de Masas.

h) Estabilidad y Degradación.

Se ha encontrado que la espironolactona se descompone en la diénona, canrenona. La reacción no es fácil de una a otra en la forma química pura o en forma farmacéutica. Así, de canrenona se forma sólo un 1% o menos en un periodo de 5 años a 40°C.

i) Valoración.

- Por método espectrofotométrico, utilizando como disolvente y como blanco, metanol a una longitud de onda de 238 nm.

- Por método cromatográfico, la espironolactona puede ser separada de la canrenona en una columna de octadecilsilano usando metanol-agua como fase móvil y detectarla con la ayuda de un detector UV. La espironolactona eluye primero y puede ser detectada a 238 nm; y la canrenona puede ser absorbida a 283 nm mostrando a esta longitud de onda su máximo de absorción.

Así mismo, por método cromatográfico se puede utilizar también como fase móvil acetónitrilo-fosfato de amonio dibásico 0.02M (55:45), con un detector de UV a una longitud de onda de 254 nm y una columna de octadecilsilano compuesta por micropartículas de 5 a 10  $\mu$ m de diámetro.

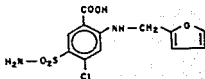
j) Propiedades Farmacológicas.

Este antagonista de la aldosterona es primeramente usado como diurético en hipertensión e hiperaldosterismo. También ha sido utilizado recientemente en el tratamiento del hirsutismo. Al igual que los antagonistas de la aldosterona, la espironolactona se ha usado sobre todo en el tratamiento del edema refractario y la hipertensión. Con frecuencia se ha empleado junto con otros agentes diuréticos y como única droga. Teóricamente, la pérdida de potasio que se produce secundariamente con el uso de otros diuréticos puede disminuir con la administración simultánea de antagonistas de la aldosterona. Esto ha quedado respaldado con la experiencia clínica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, la cirrosis hepática y el síndrome nefrótico, pero los efectos cuantitativos no son exactamente previsibles debido a las complejas interacciones de la enfermedad primaria, el grado de hiperaldosterismo secundario y las acciones de los diuréticos tomados simultáneamente. La espironolactona puede ser también útil en individuos con hiperuricemia clínicamente significativa, hipopotasemia o intolerancia de la glucosa y es el agente de elección en el hiperaldosterismo primario.



**FUROSEMIDA.**

a) **Fórmula Estructural.**



b) **Fórmula Condensada.**

$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

c) **Peso Molecular.**

330.75

d) **Nombre Químico.**

Acido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-((2-furanilmetil)amino) benzoico.

e) **Descripción.**

Polvo cristalino de color blanco o ligeramente amarillento, inodoro.

f) **Solubilidad.**

Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos, dimetilformamida y acetona; poco soluble en etanol y metanol; ligeramente soluble en éter; insoluble en agua y cloroformo.

g) **Propiedades Físicas.**

Absorbe en el Infrarrojo.

Absorbe en el Ultravioleta.

Punto de Fusión: 208°C con descomposición.

h) Estabilidad y Degradación.

Se ha reportado que la furosemida es inestable en medio ácido y muy estable en medio básico. Así mismo, la USP indica que el pH adecuado es el que se encuentra entre 8.9 y 9.3.

Por otra parte, se ha observado que la furosemida en soluciones que utilizan como conservador benzoato de sodio, sufre descomposición debido a que el benzoato no es un buen conservador en medio básico. Sin embargo, los parabenos si pueden ser utilizados ya que no interfieren en el análisis, ni en la descomposición de la furosemida.

i) Valoración.

Por método volumétrico ácido-base utilizando como medio de dilución dimetilformamida, como indicador azul de bromotímol 1% en dimetilformamida y se titula con solución 0.1N de hidróxido de sodio.

j) Propiedades Farmacológicas.

La furosemida es un diurético que actúa sobre la función renal tubular. Este fármaco logra una diuresis máxima mucho mayor que la observada con otros agentes. El principal sitio de acción es la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Por ende, este fármaco también se denomina diurético del asa.

Los diuréticos del asa actúan principalmente inhibiendo la reabsorción de electrolitos en la rama ascendente gruesa del asa de Henle.

En primer lugar, este agente virtualmente elimina la producción positiva y negativa del agua libre, en la cual la rama ascendente desempeña el papel central. En segundo lugar,

experimentos con micropunción demuestran un aporte mucho mayor de sodio y cloro a la parte inicial del túbulo distal. En tercer lugar, en experimentos con micropunción in vitro hay una total inhibición del transporte de cloruro de sodio en la rama ascendente gruesa con concentraciones lumbales de la droga en el espectro esperado in vivo.

Este agente tiende a aumentar el flujo sanguíneo renal sin incrementar la fase de filtración especialmente luego de la inyección intravenosa. Tal cambio en la hemodinámica renal reduce la reabsorción del líquido y electrolitos en el túbulo proximal y puede aumentar la respuesta diurética. También tienden a aumentar la excreción de potasio y la concentración del ácido úrico.

Los diuréticos de esta clase incrementan la excreción de calcio y magnesio con una magnitud aproximadamente proporcional al aumento de la excreción de sodio. Así mismo, aumentan la excreción de la acidez titulable y el amonio. Este tipo de diuréticos, es efectivo para el tratamiento del edema de origen cardíaco, hepático renal; en casos de nefrosis o insuficiencia renal crónica también suele ser utilizada la furosemda.

## E. DESARROLLO.

### METODO I.

Este método se realiza por Cromatografía de líquidos en fase inversa.

#### Condiciones;

Columna: Columna empacada con octadecilsilano de tamaño de partícula de 5  $\mu$ . La columna es de una longitud de 100 mm y un diámetro de 4 mm.

Fase Móvil: Acetonitrilo : Sol. Reguladora de fosfato de amonio dibásico 0.02 M (55:45).

Disolvente: Acetonitrilo : Agua (9:1).

Flujo: 1 ml/min.

Volumen de Inyección: 10  $\mu$ l.

Longitud de Onda: 254 nm.

### RESULTADOS.

Este método resulta no ser específico para los fines deseados, debido a que la furosemina presenta un tiempo de retención muy cercano al tiempo de retención de su producto de degradación, el ácido 4-cloro-5-sulfamiloil antranílico; esto se puede deber a que ambos productos tienen un comportamiento muy parecido y con estas condiciones no se logra la

separación, como se puede observar en la figura 3.

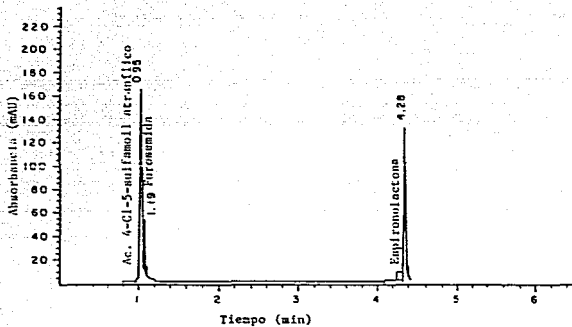


FIGURA 3.

## METODO II.

Se realiza por cromatografía de líquidos en fase inversa, siendo éste método específico ya que con este se logran separar los 2 activos, la furosemida y la espironolactona, así como el ácido 4-cloro-5-sulfamoil antranílico, como se muestra en la figura 4; y a su vez resulta ser el adecuado para que no se degrade la furosemida.

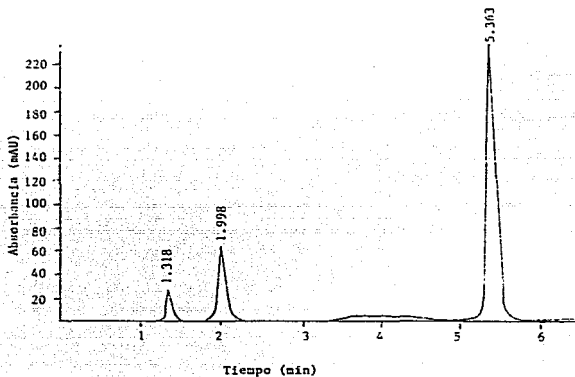


FIGURA 4.

CONDICIONES.

Equipo: Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, modelo HP 1090, equipado con inyector automático, detector UV.

Columna: Columna empacada con octadecilsilano de material esférico rugoso, con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ . La columna es de una longitud de 100 mm y un diámetro de 4 mm.

Fase Móvil: Metanol grado cromatográfico : solución reguladora de fosfatos 0.4%, con el siguiente gradiente.

Tiempo (min)	% Metanol	% Fosfatos
0 - 1.75	50	50
1.80 - 5.20	75	25
5.50 - 6.50	50	50

Disolvente: Metanol grado cromatográfico : solución reguladora de fosfatos 0.4% (50:50)

Flujo: 0.8 ml/min.

Volumen de Inyección: 15  $\mu$ l.

Longitud de Onda: 254 nm.

Solución Reguladora de Fosfatos al 0.4%

Pesar 2.0 g de fosfato de sodio dibásico y 2.0 g de fosfato de potasio monobásico; transferir a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver y llevar al volumen con agua

destilada. Ajustar la solución a un pH de 7.0 con solución de hidróxido de sodio 1.0 N. Posteriormente, 500 ml de la solución anterior se filtran al vacío por membrana de 0.25  $\mu$ m; (esta solución se usará para la fase móvil), y los otros 500 ml se dejan para usarse como disolvente.

#### Disolvente.

Preparar una mezcla de metanol grado cromatográfico y solución reguladora de fosfatos al 0.4%, en una proporción 50 : 50.

#### Solución de Referencia.

Pesar en un matraz volumétrico de 50 ml, aproximadamente 20 mg de estándar de furosemda y 50 mg de estándar de espironolactona; adicionar 25 ml de metanol y agitar en baño de ultrasonido durante 5 min. (para asegurar que ambas sustancias se disuelvan bien). Llevar al volumen con metanol y mezclar.

De la solución anterior, tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml; adicionar una alícuota de 1 ml de la solución de ácido 4-cloro-5-sulfamoil antranílico y llevar al volumen con disolvente y mezclar.

#### Solución de ácido 4-cloro-5-sulfamoil antranílico.

Pesar en un matraz volumétrico de 100 ml, aproximadamente 16 mg de ácido 4-cloro-5-sulfamoil antranílico y adicionar metanol, agitar durante 5 min. en baño de ultrasonido y



enseguida llevar al volumen con metanol y mezclar.

De la solución anterior, tomar una alícuota de 1 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con metanol y mezclar.

#### Preparación de la Muestra.

Pesar en un matraz volumétrico de 50 ml el equivalente a 20 mg de furosemida y a 50 mg de espironolactona de una mezcla del producto (cápsulas); adicionar 25 ml de metanol y agitar en baño de ultrasonido durante 5 min. Llevar al volumen con metanol y mezclar. De la solución anterior, tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml; llevar al volumen con disolvente y mezclar.

Tanto la muestra como la solución de referencia, se filtran por membrana de 0.22  $\mu$ m para evitar que se tape el inyector. Se procede al análisis de la siguiente manera:

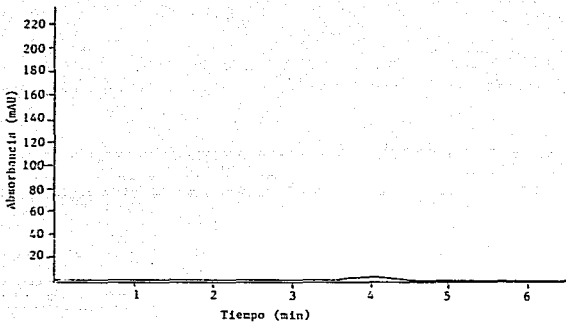
- Inyectar la muestra por duplicado y obtener respuesta y realizar los cálculos correspondientes.

## VALIDACION DEL METODO.

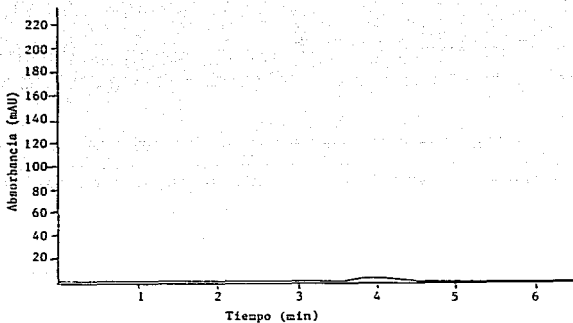
### I. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Con la técnica propuesta se analizaron cada una de las muestras obteniéndose lo siguiente, utilizando como referencia temperatura ambiente. Se sometieron muestras de placebo y de principio activo a 40°C como se indica a continuación:

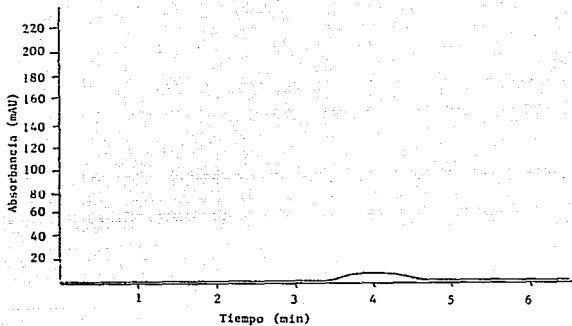
MUESTRA	TIEMPO	TEMPERATURA
Placebo	1 mes	40°C
Espironolactona		
y Furosemida	1 mes	40°C
Muestra del Producto	1 mes	40°C



**FIGURA 5.** Cromatograma de el disolvente, no se observa interferencia para la cuantificación de los activos.



**FIGURA 6. Cromatograma de el placebo a temperatura ambiente, no hay interferencia para la cuantificación de los activos.**



**FIGURA 7. Cromatograma de el placebo a 40°C. 1 mes. No hay interferencia para la cuantificación de los activos, así como tampoco hay degradación de alguno de los excipientes.**

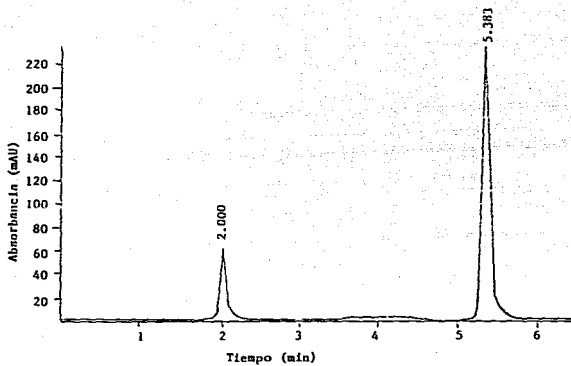


FIGURA 8. Cromatograma correspondiente a los estándares de furosemida y espironolactona en donde se observa una adecuada resolución, y aparecen claramente los tiempos de retención para cada activo.

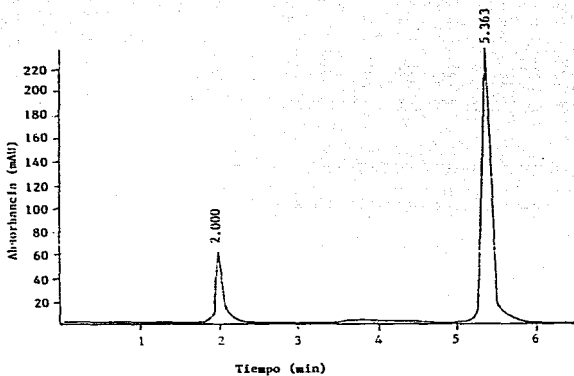


FIGURA 9. Cromatograma correspondiente a la furosemida y espironolactona a 40°C, 1 mes.

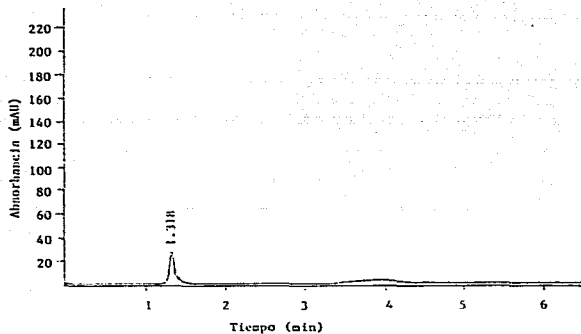


FIGURA 10. Cromatograma correspondiente al producto de degradación de furosemda (ácido 4-cloro-5-sulfamoil antranílico).



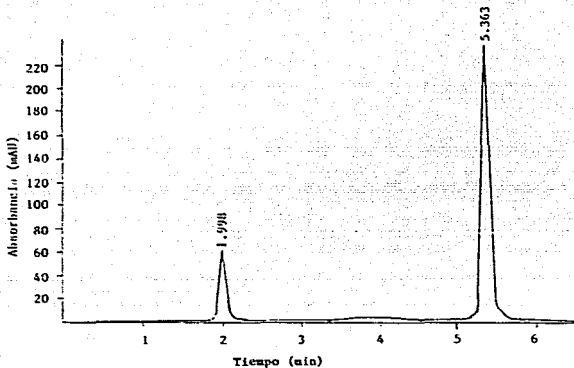
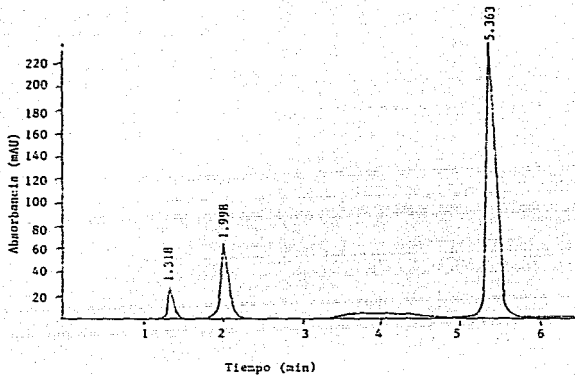
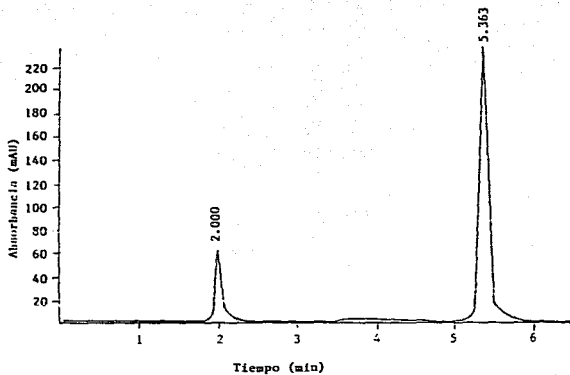


FIGURA 11. Cromatograma correspondiente al placebo adicionado con los activos en el que se puede confirmar que no hay interferencia de otros picos con los de los principios activos.



**FIGURA 12. Cromatograma correspondiente al placebo adicionado con los activos y el producto de degradación.**



**FIGURA 13.** Cromatograma correspondiente a una muestra de cápsulas almacenadas a 40°C durante 24 horas, en donde se puede confirmar que efectivamente no hay interferencia alguna para la cuantificación de los activos.

## II. LINEARIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema se demostró analizando muestras de tamaños equivalentes al 50, 75, 100, 125, y 150 % del establecido en el procedimiento normal de análisis para cada principio activo, por duplicado.

A partir de los datos obtenidos en el ensayo de las muestras antes descritas, se efectuó el análisis de regresión lineal, calculando el coeficiente de correlación entre el contenido de furosemida y espironolactona y la cantidad recuperada de cada uno de ellos. (Figura 14 a, b, Tabla 1).

## III. PRECISION DEL SISTEMA.

Se determinó analizando una misma muestra de solución estándar correspondiente al 100 % del establecido en la linealidad del sistema, por sextuplicado.

El análisis de varianza de los datos fue lo que nos ayudó a determinar la precisión del sistema. (Tabla 2).

## IV. LINEARIDAD DEL METODO.

Se determinó en placebos adicionados de los principios activos, cada uno de manera independiente, en cinco concentraciones diferentes haciendo el análisis por triplicado.

El intervalo de trabajo o linealidad del método se demostró analizando muestras de tamaño equivalentes al 80, 90, 100, 110, y 120 % del establecido en el procedimiento normal de análisis para cada principio activo.

A partir de los datos obtenidos en el ensayo de las muestras antes descritas, se efectuó el análisis de regresión lineal, calculando el coeficiente de correlación entre el contenido de furosemida y espironolactona adicionados y la cantidad recuperada de los mismos.

También se realizó el análisis estadístico de los datos para demostrar la variación del método. (Figura 15a, 15b, Tabla 3).

#### V. EXACTITUD DEL METODO.

La propiedad del método de proporcionar resultados cuantitativos lo más cercano al valor real, se demostró adicionando placebos adicionados del principio activo al 100% del valor esperado por sextuplicado cada muestra con la metodología propuesta. La cantidad recuperada de los dos activos en cada muestra, así como los valores obtenidos de la desviación estándar y del coeficiente de variación indican la exactitud del método.

También se determinó el intervalo de confianza (I.C.) y los límites de confianza (L.C.) al 97.5 % respectivamente. (Tabla 4).

## VI. PRECISION DEL METODO.

La reproducibilidad del método se realizó analizando por sextuplicado un lote proveniente de un muestreo homogéneo de cápsulas, por dos analistas, en dos días diferentes.

El análisis de varianza de los datos obtenidos sirvió para demostrar la precisión del método. (Tabla 5).

RESULTADOS.

TABLA 1.

Linealidad del Sistema.

Espironolactona.

---

mg adicionados	Area	mg recuperados(*)	Area	%Area
25.050	2499124	25.1995	2514100	100.595
37.575	3748719	37.2595	3717200	99.16
50.100	4998222	49.9990	4988158	99.80
62.625	6247805	62.5970	6245048	99.955
75.150	7497400	74.7490	7457400	99.470

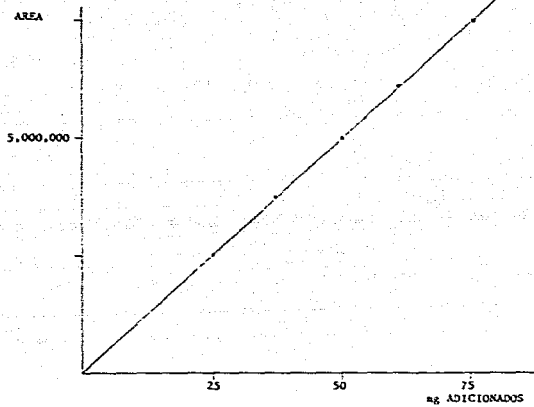
Regresión lineal:  $r=0.9999$   $r^2=0.9998$   $m=0.9935$

Criterio:  $r \geq 0.99$   $r^2 \geq 0.98$

Coficiente de variación:  $\bar{X}=99.796\ddagger$   $DE=0.542$   $CV=0.543\ddagger$

Criterio:  $CV \leq 1.5\ddagger$

\* Promedio de los resultados obtenidos.



**FIGURA 14.a. Linearidad del Sistema. Espironolactona.**



Linealidad del Sistema.

Furosemina.

mg adicionados	Area	mg recuperados(*)	Area	%Area
9.850	600905	9.8510	600960	100.010
14.775	901379	14.7235	898240	99.65
19.700	1201812	19.6630	1199550	99.81
24.625	1502344	24.4240	1490100	99.185
29.550	1802780	29.6185	1806950	100.145

Regresión lineal.	r= 0.9999	r <sup>2</sup> =0.9998	m=0.9997
Criterio:	r ≥ 0.99	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	

Coefficiente de variación.	$\bar{X}$ =99.76%	DE=0.373	CV=0.374%
Criterio:	CV ≤ 1.5%		

\* Promedio de los resultados obtenidos.

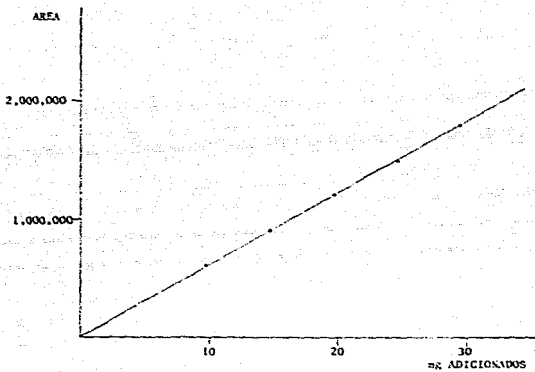


FIGURA. 14.B. Linearidad del Sistema. Furosemida.

TABLA 2.

Precisión del Sistema.

Espironolactona.

---

mg recuperados	%recuperado.
49.905	99.4
99.602	98.81
49.655	98.71
49.758	99.12
49.605	98.81
49.633	98.87

mg adicionados de Espironolactona = 50.2 mg = 100%

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}=98.98\%$  DE=0.239 CV=0.24%

Criterio: CV  $\leq$  1.5%

Precisión del Sistema.

Furosemda.

---

mg recuperados	% recuperado
20.568	99.84
20.659	100.29
20.654	100.26
20.733	100.65
20.730	100.63
20.685	100.41

mg adicionados de Furosemda = 20.6 mg = 100%

Coficiente de Variación:  $\bar{X}=100.35\%$  DE=0.298 CV=0.3%

Criterio: CV  $\leq$  1.5%

TABLA 1.

Linealidad del método.

Espironolactona.

mg adicionados	μg adicionado	mg recuperados	μg recuperado	μg respuesta
40.7	81.4	40.583	81.17	99.72
45.3	90.6	45.364	90.73	100.14
50.7	101.4	50.634	101.27	99.87
57.2	114.4	57.160	114.32	99.93
60.0	120.0	59.950	119.90	99.92

Regresión lineal:  $r=0.9999$   $r^2=0.9999$   $m=1.0$   
 $b=-0.118$

Criterio:  $r \geq 0.99$   $r^2 \geq 0.98$   $b=0$

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}=99.92\%$   $DE=0.153$   $CV=0.153\%$

Criterio:  $CV \leq 2.0\%$

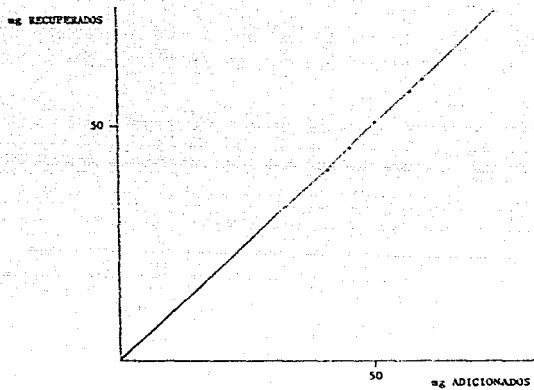


FIGURA. 15.a. Linealidad del Método. Espironolactona.

Linealidad del Método.

Furosenida.

mg	μ	mg	μ	μ
adicionados	adicionado	recuperados	recuperado	respuesta
17.1	85.5	17.242	86.21	100.83
18.2	91.0	17.982	89.91	98.60
20.5	102.5	20.709	103.55	101.02
21.3	106.5	21.170	105.85	99.39
24.1	120.5	24.153	120.765	100.22

Regresión lineal:  $r=0.9978$        $r^2=0.9957$        $n=1.003$

$b=-0.347$

Criterio:  $r \geq 0.99$        $r^2 \geq 0.98$        $b=0$

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}=100.05\%$        $DE=0.95$        $CV=0.95\%$

Criterio:  $CV \leq 2.0\%$

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

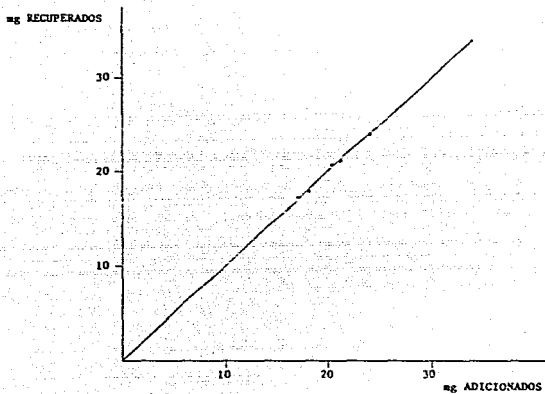


FIGURA 15.b. Linearidad del Método. Furosemida.



TABLA 4.

Exactitud al 100%.

Espironolactona.

mg adicionados	mg recuperados	%recuperado
50.6	50.591	99.98
50.0	50.103	100.21
50.5	50.257	99.52
49.7	49.327	99.26
50.1	50.081	99.96
49.9	49.580	99.36

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}=99.713\%$  DE=0.389 CV=0.39%

Criterio: CV  $\leq$  1.5%

Intervalo de Confianza:

GL=5 t=2.5706 IC=99.713 +/- 2.5706 (0.389/ $\sqrt{6}$ )

IC= 99.16% - 100.26%

IC =  $\bar{X} \pm t(DE/\sqrt{6})$

Exactitud al 100%

Furosemda.

---

mg adicionados	mg recuperados	%recuperado
20.0	19.742	98.71
19.8	19.864	100.32
19.5	19.497	99.98
20.2	20.313	100.56
20.0	20.021	100.11
19.7	19.656	99.79

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}$  = 99.91% DE=0.646 CV= 0.65%

Criterio: CV  $\leq$  1.5%

Intervalo de Confianza.

GL= 5 t= 2.5706 IC= 99.91 +/- 2.5706 (0.6465/ $\sqrt{6}$ )

IC= 98.99% - 100.82%

TABLA 5.

Precisión del Método.  
 (Reproducibilidad y Repetibilidad).  
 Espironolactona

Día	% recuperado	
	Analista	
	1	2
	101.88	99.86
	100.29	100.53
	101.32	98.69
1	101.85	99.19
	101.32	100.65
	101.09	102.53
	101.52	98.12
	100.25	98.22
2	101.38	100.24
	101.07	98.60
	101.76	99.21
	101.20	101.51

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}=100.51\%$  DE=1.261

CV=1.25%

Criterio: CV  $\leq$  2.0%

Precisión del Método.

Furosemda.

---

Día	% recuperado	
	Analista	
	1	2
	101.27	99.54
	100.08	100.69
1	101.19	99.12
	101.94	99.49
	101.41	100.93
	101.04	100.36
	101.22	98.73
	99.76	98.28
	100.67	99.52
2	100.58	98.64
	101.72	99.10
	100.54	101.70

Coefficiente de Variación:  $\bar{X}$  = 100.313% DE=1.066 CV= 1.06%

Criterio: CV  $\leq$  2.0%

#### CONCLUSIONES.

El método desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la cuantificación de Furosemda y Espironolactona en cápsulas de gelatina dura, resultó ser específico, lineal, preciso y exacto; y por lo tanto, se considera validado para las condiciones establecidas.

Después de desarrollada la metodología, esta se optimizó variando las condiciones de operación en el método con lo que se logró disminuir el tiempo de análisis de 1 día a 30-45 minutos, obteniendo igual forma de los picos, con una adecuada resolución así como un costo del análisis barato.

Así mismo, mediante el empleo de gradiente se pudo obtener una buena resolución de los picos, así como la elución de los mismos con menor tiempo.

Las pruebas estadísticas nos demuestran que la linealidad tanto del sistema como del método, es confiable y además válido, obteniendo una desviación menor a la establecida como límite, así como al obtener valores cercanos a los establecidos inicialmente. De la misma manera, el análisis de regresión nos ayuda a corroborar esto último. Por otra parte, el método resultó ser exacto y preciso tanto como por los valores obtenidos para la cantidad recuperada, como por la desviación que presentan.

En cuanto a la especificidad, como ya se mencionó anteriormente, queda comprobado que el método resulta ser específico para los fines deseados; por lo que la linealidad, exactitud, precisión y especificidad del método quedó comprobada.

Por otra parte, mediante la validación de este método, se corrobora también que puede ser utilizado como método indicador de estabilidad, debido a que se obtiene un pico bien definido para el ácido 4-cloro-5-sulfamoiil antranílico el cual puede ser cuantificado.

Tomando en cuenta lo anterior, también se puede decir que el método descrito anteriormente podría ser propuesto como un método de análisis para la Farmacopea Mexicana, tanto de la furoseida como de la espirolactona, ya que para ninguno de los anteriores se ha incluido el ensayo por cromatografía de líquidos de alta resolución en la Farmacopea Mexicana.

#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- The Merck Index, 11th Edition, published by Merck and Co., Inc. U.S.A. (1989).
- 2.- British Pharmacopoeia. Vol. I y II. Her Majesty's Stationary Office at the University Press, Cambridge. London. (1988).
- 3.- The Pharmacopoeia of the United States of America. XXII Edition, United States Pharmacopoeial Convention. Inc., U.S.A. (1990).
- 4.- Validación de Procesos Farmacéuticos. Couriel, B.D. Asociación Farmacéutica Mexicana (1982).
- 5.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta edición. Secretaría de Salud. (1988).
- 6.- Isolation and Identification of Drugs. Vol. I y II, Clarke, E.G.C., et. al. (1978).
- 7.- Remington Farmacia. 17 Edition. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1987).
- 8.- The Extra pharmacopoeia 27 Edition. Martindale. The Pharmaceutical Press. London. (1977).
- 9.- Analytical Profiles of Drugs Substances. Vol. 4 y 18 Florey. K., et.al. Academic Press. Inc., U.S.A. (1986).
- 10.- Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Séptima Edición. Goodman, G.A., et.al. Médica Panamericana, S.A. México (1986).
- 11.- Curso de Análisis Farmacéuticos. Segunda Edición. Connors, K.A. Reverté, S.A. España (1981).

- 12.- Métodos Instrumentales de Análisis. Segunda Edición.  
Willard, H.H., et.al. Compañía Editorial Continental,  
S.A. de C.V. México. (1986)
- 13.- "Qualitative and Quantitative Tests for Furosemide".  
Salin, E.I., Hasussler, A. and Vaughan, J.B. J. Pharm.  
Sci. 57/4/640-641. (1968).
- 14.- "Stability of furosemide in Aqueous Systems". Ghanekar,  
A.G., et.al. J. Pharm. Sci. 67/6/808-811. (1978).
- 15.- Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas.  
Aplicaciones Clínicas. Segunda Edición. Bowman, W.C.,  
et.al. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.  
México. (1984).
- 16.- "Some Aspects of the Photochemical Degradation of  
Furosemide". Rowbothman, P.C., Stanford, J.B., Sugden,  
J.K. Pharm. Act. Helv. 51/10/304-307. (1976).
- 17.- "Kinetics and Mechanism of Hidrolysis of Furosemide"  
Cruz, J.E., Maness, D.D., Yakatan, G.K. International  
Journal of Pharmaceutics. 2/275-281. (1979).
- 18.- "Current Concepts for the Validation of Compendial  
Assays". Pharmacopeial Forum. The United States  
Pharmacopeial Convention. Inc. U.S.A. (1986).
- 19.- Material de Apoyo al Curso de Validación de Métodos  
Analíticos. Alcántara, P.A., Sánchez, R.J.F.
- 20.- High Performance Liquid Chromatography, Advances and  
Perspectives. Volume 2. Edited by Csaba Horvath, Academic  
Press. U.S.A. (1980).



- 21.- Basic Liquid Chromatography. Stevenson, R. and Johnson, B.L. Varian Associates. U.S.A. (1978).
- 22.- The United States Pharmacopoeia. National Formulary. U.S.P. XXII. N.F. XVII. Supplement 1 - 5. (1990 - 1991).
- 23.- Drugs and Pharmaceutical Science. Pharmaceutical Process Validation. Volume 23, edited by Bernard T. Loftus and Robert A. Nash. U.S.A. (1984).