



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA

**"DESARROLLO DE UN METODO PARA  
CUANTIFICAR LISINOPRIL EN ORINA  
UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE  
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**FRANCISCO VIDAL TOVAR LÓPEZ**

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	M. en C. Gloria Velásquez Vaquero
Vocal	Q.B.P. Juan Ramón Martínez de León
Secretario	M. en C. Leticia Cruz Antonio
Suplente	Q.F.B. Cesar Octavio Jiménez Pierre
Suplente	Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López

El trabajo fue realizado en el Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. bajo la dirección de Q.B.P. Juan Ramón Martínez de León y bajo la asesoría de M. en C. Leticia Cruz Antonio.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo, en especial a la Q.F.B. Myriam Cortés Fuentes y al Q.B.P. Juan Ramón Martínez de León por el apoyo incondicional.

Agradezco a la FES Zaragoza UNAM por la educación recibida y en especial a la M. en C. Leticia Cruz Antonio, a la M. en C. Gloria Velásquez Vaquero, al Q.F.B. Cesar Octavio Jiménez Pierre y al Q.F.B Víctor Hugo Becerra López.

A mis padres, hermanas, familiares y amigos.

# ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	6
1.1. IMPORTANCIA DEL DESARROLLO ANALÍTICO	6
1.2. IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS	6
1.2.1. Fármacos en etapa de comercialización	6
1.2.2. Fármacos en investigación y desarrollo	6
1.3. FLUIDOS BIOLÓGICOS.	7
1.3.1. Sangre	8
1.3.2. Suero	8
1.3.3. Plasma	8
1.3.4. Fracción libre de proteínas.	8
1.3.5. Orina	8
1.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS	9
1.4.1. Precipitación de proteínas	9
1.4.2. Extracción líquido-líquido	10
1.4.2.1. Efecto del pH	11
1.4.3. Extracción en fase sólida	12
1.4.3.1. Acondicionamiento de los cartuchos de extracción.	13
1.4.3.2. Aplicación de la muestra.	13
1.4.3.3. Paso de limpieza (lavado)	13
1.4.3.4. Elución y recuperación del analito preparado.	14
1.4.3.5. Extracción en fase sólida en línea	14
1.5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	19
1.5.1. Parámetros cromatográficos	20
1.5.2. Teorías del fenómeno de separación cromatográfica.	22
1.5.2.1. Teoría de platos	22
1.5.2.2. Teoría de la velocidad (teoría cinética)	24
1.5.2.2.1. Difusión de remolino	24
1.5.2.2.2. Difusión Longitudinal	24
1.5.2.2.3. Resistencia a la transferencia de masa	24
1.5.2.3. Resolución	25
1.5.3. Tipos de cromatografía	26
1.5.4. Aplicación	27
1.5.5. Equipo	28
1.5.5.1. Bombas	28
1.5.5.1.1. Clasificación de las bombas utilizadas en CLAR	28
1.5.5.1.1.1. Según la velocidad del disolvente	28
1.5.5.1.1.2. Según el tipo de material	28
1.5.5.1.1.3. Según el mecanismo de desplazamiento	28
1.5.5.1.2. Programación de introducción del disolvente	29

1.5.5.2. Sistemas de Inyección de muestra -----	29
1.5.5.3. Columnas y Fases Estacionarias-----	29
1.5.5.3.1. Componentes de una Columna -----	29
1.5.5.3.1.1. Material de Empaque -----	29
1.5.5.3.1.2. Contenedor del Empaque -----	30
1.5.5.4. Detección -----	30
1.5.5.4.1. Detector UV-----	30
1.5.5.4.2. Detector de Índice de Refracción. -----	30
1.5.5.4.3. Detector de Fluorescencia. -----	31
1.5.5.4.4. Detector de Fluorescencia Inducida por Láser -----	31
1.5.5.4.5. Electroquímicos -----	31
1.5.5.4.5.1. Pueden ser clasificados en tres tipos -----	31
1.6. COMPUESTO DE INTERÉS (LISINOPRIL) -----	31
1.6.1. Nomenclatura-----	31
1.6.1.1. Nombre químico -----	31
1.6.1.2. Nombre genérico -----	32
1.6.1.3. Nombres comerciales -----	32
1.6.1.4. Número de registro CAS -----	32
1.6.2. Fórmula, estructura y peso molecular-----	32
1.6.3. Propiedades físicas -----	32
1.6.3.1. Solubilidad-----	32
1.6.3.2. Constantes de disociación -----	33
1.6.3.3. Coeficiente de partición -----	33
1.6.3.4. Espectro U.V. -----	33
1.6.4. Estabilidad -----	33
1.6.4.1. En estado sólido – térmica -----	33
1.6.4.2. En estado sólido – fotoquímico-----	34
1.6.4.3. En solución -----	34
1.6.5. Métodos de análisis-----	34
1.6.5.1. Cromatográficos en solución-----	35
1.6.5.2. Cromatográficos en fluidos biológicos -----	36
1.6.6. Farmacología -----	36
1.6.6.1. Mecanismo de acción -----	36
1.6.6.2. Farmacocinética y biodisponibilidad -----	36
1.6.6.3. Reacciones secundarias y adversas -----	37
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	38
3. OBJETIVO -----	39
4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN -----	40
5. POBLACIÓN -----	41
6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN -----	42
7. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN -----	43
8. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN -----	44
9. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	45
9.1. SUSTANCIA DE REFERENCIA -----	45
9.2. REACTIVOS Y EQUIPO -----	45
9.3. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	46

9.3.1. Diseño del Sistema Cromatográfico -----	47
9.3.2. Diseño del Procesamiento de Muestra-----	49
9.3.2.1. Extracción en fase sólida -----	49
9.3.2.1.1. Experimento 1.-----	50
9.3.2.1.2. Experimento 2.-----	50
9.3.2.2. Extracción en fase sólida en línea (cromatografía bidimensional). -----	51
9.3.2.2.1. Caracterización de tiempos de retención en diferentes guarda columnas.-----	51
9.3.2.2.2. Diseño de la cromatografía bidimensional.-----	52
9.3.2.2.2.1. Experimento 1 -----	52
9.3.2.2.2.2. Experimento 2 -----	53
9.3.2.2.2.3. Experimento 3 -----	54
9.3.2.2.2.4. Experimento 4 -----	57
9.3.2.2.2.5. Experimento 5 -----	59
9.3.3. Verificación del método.-----	61
9.3.3.1. Linealidad del método -----	61
9.3.3.2. Recobro absoluto -----	62
9.3.3.3. Precisión y exactitud. -----	63
9.3.3.4. Selectividad-----	65
10. CONCLUSIONES-----	67
11. REFERENCIAS -----	68

## RESUMEN

El presente trabajo muestra el desarrollo de un método analítico basado en cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de Lisinopril en orina humana con un intervalo de trabajo de 0.5-20  $\mu\text{g/mL}$  con detección al U.V. Durante el desarrollo se estudiaron diferentes sistemas cromatográficos y procesamientos de muestra obteniéndose finalmente uno que cumplió los requerimientos establecidos. En el método desarrollado, la muestra fue tratada inicialmente con una extracción líquido-líquido utilizando hexano para la eliminación de sustancias no polares de la matriz, desechándose la fase orgánica y la fase acuosa fue inyecta en el sistema cromatográfico bidimensional. La limpieza de la muestra se llevó a cabo en línea, utilizando una guarda columna Waters Nova-Pak Fenilo de 20\*4.6 mm de diámetro interno y la posterior elución a una columna analítica Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm de diámetro interno con detección U.V. a 206 nm. Debido a la sencillez en el tratamiento de la muestra y a la reproducibilidad mostrada, no fue necesaria la utilización de un estándar interno para amortiguar los errores durante el procesamiento.

## INTRODUCCIÓN

La falta de métodos oficiales para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos para su uso en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia, hace imperante la necesidad del desarrollo de metodologías que sean capaces de lograr una cuantificación confiable sin la interferencia de sustancias endógenas o fármacos administrados de manera concomitante. Los métodos desarrollados deben demostrar su eficacia a través de una verificación y validación. Un método validado puede aplicarse en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad, bioequivalencia, toxicológicos y en estudios de química forense.

Debido a la complejidad de las matrices biológicas y a que las concentraciones a las que se requiere cuantificar los fármacos son por lo regular del orden de microgramos, nanogramos o picogramos por mililitro, es necesaria la utilización de técnicas que permitan concentrar la muestra y eliminar las sustancias que interfieran con el método de cuantificación. Las técnicas de extracción son una opción para el procesamiento de muestra, ya que son selectivas y se tiene la opción de concentrar la muestra. Los tipos de extracción son: extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

Dentro de los métodos utilizados en la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, una de las técnicas más socorridas en la actualidad es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). por su maleabilidad en cuanto a la columna utilizada, fase móvil, detección y la posibilidad de automatización para el análisis rutinario. Estas características permite manejar un número considerable de muestras en tiempos cortos.

El desarrollo de todo método para cuantificar fármacos en fluidos biológicos debe de incluir una etapa de verificación. La etapa de verificación debe incluir experimentos de selectividad, linealidad, exactitud, precisión y recobro.

Dentro de la literatura especializada no existen métodos para cuantificar Lisinopril en orina de forma eficiente y rápida. Este trabajo se encargó de explorar las alternativas con las que se cuenta para encontrar una forma rápida y confiable de cuantificar Lisinopril en orina por CLAR.

El desarrollo del método presentado incluye las etapas de implementación del sistema cromatográfico, procesamiento de muestra y evaluación del método.

# I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

## 1.1. IMPORTANCIA DEL DESARROLLO ANALÍTICO

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

## 1.2. IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS

Hasta hace unos años, el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se aplicaba sólo a la medicina forense, pero en la actualidad las aplicaciones han crecido y se pueden encontrar en estudios de monitoreo, clínicos, evaluación de equivalencia biológica entre productos genéricos y sobre todo en el desarrollo de nuevos fármacos, desde que es una nueva entidad química, hasta que finalmente se comercializa.

De una manera sencilla, el análisis de fármacos consiste en presentar la muestra ante un dispositivo que la evaluará y posteriormente arrojará las respuestas "*que es*" y "*cuánto es*". Sin embargo, un fluido biológico no es una muestra simple, sino una mezcla muy compleja de lípidos, carbohidratos, proteínas, y otros componentes que pueden interactuar entre sí, interfiriendo con la determinación del analito, por ejemplo, elevando la respuesta, enmascarándola o alterando sus niveles debido a una degradación (factores de pH, enzimas, etc.). Es en esta situación en donde el desarrollo analítico cobra una importancia relevante para implementar métodos que sean capaces de cuantificar fármacos de una manera confiable.

La importancia de la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos se puede dividir en dos grandes aplicaciones:

- cuando éste se encuentra en la etapa de comercialización (en uso)
- cuando éste se encuentra en las etapas de investigación y desarrollo.<sup>1</sup>

### 1.2.1. Fármacos en etapa de comercialización

- Toxicología forense
- Sobredosificación
- Monitoreo de fármacos

### 1.2.2. Fármacos en investigación y desarrollo

- Farmacología
- Toxicología

- Pruebas clínicas de fase I
- Metabolismo
- Farmacocinética
- Desarrollo de formulaciones
- Pruebas clínicas de fase II
- Farmacodinamia
- Bioequivalencia

### 1.3. FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Como ya se mencionó, un fluido biológico es una mezcla compleja de una multitud de componentes, que pueden reaccionar entre sí o con nuestro compuesto de interés y originar interferencias que pueden enmascarar o aumentar su respuesta. Los fluidos biológicos en los que generalmente se cuantifican los fármacos de interés, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tipos de matrices biológicas.<sup>1</sup>

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

La selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos depende directamente de la farmacocinética del analito, ruta de eliminación, capacidad para unirse a proteínas y de los alcances del método. Para los estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia se utilizan la sangre como primera opción de fluido biológico; el componente de ésta a emplear depende de la afinidad del analito por componentes celulares o proteicos.

- Se utiliza sangre total cuando el analito presenta alta afinidad o permeabilidad a las membranas celulares de eritrocitos, linfocitos, etc.
- El plasma se utiliza cuando el analito presenta alta afinidad por proteínas plasmáticas.
- El suero se utiliza cuando el analito no presenta ni afinidad por células ni por proteínas.

Otro fluido biológico comúnmente utilizado en estudios de farmacocinética, y bioequivalencia es la orina. Esta es utilizada cuando la eliminación renal del fármaco inalterado es de cuando menos el 50%.<sup>2</sup>

### **1.3.1. Sangre**

Es una de las matrices más complejas. Consiste en un fluido amortiguado que contiene proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Las células rojas son el principal componente de la sangre y pueden ser separadas del componente líquido por simple centrifugación.

En general existen cuatro tipos de muestras que se pueden derivar de una muestra de sangre: sangre total, suero, plasma y fracción libre de proteínas.

Al analizar sangre total, los componentes celulares de la sangre deben ser lisados para que su contenido pueda formar una mezcla homogénea con la porción fluida de la sangre. Las células pueden ser lisadas utilizando ultrasonido o congelando las muestras por un tiempo y someténdolas a ultrasonido posteriormente.<sup>1</sup>

### **1.3.2. Suero**

Este puede obtenerse a partir de la coagulación y posterior centrifugación de la sangre total, eliminando de esta forma las células y factores de coagulación presentes.

La principal característica del suero es la presencia de grandes cantidades de proteínas.

### **1.3.3. Plasma**

Es obtenido a partir de la centrifugación de sangre total a la que se le ha adicionado un anticoagulante. El plasma es suero que contiene fibrinógeno y factores de coagulación.<sup>1</sup>

### **1.3.4. Fracción libre de proteínas.**

Es la porción de la sangre que queda después de que los componentes celulares y las proteínas plasmáticas han sido eliminados. Esta fracción contiene sustancias que no están unidas a proteínas plasmáticas y puede obtenerse mediante ultrafiltración.

### **1.3.5. Orina**

Esta, a diferencia del suero o plasma, generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos. La orina es una mezcla constituida por sustancias solubles en agua. El rango de pH en el que se encuentra la orina es amplio ya que se trata de un fluido no amortiguado. El pH de la orina depende en gran medida de la dieta. La mayoría de los fármacos son solubles en disolventes orgánicos por lo tanto, pueden extraerse directamente de la orina. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puede excretar en un intervalo de tiempo fijo, es importante la cantidad de fármaco excretada y no la concentración.<sup>1</sup>

## 1.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS

En los últimos años, los laboratorios analíticos se han preocupado por realizar análisis más rápidos y a un menor costo. Este aspecto recae sobre todo en la preparación de la muestra la cual, ocupa más del 60% del tiempo del análisis, en comparación con el 7% que ocupa en realidad la medición de sus componentes.

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

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

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

### 1.4.1. Precipitación de proteínas

Los constituyentes más abundantes en el plasma y suero son las proteínas y es recomendable su eliminación, para evitar que su presencia interfiera en la cuantificación del analito. El primer paso en el procesamiento del suero o plasma es la obtención de una solución acuosa libre de proteínas. La fracción libre de proteínas puede ser analizada o ser sometida a otros procesos de extracción. La Tabla 2 presenta las principales formas para precipitar proteínas.

La desnaturalización de proteínas previa a la extracción no debe de considerarse una regla general: aunque los fármacos pueden estar firmemente unidos a proteínas plasmáticas, esta unión es reversible, por lo que a un pH adecuado la muestra puede ser extraída con un disolvente orgánico.<sup>1</sup>

**Tabla 2.** Métodos de precipitación de proteínas utilizados.<sup>1</sup>

<b>Desnaturalización y precipitación de proteínas presentes en suero y plasma para el análisis de fármacos</b>	
<b>Método</b>	<b>Comentario</b>
Calentamiento a 90°C por 5-10min.	No es muy eficiente y no se recomienda para analitos termolábiles.
Ciclos de congelación-descongelación.	No es muy eficiente y consume mucho tiempo.
Saturación con sulfato de amonio.	Eficiencia moderada. pH al final de la precipitación de 7. alta concentración de sales en el sobrenadante.
Sulfato de zinc/hidróxido de sodio.	Excelente eficiencia. pH al final de precipitación de 7. Puede llevarse a cabo a temperaturas bajas.
Ácido metafosfórico	Excelente eficiencia. el pH ácido puede descomponer a la sustancia de interés.

### Continuación de la Tabla 2. Métodos de precipitación de proteínas utilizados.<sup>1</sup>

Ácido perclórico.	Excelente eficiencia, el pH puede descomponer a la sustancia de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.
Ácido tricloroacético	Buena eficiencia, el reactivo debe de permanecer frío y puede resultar difícil remover la sustancia de interés.
Etanol	Se requiere de dos volúmenes para una desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido.
Acetonitrilo	Se requiere de 1.5 volúmenes para desnaturalización completa; es útil para fármacos inestables a pH ácido.
Cloruro de aluminio	Es mejor que el sulfato de amonio para compuestos básicos

#### 1.4.2. Extracción líquido-líquido

En su forma más simple (en el caso donde las dos fases son líquidas), extracción significa la transferencia de un soluto de una fase a otra.

Consideremos una mezcla de dos fases, en la que una fracción de los dos disolventes y el analito se encuentra en ambas fases, pero una fase está constituida principalmente por agua y la otra por un disolvente orgánico. Los volúmenes de cada fase no son exactamente iguales a los volúmenes que se mezclaron pero para simplificar se supondrá que los volúmenes de cada fase no cambiaron con la agitación.<sup>3</sup>

Solubilidad en la fase acuosa:

$$[F1] = \frac{\text{mol F1}}{\text{vol F1}}$$

Solubilidad en la fase orgánica:

$$[F2] = \frac{\text{mol F2}}{\text{vol F2}}$$

el coeficiente de partición o reparto es:

$$K_p = \frac{F2}{F1}$$

Esta constante se puede obtener de la literatura o experimentalmente.

Si "p" es la proporción de analito que se encuentra en la fase orgánica y "q" es la proporción de analito que se encuentra en la fase acuosa entonces las moles totales son:

$$n_{\text{tot}} = (p * n) + (q * n)$$

$$1 = p + q$$

las moles en la fase orgánica son:

$$p = 1 - q$$

por lo tanto:

$$Kp = \frac{\frac{n_2}{v_2} * (1 - q)}{\frac{n_1}{v_1} * q}$$

Al despejar q:

$$q = \frac{v_1}{v_1 - (Kp * v_2)}$$

en la ecuación anterior se observa que la fracción de soluto remanente depende del coeficiente de reparto y de los volúmenes de las dos fases. Si se realiza una segunda extracción la ecuación se convierte en:

$$q * q = \left( \frac{v_1}{v_1 - (Kp * v_2)} \right)^2$$

por lo tanto si se realizan múltiples extracciones la ecuación general será:

$$q = \left( \frac{v_1}{v_1 - (Kp * v_2)} \right)^n$$

#### 1.4.2.1. Efecto del pH

Supóngase que el soluto que va a repartirse entre las fases 1 "y" 2 es una amina con una constante de basicidad (Kb). Supóngase además que la amina protonada (BH<sup>+</sup>) es soluble solo en la fase acuosa (1). Supóngase finalmente que el coeficiente de reparto entre las dos fases de la forma neutra, B, es igual a Kp. El coeficiente de distribución se define como:

$$D = \frac{\text{concentración total en la fase 2}}{\text{concentración total en la fase 1}}$$

Por lo tanto:

$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$

Al combinar las relaciones

$$Kp = \frac{[B]_2}{[B]_1} \quad \text{y} \quad Ka = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]} = \frac{Kw}{Kb}$$

Sustituyendo las relaciones en la ecuación anterior tenemos:

$$D = \frac{Kp * Ka}{Ka + [H^+]} = Kp * \alpha_{\text{neutra}}$$

Donde  $\alpha_{\text{neutra}}$  es la fracción de la base débil en la forma neutra, B.<sup>3</sup>

#### 1.4.3. Extracción en fase sólida

En el pasado, la extracción líquido – líquido ocupó un papel importante en la extracción de fármacos de los fluidos biológicos. Sin embargo, el recobro de los analitos tiende a ser incompleto. Otro inconveniente es que la técnica es lenta y laboriosa. Por estas razones, el uso y la popularidad de la extracción en fase sólida o EFS, (SPE o Solid Phase Extraction) ha ido creciendo rápidamente.

La extracción en fase sólida se basa en la separación de los componentes de una mezcla por la diferencia en la velocidad de migración de las moléculas de los componentes a través de la fase estacionaria. Esto inmediatamente nos remite a pensar en la cromatografía, lo cual es correcto, ya que la extracción en fase sólida se trata de una cromatografía en columna. Por lo tanto la extracción en fase sólida se ve influenciada por las mismas variables que afectan a la cromatografía.

En la actualidad los empaques han sufrido una evolución, producto de la necesidad de tener recobros más reproducibles y un rango más grande de selectividad.

Los tipos de empaque empleados en la extracción en fase sólida son:

- Fase normal
- Fase reversa

- Intercambio iónico

La EFS puede usarse de dos maneras en la preparación de muestras:

- En la primera, los analitos de interés se retienen en el material de empaque y la muestra con la mayoría de los componentes no deseados, pasan por el empaque sin ser retenidos. Los componentes no deseados retenidos son eliminados selectivamente mediante lavados. Finalmente los analitos de interés son eluidos con un pequeño volumen del disolvente apropiado.
- En la segunda manera, la muestra pasa por el medio de separación para la EFS y los analitos de interés pasan por el adsorbente, sin ser retenidos. Los contaminantes se quedan en el empaque y pueden ser desechados.

La primera estrategia es empleada cuando el componente de interés presenta bajos niveles, o existen múltiples componentes que desean aislarse y presentan polaridades diferentes. Esta manera también es empleada para el enriquecimiento de muestras que tienen trazas de compuestos y para la concentración de muestras diluidas. La segunda estrategia se elige cuando el componente de interés se presenta en altas concentraciones.

En cualquiera de los casos, el adsorbente debe ser primero acondicionado con un disolvente apropiado. Después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del adsorbente y las impurezas (interferencias) son desorbidas con un solvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el solvente apropiado. De manera general para una extracción completa son necesarios 4 pasos.

#### **1.4.3.1. Acondicionamiento de los cartuchos de extracción.**

Se refiere al tratamiento del material de soporte con un disolvente orgánico. Por ejemplo metanol o acetonitrilo. Esto hace que las cadenas de hidrocarburos de las fases modificadas se solvaten y permitan una superficie activa que sea accesible al analito y que éste requiere para que la adsorción sea reproducible. El exceso del solvente orgánico se retira usando agua o alguna solución reguladora de pH.

#### **1.4.3.2. Aplicación de la muestra.**

La muestra en solución se hace pasar (ya sea con ayuda de vacío, presión o por centrifugación) a través del cartucho de extracción. El analito se concentra en una zona muy delgada sobre el adsorbente. Ciertos componentes indeseables y más solubles en la matriz no son adsorbidos o pasan a los desechos.

#### **1.4.3.3. Paso de limpieza (lavado)**

Los otros componentes indeseables (que son retenidos), se lavan del adsorbente usando un pequeño volumen de agua, solución amortiguadora, o mezclas de agua metanol, solución amortiguadora /metanol según sea el caso, procurando mantener al analito en el adsorbente.

#### **1.4.3.4. Elución y recuperación del analito preparado.**

En el último paso de la extracción en fase sólida, el analito se eluye del adsorbente, empleando un disolvente adecuado, quedando de esta forma disponible para el análisis, previa dilución o concentración. El disolvente se debe escoger de manera que la interacción analito-adsorbente sea rota y haya transferencia de aquel al eluyente. Por tanto, enlaces muy fuertes, ya sea de las interferentes o de los analitos con el adsorbente, harán que ciertos compuestos permanezcan sobre éste. El detallado conocimiento que se tenga del analito, respecto a su solubilidad, polaridad y lipofiliidad (coeficiente de distribución, etc.) es la base para la selección del eluyente. La selección se hace más fácil utilizando "la secuencia eluotrópica" de disolventes, para estimar la fuerza de elución, de acuerdo con el analito que se va a extraer.

De acuerdo con sus características antes expuestas, la extracción en fase sólida (EFS) es una alternativa más fácil, económica y rápida que la extracción líquido - líquido, que es el método tradicional empleado para la concentración de muestras. Los métodos de EFS reducen significativamente el volumen necesario de solventes orgánicos clorados y no clorados comúnmente necesarios para la preparación de la muestra. Adicionalmente en el mercado se ofrecen diferentes alternativas de empaques, que permiten un gran número de posibilidades de trabajo para cualquier sistema matriz-analito, además de ofrecer la posibilidad de automatización del proceso, a través de diseño de extracción en fase sólida "en línea".<sup>4</sup>

#### **1.4.3.5. Extracción en fase sólida en línea**

La extracción en fase sólida en línea es una herramienta analítica que al ser implementada de manera adecuada, es capaz de reducir considerablemente los tiempos de procesamiento de muestra. Además de que aumenta la precisión de los métodos, aprovechando la gran reproducibilidad de los sistemas de inyección actuales y minimizando la manipulación de la muestra.

El sistema de extracción en línea más simple se compone de una columna analítica y una guarda columna (en este caso se trata de una versión más corta de la columna analítica). Las guarda columna se colocan antes de la columna analítica para protegerla de las sustancias de la matriz que pueden contaminar la columna analítica: esto es posible ya que al contener el mismo tipo de empaque, las sustancias tendrán el mismo tipo de interacción que con la columna analítica, de esta forma cualquier especie presente en la muestra que se ligaría irreversiblemente a la columna analítica será retenida por la guarda columna y nunca alcanzará la columna analítica. La ventaja de utilizar una guarda columna es que el costo de ésta es mucho más bajo que el de una columna analítica.

Una forma más compleja de extracción en línea se lleva a cabo realizando cambios de columna mediante la utilización de válvulas (cromatografía bidimensional). En la cromatografía bidimensional, la válvula cambia de posición en periodos de tiempo preestablecidos para el cargado de la muestra y elución. Las válvulas pueden ser manuales o automatizadas. La cromatografía bidimensional se utiliza principalmente para realizar la

limpieza de la muestra, aunque también se puede utilizar para concentrar al analito de interés.

Un sistema de cromatografía bidimensional se compone principalmente de:

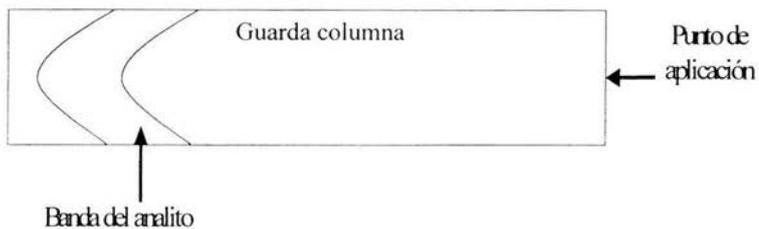
- Un inyector
- Dos sistemas de bombeo
- Una válvula de al menos 6 vías y dos posiciones
- Una columna analítica
- Una guarda columna (columna de lavado o enriquecimiento).
- Un detector
- Un sistema de recolección de datos

Cuando la cromatografía bidimensional es utilizada para realizar la limpieza de la muestra se divide en cuatro etapas:

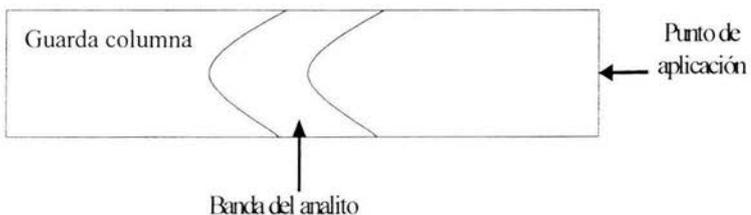
- Cargado de muestra. En esta etapa la muestra es introducida en la guarda columna por el sistema de inyección.
- Lavado de muestra. Durante esta etapa, los componentes indeseables de la matriz se lavan de la guarda columna (son enviados a desechos) mientras que el analito es retenido. Es recomendable utilizar una fase móvil con bajo poder de elución para mantener al analito en la guarda columna.
- Elución. En esta etapa la válvula cambia de posición y el analito es enviado a la columna analítica mediante la acción de una fase móvil con mayor poder de elución. El tiempo empleado para esta etapa es crítico, ya que si es demasiado corto, el recobro será incompleto y si es demasiado largo, se corre el riesgo de introducir sustancias que afecten el desempeño de la columna analítica con el paso del tiempo.
- Equilibrio. En esta etapa la columna y la guarda columna son regresadas a las condiciones iniciales para su acondicionamiento.

Cuando la cromatografía bidimensional es utilizada para limpieza de muestra, la técnica se conoce como corte en zona. Haciendo una analogía con la destilación, existen tres diferentes tipos de corte en zona<sup>5</sup>:

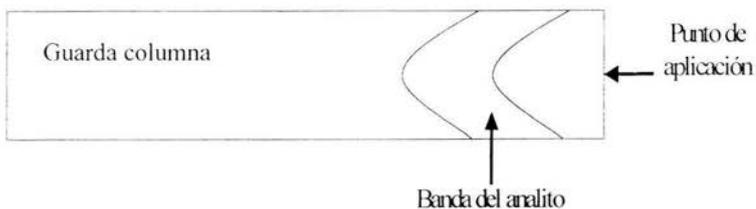
- Corte al frente. En éste la válvula se conmuta cuando la zona que contiene al analito se encuentra en la parte mas alejada del punto de aplicación de la guarda columna (ver Figura 1).
- Corte del corazón. Se denomina así cuando la válvula se conmuta al encontrarse la banda del analito en la parte media de la guarda columna (ver Figura 2).
- Corte de cola. Es cuando la válvula se conmuta al encontrarse la banda del analito cerca del punto de aplicación de la guarda columna (ver Figura 3).



**Figura 1.** Donde se muestra el esquema del corte al frente



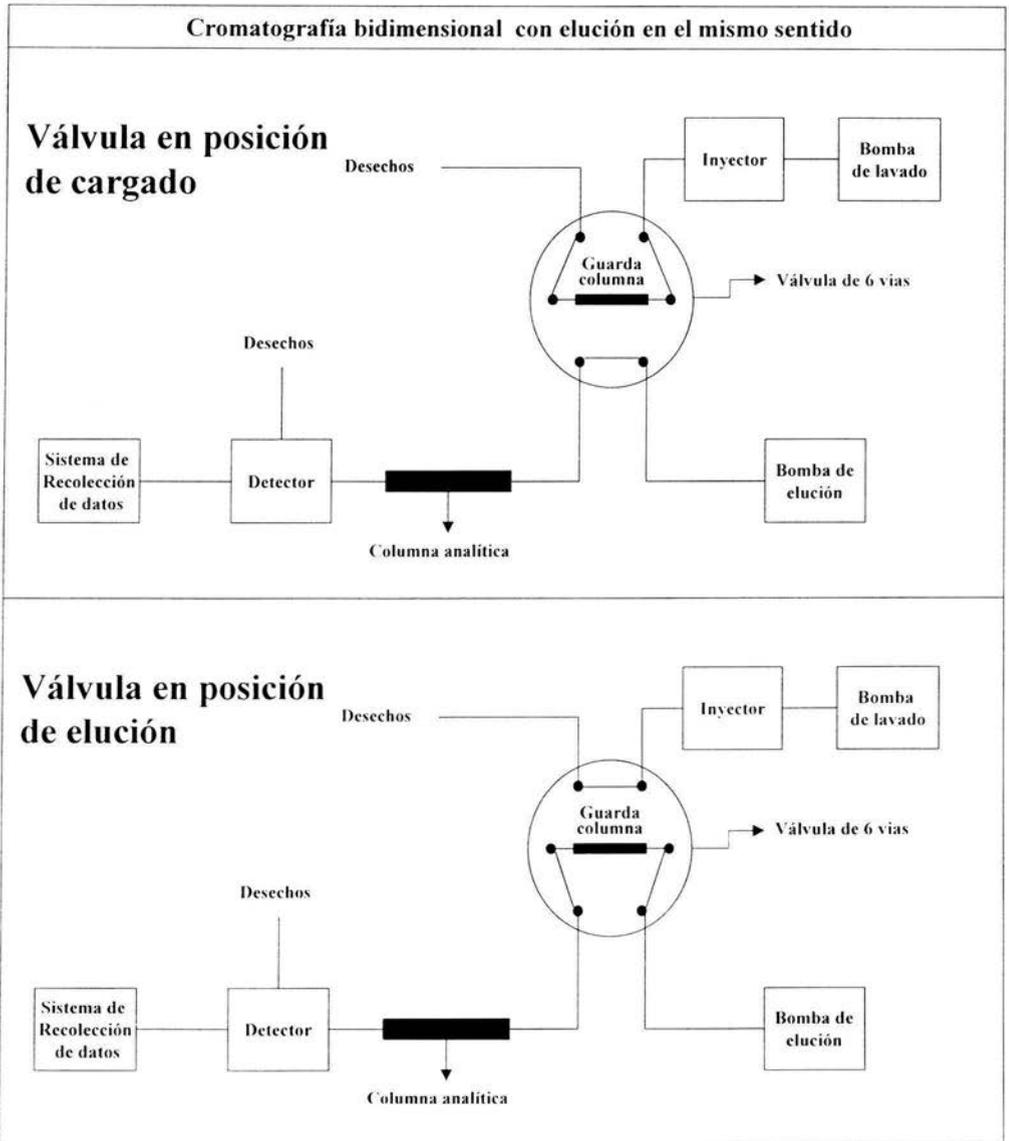
**Figura 2.** Donde se muestra el esquema del corte del corazón



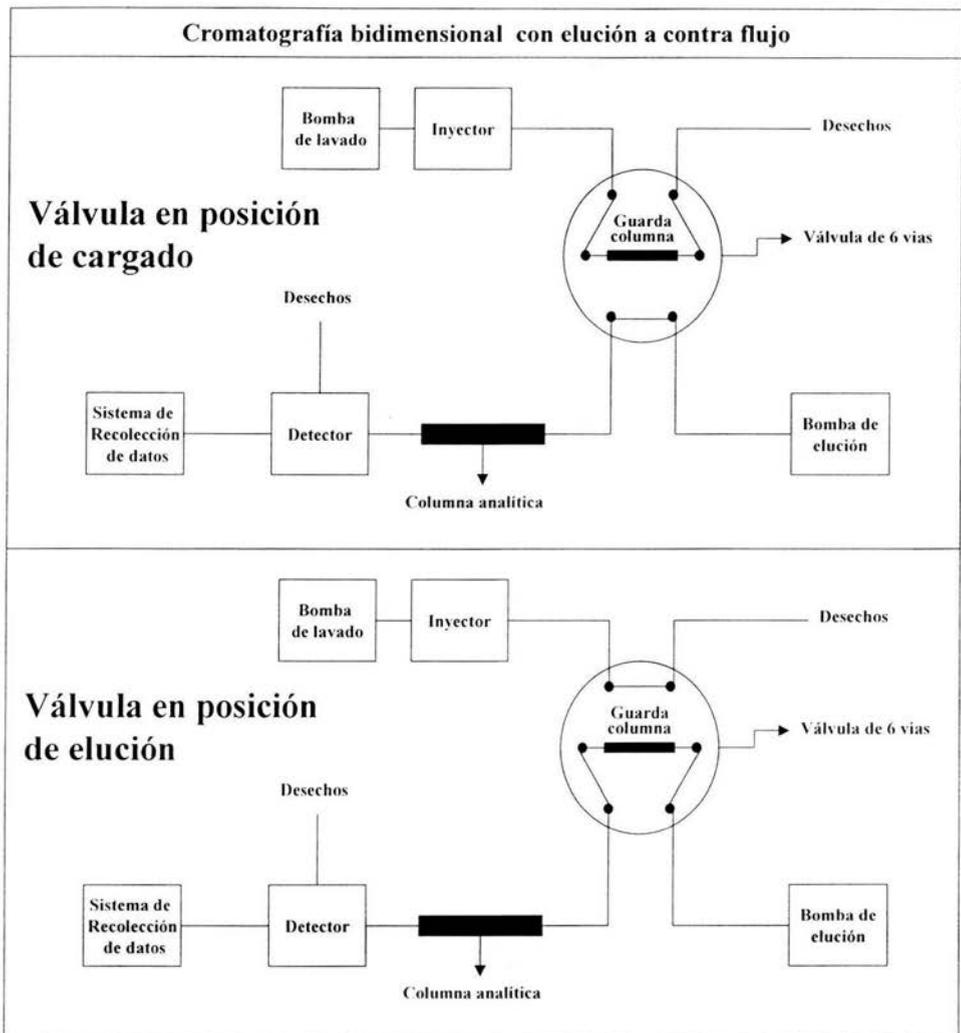
**Figura 3.** Donde se muestra el esquema del corte de la cola

Existe otro tipo de clasificación de la cromatografía bidimensional de acuerdo a la disposición de los componentes de sistema y al sentido de la elución:

- Cromatografía bidimensional con elución en el mismo sentido (ver Figura 4).
- Cromatografía bidimensional con elución a contra flujo (ver Figura 5).



**Figura 4.** Cromatografía bidimensional con elución en el mismo sentido.



**Figura 5.** Cromatografía bidimensional con elución a contra flujo.

Cuando el objetivo es concentrar al analito de interés, la guarda columna es llamada columna concentradora; para este fin, se hace pasar una cantidad de muestra mientras el analito es retenido en la columna concentradora y los componentes de la matriz son desviados a desechos; una vez que se ha conseguido una cantidad de analito suficiente, la válvula conmuta el flujo y una fase móvil eluye al analito a la columna analítica.

La cromatografía bidimensional requiere de cuidados especiales ya que se trata de un sistema más complejo; en este tipo de sistema es muy importante filtrar y desgasificar las fases móviles para evitar la formación de burbujas y los taponamientos por partículas. La

filtración debe de realizarse también a las muestras. Es necesario que el analito presente tiempos de retención reproducibles con diferentes lotes de guarda columnas. Debe evaluarse el tiempo de vida de las guarda columnas y verificar que sea reproducible de lote a lote para evitar pérdidas de tiempo innecesarias. Es necesario también realizar una limpieza del sistema general de forma regular.

La cromatografía bidimensional como todas las técnicas tiene sus ventajas y desventajas, las cuales son presentadas en la Tabla 3.<sup>5</sup>

**Tabla 3.** Tabla de ventajas y desventajas de técnicas por cromatografía bidimensional para limpieza de muestra.

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Mínima manipulación de muestra	Se requiere de equipo adicional como columnas adicionales, sistemas de bombeo y válvulas
Procesamiento de muestra en línea	
Reducción considerable de tiempo de procesamiento de muestra	Se requiere de fases móviles compatibles
Posibilidad de automatización total	Se necesita cambiar periódicamente la guarda columna
Alta precisión y exactitud	
Mejoras en la selectividad por combinación de diferentes tipos de empaques y tipos de cromatografía	
Menor consumo de disolventes orgánicos	
Protección de analitos fotolábiles	

### 1.5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Pocos métodos aplicados al análisis químico son realmente específicos para un analito en particular y se torna más complicado cuando el analito de interés tiene que ser separado de una matriz compleja. Una herramienta muy poderosa y útil en éste tipo de casos es la cromatografía.

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

La palabra cromatografía (*kromatos*, color y *graphos*, escrito) fue utilizada por vez primera por el botánico ruso M. Tswett en 1906 para designar una técnica empleada por él

para separar pigmentos vegetales; hizo pasar por una columna de vidrio, rellena de carbonato cálcico, un extracto de hojas verdes en éter de petróleo, adicionando posteriormente el disolvente puro por la parte superior de la columna obtuvo una serie de bandas horizontales diversamente coloreadas, debido a la diferencia de adsorción por el carbonato cálcico de los colorantes de la planta. Actualmente se sabe que la separación no está condicionada por el color, sin embargo, se sigue utilizando el nombre de cromatografía por motivos históricos.

En la separación de pigmentos realizada por Tswett, la fase estacionaria es el relleno de carbonato cálcico, el éter de petróleo es la fase móvil y los pigmentos los componentes a separar que se encuentran sometidos a dos fuerzas contrarias: el disolvente tiende a arrastrar a los componentes hacia la salida de la columna y el carbonato cálcico, adsorbiéndolos, tiende a retenerlos; como estos efectos son de diferente intensidad para los distintos pigmentos, el resultado es que se desplazan a distinta velocidad por la columna, pudiendo llegar a separarse.<sup>6</sup>

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

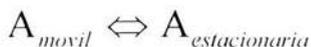
La migración diferencial en la CLAR es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil hacia un detector donde se registra la señal generada, esta señal es transmitida después a un sistema de recolección de datos donde se genera un cromatograma. En el cromatograma obtenido se observa el tiempo de retención característico para las condiciones empleadas. El cromatograma resultante puede ser empleado para determinar la concentración del analito.

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

### **1.5.1. Parámetros cromatográficos**

La distribución del analito entre las fases puede ser descrita de una manera muy simple. Un analito está en equilibrio entre las dos fases.

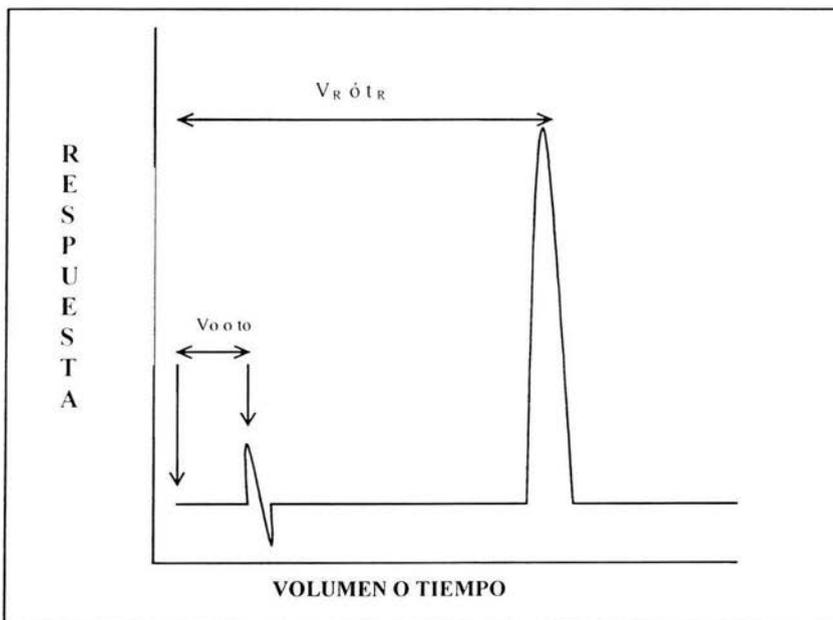
Distribución del analito entre las fases:



La constante de equilibrio,  $K$ , es llamada coeficiente de partición, definido como la concentración molar del analito en la fase estacionaria dividida entre la concentración molar del analito en la fase móvil.

El tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene la máxima altura del pico que corresponde al analito cuando es detectado al final de la columna es el denominado Tiempo de Retención ( $t_R$ ) y por consiguiente, el volumen de fase móvil necesario para eluir el centro de esa banda cromatográfica se denomina Volumen de Retención ( $V_R$ ). Idealmente, cada analito en una muestra tendrá un tiempo de retención diferente.

El tiempo que se requiere para que la fase móvil pase a través de la columna se denomina Tiempo Muerto ( $t_0$ ). Se determina indirectamente considerando el tiempo que tarda en eluir un compuesto no retenido por el sistema cromatográfico. El volumen que la fase móvil ocupa en la columna se denomina Volumen Muerto ( $V_0$ ) ver Figura 6.



**Figura 6.** Donde se muestra de manera esquemática el concepto de tiempo de retención y tiempo muerto.

El término llamado Factor de Retención o Factor de Capacidad ( $k'$ ), es frecuentemente utilizado para describir la relación entre la cantidad de sustancia en la fase estacionaria y la fase móvil. Está relacionado con el coeficiente de partición del soluto y a diferencia del tiempo de retención, es un parámetro que no se ve influido por cambios en la velocidad de flujo o en el tamaño de la columna. Se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$  y  $t_0$  se obtienen fácilmente de un cromatograma. Un valor ideal para  $k'$  se encuentra entre 2 y 20, cuando el factor de capacidad de un analito es menor a uno, significa que su elución es tan rápida que la determinación exacta de este parámetro es muy difícil, en cambio altos factores de capacidad (superiores a 20) implican que la elución toma un tiempo muy largo, y por consecuencia se corre el riesgo de tener picos demasiado anchos en su base y difíciles de detectar, además de tener tiempos de corrida demasiado prolongados.

También se define la Selectividad o Factor de Separación ( $\alpha$ ), la cual describe la separación de dos especies A y B:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Si el valor de  $\alpha$  es 1, las dos especies no se resuelven, si  $\alpha > 1$  indica que los dos picos están resueltos.

Para obtener separaciones óptimas, es fundamental lograr picos cromatográficos agudos y simétricos. Esto significa que el ancho de la banda cromatográfica debe ser lo más angosta posible. De esto se deriva que sea importante medir la eficiencia de la columna. Idealmente, los picos cromatográficos presentan un comportamiento similar a una campana de Gauss, pero en la práctica, la mayoría de los picos presentan alguna desviación a este comportamiento, siendo una de las más comunes la que se denomina como Coleo (T). Hay que puntualizar que cuando el ancho de la base del pico aumenta, indica que más de un mecanismo de retención se está presentando, lo cual no es deseable. Al igual que otros parámetros cromatográficos, existen diversas maneras de calcular la simetría de un pico y cuando la asimetría de éste es mínima, las diferencias en los resultados de las diferentes formas de calcular la simetría son casi imperceptibles.<sup>7</sup>

### **1.5.2. Teorías del fenómeno de separación cromatográfica.**

La cromatografía moderna se fundamenta principalmente en dos teorías desarrolladas a mediados del siglo XX cada una de las cuales tienen sus ventajas y limitantes.

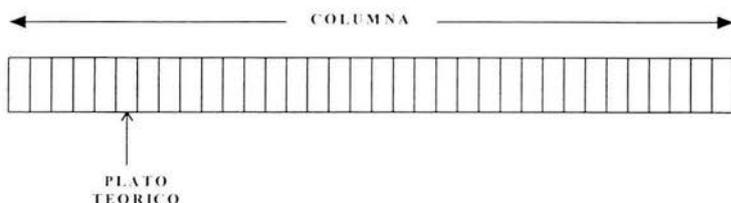
#### **1.5.2.1. Teoría de platos**

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

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

El modelo del plato teórico supone que la columna cromatográfica consiste de un número de capas separadas llamadas platos teóricos. En estos "platos" ocurren equilibrios independientes de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. El analito se mueve a

través de la columna debido a equilibrios de transferencia entre la fase móvil y el próximo plato (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática del plato teórico.

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

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

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

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

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2$$

Donde  $W_{0.5}$  es la distancia que se mide entre las líneas del pico a una altura del 50% del máximo.

Como se puede deducir de la explicación anterior, el desempeño de las columnas está directamente relacionado con el número de platos teóricos, es decir entre menor sea la altura del plato teórico, mayor será el número de ellos y por lo tanto la eficiencia será mayor.<sup>7</sup>

### 1.5.2.2. Teoría de la velocidad (teoría cinética)

Propuesta por J.J. Van Deemter en 1956 considera la dinámica de la separación.

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

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

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

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

#### 1.5.2.2.1. Difusión de remolino

La difusión de remolino corresponde al término "A" de la ecuación de Van Deemter. La fase móvil se desplaza a través de la columna, la cual está empacada con la fase estacionaria. Las moléculas de analito tomarán distintas trayectorias (de manera aleatoria) a través de la fase estacionaria. Esto tiene como consecuencia que la banda se ensanche debido a que las distintas trayectorias son de diferente longitud.

Este parámetro está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.<sup>7</sup>

#### 1.5.2.2.2. Difusión Longitudinal

La difusión longitudinal corresponde al término "B" de la ecuación de Van Deemter. La concentración del analito es menor al final de la banda que en el centro y esto se debe a que las moléculas del analito tienden a migrar desde la porción central concentrada de la banda, a las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este fenómeno ocurre tanto en la fase móvil como en la estacionaria, y su magnitud es inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, es decir, si la velocidad de la fase móvil es alta, los efectos de la difusión longitudinal decrecen.<sup>7</sup>

#### 1.5.2.2.3. Resistencia a la transferencia de masa

La resistencia a la transferencia de masa se conoce también como el término "C" de la ecuación de Van Deemter. Al analito le toma un cierto tiempo alcanzar el equilibrio entre las fases, por lo tanto si la velocidad de la fase móvil es alta, no se logran verdaderos

estados de equilibrio y el analito que está relativamente distante de la fase estacionaria, tenderá a desplazarse más rápido, lo que contribuye a que la banda cromatográfica se ensanche, sobre todo cuando la velocidad de la fase móvil es alta.<sup>7</sup>

Con la ecuación de Van Deemter se obtiene una gráfica que relaciona la altura del plato teórico (H) con el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil (Figura 8).<sup>7</sup>

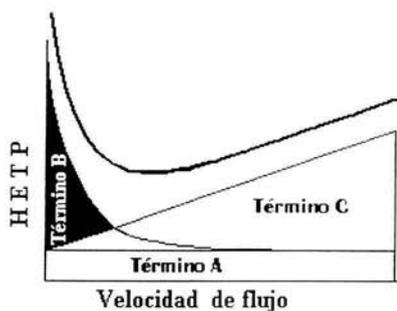


Figura 8. Gráfico típico de Van Deemter.

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

### 1.5.2.3. Resolución

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

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

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

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

$$R = \frac{N'}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

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

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

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

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

Los conceptos antes revisados son los más empleados en cromatografía porque describen cómo es que ocurre el proceso de separación y las condiciones que pueden ser manipuladas para obtener separaciones óptimas y con tiempos de elución mínimos.<sup>7</sup>

### **1.5.3. Tipos de cromatografía**

En cromatografía, los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil a través de la fase estacionaria. Cada especie sufre un retardo distinto en su transporte debido a varios tipos de interacciones:

- Adsorción en la superficie
- Solubilidad
- Carga

En la Tabla 4, se presentan los cuatro principios de separación en la técnica de cromatografía de líquidos; generalmente se presenta uno u otro, de acuerdo con el fenómeno que propicie la retención de las moléculas en la fase estacionaria.

**Tabla 4.** Clasificación de los principios de separación cromatográficos.

<b>Tipo de Cromatografía</b>	<b>Fase Móvil</b>	<b>Fase Estacionaria</b>	<b>Principio de la separación</b>
<b>Líquido / líquido</b>	Líquido	Líquido	Cromatografía de partición
<b>Sólido / líquido</b>	Líquido	Sólido	Cromatografía de adsorción
			Cromatografía de exclusión molecular
			Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía se puede dividir de acuerdo al tipo de separación.

- Elución
- Análisis por desplazamiento
- Análisis frontal

En la separación por elución el soluto sufre un fenómeno de partición entre las dos fases. La separación se fundamenta en la retención relativa de la sustancia de interés.

En el análisis por desplazamiento los materiales se mueven a través de la columna al ser desplazados por una sustancia con mayor retención.

En el análisis frontal las muestras se adicionan de manera constante a la columna y los componentes se analizan conforme eluyen, uno de los ejemplos es la filtración a través de carbono. Se utiliza principalmente para evaluar la retención relativa y no para la separación de mezclas.<sup>7</sup>

#### **1.5.4. Aplicación**

En la actualidad las aplicaciones de la cromatografía de líquidos de alta resolución son tan amplias que sería difícil no encontrar una rama de la química y de las ciencias de la vida en general en la que no se incluya esta técnica, ya sea con fines preparativos, de identificación o de cuantificación.

Debido a las cualidades de esta técnica, se puede emplear en la investigación para la identificación, purificación y cuantificación de sustancias nuevas, análisis de compuestos puros, formas farmacéuticas, análisis de alimentos, industria metalúrgica, análisis de productos biotecnológicos, secuenciación de proteínas y una cantidad innumerables de aplicaciones de carácter cualitativo y cuantitativo en las ciencias forenses.

### **1.5.5. Equipo<sup>8</sup>**

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

#### **1.5.5.1. Bombas**

Los requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo son:

- Producir presiones estables hasta un máximo de 6000 psi.
- Mantener el flujo libre de pulsaciones
- Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 mL/min)
- Controlar de manera reproducible el flujo de disolvente
- Resistir la corrosión

##### **1.5.5.1.1. Clasificación de las bombas utilizadas en CLAR**

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

###### **1.5.5.1.1.1. Según la velocidad del disolvente**

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

- Micro bore (1- 250  $\mu$ L/min)
- Standard bore ( 100  $\mu$ L/min - 10 mL/min)
- Preparativa (> 10 mL/min)

###### **1.5.5.1.1.2. Según el tipo de material**

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

- Metálicas
- No-Metálicas

###### **1.5.5.1.1.3. Según el mecanismo de desplazamiento**

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

- Mecánicas
- Recíprocas
- De desplazamiento continuo o de jeringa
- Neumáticas

### **1.5.5.1.2. Programación de introducción del disolvente**

Existen dos métodos de programación de disolvente en CLAR:

- Isocrático
- Gradiente de elución

Gradiente de elución es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de una corrida analítica. Pueden efectuarse de dos maneras: a baja presión y a alta presión

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se deben tener presente dos objetivos: obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible y asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir 5 pasos fundamentales:

- Determinar la composición inicial y final del solvente
- Ajustar el tiempo del gradiente
- Determinar la forma de la curva del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- Regresar la columna a las condiciones iniciales para la siguiente inyección

### **1.5.5.2. Sistemas de Inyección de muestra**

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

### **1.5.5.3. Columnas y Fases Estacionarias**

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

#### **1.5.5.3.1. Componentes de una Columna**

Básicamente la columna consta de dos elementos:

##### **1.5.5.3.1.1. Material de Empaque**

Durante la evolución de los materiales de empaque se han realizado mejoras en dos sentidos: la primera basada en la naturaleza química de la partícula y la segunda basada en las características físicas de la partícula.

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

#### **1.5.5.3.1.2. Contenedor del Empaque**

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

#### **1.5.5.4. Detección**

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

Los tipos de detectores en CLAR se clasifican en:

- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. Ejemplo: Detector de Índice de Refracción
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta

Los detectores más utilizados en CLAR son:

##### **1.5.5.4.1. Detector UV**

Hay básicamente tres tipos:

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

##### **1.5.5.4.2. Detector de Índice de Refracción.**

Se han diseñado muchos modelos de detectores de índice de refracción para CLAR, pero en la actualidad solamente existen dos tipos:

- Tipo Deflexión
- Tipo Fresnel

#### **1.5.5.4.3. Detector de Fluorescencia.**

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

#### **1.5.5.4.4. Detector de Fluorescencia Inducida por Láser**

Los detectores de Fluorescencia Inducida por láser se clasifican según:

- La Fuente de Excitación
- El sistema óptico

#### **1.5.5.4.5. Electroquímicos**

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

##### **1.5.5.4.5.1. Pueden ser clasificados en tres tipos**

- Detector Amperométrico
- Detector Conductimétrico
- Detector Potenciométrico

Se deben tener algunas precauciones con los detectores electroquímicos para asegurar análisis reproducibles:

- Verificar que la bomba, el detector y registrador (integrador) estén conectados adecuadamente a tierra.
- Usar bombas reciprocantes
- Mantener en todo momento el flujo de la fase móvil en el detector.
- Operar con el voltaje adecuado
- Monitorear la altura de los picos para observar cambios en la eficiencia que nos indique la necesidad de reacondicionar los electrodos.
- Tener electrodos de referencias extras en solución 3M de NaOH y reemplazar el electrodo de referencia en la celda 1 ó 2 veces a la semana.
- Desconectar el detector electroquímico cuando se esté lavando la columna
- Utilizar agua, soluciones amortiguadoras y disolventes orgánicos de alta pureza.

## **1.6. COMPUESTO DE INTERÉS (LISINOPRIL)**

### **1.6.1. Nomenclatura**

#### **1.6.1.1. Nombre químico**

- L-Prolina, 1-[N<sup>2</sup>-(1-carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil]-dihidrato.(S)<sup>9</sup>
- 1-[N<sup>2</sup>-[(S)-1-carboxil-3-fenilpropil]-L-lisil]-l-prolina dihidrato<sup>9</sup>

- (S)-1-[N<sup>2</sup>-(carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil]-L-prolina dihidrato<sup>10</sup>

### 1.6.1.2. Nombre genérico

Lisinopril.

### 1.6.1.3. Nombres comerciales

Prinivil, Zestril, Carace, Novatec, Acerbon, Alapril, Coric, Prinil, Tensopril, Vivatec.<sup>10</sup>

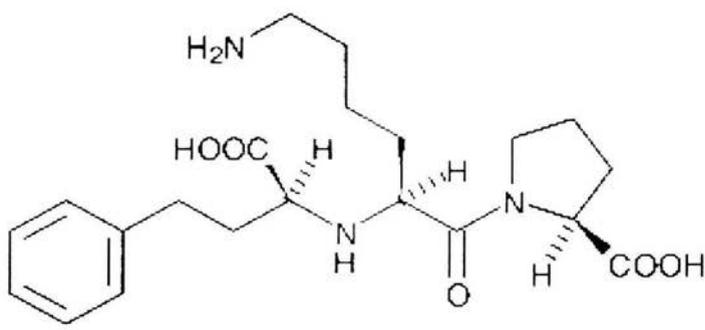
### 1.6.1.4. Número de registro CAS

93015-83-7 (dihidratado)<sup>9</sup>, 76547-98-3 (anhidro), 83915-83-7 (dihidratado)<sup>11</sup>

### 1.6.2. Fórmula, estructura y peso molecular

La estructura, fórmula condensada y peso molecular de Lisinopril se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Donde se muestra la estructura y peso molecular de Lisinopril<sup>11</sup>


Estructura del Lisinopril
Fórmula condensada $C_{21}H_{31}N_3O_5 \cdot 2H_2O$ PM. 441.52 g/mol

### 1.6.3. Propiedades físicas

El Lisinopril es un polvo o cristal de blanco a incoloro y sin olor.<sup>12</sup>

#### 1.6.3.1. Solubilidad

La solubilidad aproximada de Lisinopril a temperatura ambiente se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Solubilidad de Lisinopril.<sup>9</sup>

Disolvente	Solubilidad (en mg/mL)
Agua	97
Metanol	14 <sup>a</sup>
Etanol	Menor a 0.1
Acetona	Menor a 0.1
Acetonitrilo	Menor a 0.1
Cloroformo	Menor a 0.1
N,N-Dimetilfomamida	Menor a 0.1

<sup>a</sup> El valor de la solubilidad depende del grado de agua contenido en la solución.

### 1.6.3.2. Constantes de disociación

Las constantes de disociación para el Lisinopril se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Constantes de disociación de Lisinopril.<sup>9</sup>

Constantes de disociación de Lisinopril	
pKa <sub>1</sub>	2.5
pKa <sub>2</sub>	4.0
pKa <sub>3</sub>	6.7
pKa <sub>4</sub>	10.1

### 1.6.3.3. Coeficiente de partición

El coeficiente de partición de Lisinopril en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.0/n-octanol es de  $10.2 \pm 0.5$  a temperatura ambiente.

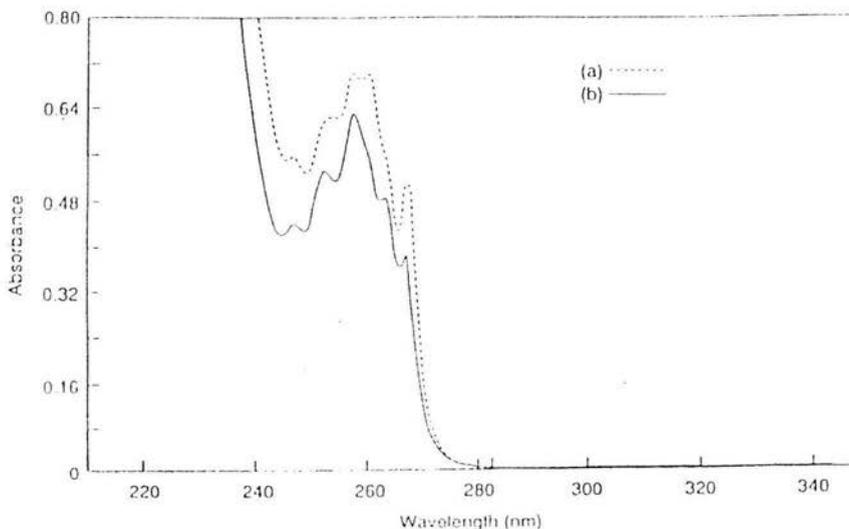
### 1.6.3.4. Espectro U.V.

El espectro de absorción de luz ultravioleta de Lisinopril se encuentra en la Figura 9.

## 1.6.4. Estabilidad<sup>9</sup>

### 1.6.4.1. En estado sólido – térmica

El Lisinopril es estable en estado sólido a temperatura ambiente (20-25°C). La degradación puede ser inducida cuando el sólido es expuesto a condiciones mayores a 105°C. Estudios por CLAR han demostrado que sufre una deshidratación intramolecular degradándose en primer grado a la Dicotopiperazina (DKP). La transformación de Lisinopril en DKP es más alta en recipientes cerrados en los que se ha inyectado nitrógeno (80%), que en recipientes cerrados en los que no se ha inyectado nitrógeno (50-60%) o en los recipientes abiertos (6%).



**Figura 9.** Espectro de absorción ultravioleta de Lisinopril ( 1.374mg/mL) en: (a) solución 0.1N de hidróxido de sodio y (b) solución 0.1N de HCl<sup>9</sup>

#### 1.6.4.2. En estado sólido – fotoquímico

Se observan decoloraciones muy ligeras cuando el Lisinopril es expuesto a radiación U.V. muy intensa por 24 horas.

#### 1.6.4.3. En solución

La estabilidad del Lisinopril en solución a una concentración de 0.2 mg/mL fue estudiada a diferentes rangos de pH (2.7-10) y a una fuerza iónica constante ( $\mu = 0.3$ ). El Lisinopril sufre un proceso de descomposición rápido en medio ácido donde el producto mayoritario de descomposición es la DKP. En soluciones básicas y neutras el rango de descomposición es mínimo.

#### 1.6.5. Métodos de análisis

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

A continuación se presenta en la Tabla 8 un resumen de los sistemas cromatográficos reportados para la cuantificación de Lisinopril. En la Tabla 9 se muestran algunos sistemas cromatográficos utilizados en la cuantificación de Lisinopril en fluidos biológicos.

### 1.6.5.1. Cromatográficos en solución

**Tabla 8.** Condiciones cromatográficas para el análisis de Lisinopril por CLAR.

Columna	Condiciones cromatográficas	Referencia
Zorbax RP-8 250*4.6 mm, 5µm. Temperatura 50°C.	A: Acetonitrilo B: 0.02 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5.0 Gradiente: 0% A a 30% A gradiente lineal hasta 35min Isocrático: 4% A y 96% B	9
PRP-1 (Hamilton Co) 250*4.6 mm. Temperatura 50°C.	A: 0.02 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.8 B: 0.015 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3.0 C: Acetonitrilo Isocrático: 4% A y 96% B Gradiente 1: A/C 97.5:2.5 por 10 min y luego un gradiente lineal a A/C 70:30 en 30 min Gradiente 2: B/C 95:5 por 10 min y luego un gradiente lineal a A/C 70:30 en 30 min	9
LiChrosorb RP-8 200*4.6 mm, 10 µm. Temperatura 50°C.	A: Acetonitrilo B: Metanol C: 0.004 M Fosfato pH 2.0 D: 0.04 M Fosfato pH 2.0 E: 0.03 M Fosfato pH 2.0 Isocrático 1: A/C 45:55 Isocrático 2: B/D 45:55 Isocrático 3: A/E 20:80 Isocrático 4: A/D 15:85	9
R-LiChrosorb C-18 200*4.6 mm, 5µm.	A: Solución reguladora de ácido acético pH 3.8 B: Acetonitrilo Isocrático: A/B 4:1	13
Hypersil ODS 250*4.5 mm, 5µm.	A: Heptanosulfonato de sodio 20 mM pH 2.5 B: Acetonitrilo/THF 19:1 Isocrático: A/B 63:37	14
Columna con empaque C-8 y partícula de 3-10 µm.	A: Fosfato 0.03M pH 2.0, hexanosulfonato 0.1 % B: Acetonitrilo Isocrático: A/B 80:20	12
Spherisorb 5 ODS-2 250*4.6 mm.	A: Fosfato pH 3.0 con 0.4% de trietilamina B: n-Propanol Isocrático: A/B 95:5	15
µBondapak phenyl 300*3.9 mm 30-40°C.	A: Metanol B: Agua C: Ácido ortofosfórico 85% Isocrático: A/B/C 60:40:0.05	16
Spherisorb octil 5µm 250*4.6 mm.	A: Fosfato pH 2.0 20 mM B: Acetonitrilo Isocrático: Varias proporciones	17

### 1.6.5.2. Cromatográficos en fluidos biológicos

**Tabla 9.** Condiciones cromatográficas para el análisis de Lisinopril por CLAR en fluidos biológicos.

Columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Referencia
Nova Pack C-18 300*3.9 mm, 4µm.	A: Metanol B: THF C: Fosfato 0.01 M pH 2.6 Isocrático: 65:5:30	Plasma	18
µBondapak C-18 300*3.9mm, 10µm. 40°C	A: Acetonitrilo B: Metanol C: THF D: 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2.9 Isocrático: A/B/C/D 6:1:1:92	Orina	19
LiChrosphere 100 RP-18 250*4.6mm 5µm	A: Fosfatos pH 2.4, 20mM nonilamina B: Acetonitrilo Isocrático: A/B 67.3:32.5	Plasma y orina	20

## 1.6.6. Farmacología

### 1.6.6.1. Mecanismo de acción

Se ha comprobado que el Lisinopril inhibe a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en seres humanos y animales. La ECA es una peptidil dipeptidasa que cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II, sustancia vasoconstrictora y estimulante de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal. La inhibición de la ECA da por resultado una disminución de la angiotensina II en el plasma y por consiguiente, también disminuye la secreción de aldosterona.

El mecanismo mediante el cual el Lisinopril reduce la presión arterial es principalmente la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona y ha demostrado ser antihipertensivo en pacientes que sufren de hipertensión arterial con bajo nivel de renina.

En pacientes diabéticos, la ECA se encuentra presente en el endotelio con actividad incrementada, lo que resulta en la formación de angiotensina II y la destrucción de la bradicinina, así como la potenciación del daño al endotelio causado por la hiperglucemia. Los inhibidores de la ECA incluyendo el Lisinopril, inhiben la formación de angiotensina II, reducen la destrucción de bradicinina y disminuyen el mal funcionamiento endotelial.<sup>21</sup>

### 1.6.6.2. Farmacocinética y biodisponibilidad

La farmacocinética seguida por radio inmuno análisis (RIA) después de la administración de una dosis de 10 mg mostró que la concentración plasmática máxima fue de  $95 \pm 55$  nM a un tiempo de  $7 \pm 1$  hora, un área bajo la curva (0-72 horas) de  $1694 \pm 808$  nM h / L. La farmacocinética en plasma mostró un perfil polifásico y una vida media terminal de aproximadamente 30 horas. La depuración renal fue de  $106 \pm 13$  mL / min con recobro urinario y fecal de  $29 \pm 15$  % y  $69 \pm 23$  %. El Lisinopril no es metabolizado, se absorbe y

excreta sin cambios en la orina. La absorción no es influenciada por la presencia de alimento en el tracto gastrointestinal.

En el caso de dosis múltiples, muestra una vida media efectiva de 12.6 horas. La disminución de la concentración sérica muestra una fase terminal prolongada que no contribuye a la acumulación del medicamento. Parece no unirse a otras proteínas en el plasma. La insuficiencia renal disminuye la eliminación y se vuelve importante cuando la tasa de filtración glomerular es menor de 30 mL / min.

Otros estudios han demostrado que cruza ligeramente la barrera hematoencefálica.<sup>9</sup>

### **1.6.6.3. Reacciones secundarias y adversas**

En estudios clínicos controlados el Lisinopril fue bien tolerado. La mayor parte de los efectos adversos presentados fueron ligeros y de naturaleza pasajera.

Los efectos secundarios clínicos más frecuentes reportados son: mareos, cefalea, diarrea, fatiga, tos y náuseas. Otros efectos secundarios menos frecuentes son: efectos ortostáticos (incluyendo hipotensión) rash cutáneo y astenia. Rara vez presenta edema angioneurótico de la cara, extremidades, labios, lengua, glotis y/o laringe.

Contraindicaciones: pacientes con angioedema hereditario oradiohéptico.<sup>22</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

Los métodos analíticos en fluidos biológicos no se encuentran al alcance de manera oficial, por lo que el desarrollo del método analítico se torna indispensable y relevante. No obstante que existen una serie de métodos ya reportados en la literatura especializada, estos no siempre cumplen con las características requeridas. Los métodos analíticos en fluidos biológicos reportados en la literatura especializada son generalmente tomados como referencia para optimizar, implementar o adecuarse a las condiciones experimentales en un laboratorio en particular. Algunas veces, por el objetivo que se pretenda alcanzar y las condiciones propias en el laboratorio, esto no es posible y tiene que recurrirse al desarrollo de un método analítico.

Actualmente, dentro de la literatura especializada los métodos reportados para cuantificar Lisinopril en fluidos biológicos se realizan con técnicas que no se encuentran al alcance o son difíciles de implementar para un análisis rutinario (estudios de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia). El desarrollo analítico se convierte entonces en una herramienta indispensable para implementar un método de fácil aplicación en el análisis rutinario de Lisinopril en orina.

¿Por qué en orina?

Porque se trata de un fármaco que se excreta en orina en forma inalterada. Los resultados que se obtengan a partir de la cuantificación de Lisinopril en orina servirán de apoyo en un estudio de bioequivalencia en el que se cuantificará el fármaco en plasma.

¿Para que dosis y que rango de concentración en orina?

La dosis que se administrará a los voluntarios en el estudio de bioequivalencia es de 20 mg y el rango de concentraciones esperado es de 0.5-20  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>19</sup>

No existen muchos métodos empleados para la cuantificación de Lisinopril en orina y a los que se pudo tener acceso. presentan metodologías complejas que no son fáciles de implementar para un estudio de bioequivalencia, ya que consumen mucho tiempo. Dado que en los estudios de bioequivalencia se genera una gran cantidad de muestras, los métodos que impliquen gran inversión de tiempo serán más costosos.

### **3. OBJETIVO**

Desarrollar un método analítico para cuantificar Lisinopril en orina a concentraciones de 0.5-20  $\mu\text{g/mL}$  por CLAR.

#### **4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

El diseño de esta investigación es de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y descriptivo.

## 5. POBLACIÓN

Orina de voluntarios humanos.

## **6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Orina colectada en un plazo menor a 2 horas antes del análisis.
- Orina colectada en un plazo mayor a 2-24 horas con cloruro de benzalconio al 0.01%.
- Orina colectada en un plazo mayor a 24 horas antes del análisis con cloruro de benzalconio al 0.01% almacenadas en congelación.

## 7. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Orina de voluntarios con problemas renales.
- Orina de voluntarios que hayan ingerido café, bebidas de cola o bebidas alcohólicas.

## 8. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Cuando la muestra se pierda durante el análisis.

## 9. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 9.1. SUSTANCIA DE REFERENCIA

La sustancia de referencia utilizada fue Lisinopril marca Sigma, lote 73H0893.

### 9.2. REACTIVOS Y EQUIPO

Los reactivos utilizados se encuentran reportados en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Reactivos utilizados

Reactivo	Marca	Grado
Ácido orto fosfórico	J. T. Baker	RA ACS
Agua	-----	HPLC
Acetonitrilo	Fermont	HPLC
Metanol	Fermont	HPLC
Tetrahidrofurano	Mallinckrodt	HPLC
Hexano	Fermont	HPLC
Fosfato monobásico de potasio	Fermont	RA ACS
Ácido clorhídrico	J. T. Baker	RA ACS
Hexanosulfonato de sodio	Sigma	RA ACS
Heptanosulfonato de sodio	Spectrum	RA ACS
Octanosulfonato de sodio	Sigma	RA ACS

La matriz biológica (orina) fue recolectada de voluntarios masculinos sanos de 18-35 años con pesos comprendidos entre 60 y 80 Kg. Se utilizó como conservador cloruro de benzalconio para tener una concentración final de 0.01% en la orina y se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

El equipo cromatográfico y equipo adicional utilizado para el desarrollo del método es el enlistado en la Tabla 11. El control de la válvula de seis vías se realizó de forma automática.

**Tabla 11.** Equipo cromatográfico empleado

Equipo	Marca	Modelo
Bomba cuaternaria de pistones recíprocos	Waters	600E
Controlador de bomba cuaternaria	Waters	-----
Bomba isocrática de pistones recíprocos	Waters	510
Automuestrador	Waters	717 Plus
Detector UV Dual	Waters	2487
Válvula conmutadora de flujo de Seis Vías	Valco - VICI	-----
Programa de procesamiento de datos Millennium 32.	Waters	Versión 3.05.01

La Tabla 12 muestra el equipo auxiliar utilizado para el desarrollo del método.

**Tabla 12.** Equipo auxiliar empleado

Equipo	Marca	Modelo
Balanza Analítica	Mettler	AE 260
Centrífuga	Sorvall Du Pont	RT 6000D
Potenciómetro	Beckman	45
Ultracongelador	Nuaire	UN / 6512Gkl
Refrigerador	Revco	REC5004A18
Pipeta automática 5-50 µL	Finnpipette	-----
Pipeta automática 40-200 µL	Labsystems	Finnpipette Digital
Pipeta automática 200-1000 µL	Labsystems	Fisherbrand
Pipeta de descargas múltiples	Eppendorf	-----
Cámara de extracción en fase sólida	Waters	-----

La Tabla 13 muestra las diferentes columnas analíticas utilizadas para el desarrollo del método.

**Tabla 13.** Columnas analíticas empleadas

Marca	Características
Agilent Zorbax SB	C18, 250*4.6 mm DI y partículas híbridas irregulares de 5µm
Waters X Terra	RP 18, 150 *3.9 mm DI y partículas híbridas irregulares de 5µm
Waters X Terra	RP 8, 150 *3.9 mm DI y partículas esféricas de 5µm

La Tabla 14 muestra los cartuchos de extracción en fase sólida y guarda columnas utilizadas para el desarrollo del método.

**Tabla 14.** Cartuchos de extracción en fase sólida

Marca	Características
Waters SEP-PAK	C18 de 100 mg y 6cc
Waters Oasis	HLB de 10 mg y 1cc
Waters Resolve	CN guarda columna de 20*4.6mm DI
Waters Nova-Pak	CN-HP guarda columna de 20*4.6mm DI
Waters Nova-Pak	Phenil guarda columna de 20*4.6mm DI
Waters Nova-Pak	C8 guarda columna de 20*4.6mm DI
Agilent Zorbax SB	CN guarda columna de 12.5*4.6mm DI

### 9.3. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

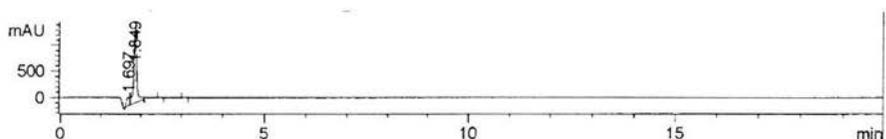
Durante el desarrollo del método se estudiaron diferentes alternativas para el sistema cromatográfico y el procesamiento de la muestra. Una vez concluida la etapa del desarrollo del sistema cromatográfico y procesamiento de muestra, se realizó una verificación del método.

### 9.3.1. Diseño del Sistema Cromatográfico

En el desarrollo de los métodos analíticos por CLAR, el primer paso fue obtener un sistema cromatográfico capaz de trabajar en el intervalo de concentraciones propuesto.

En un principio se tomó como base el sistema cromatográfico propuesto por Wong y Charles (ref. 19) modificando la columna analítica ya que no se contaba con una de la marca indicada por los autores. Se utilizó una columna con empaque C18 y mismas dimensiones (ver Figura 10).

- Fase móvil: Fosfatos 15mM pH 2.9: Acetonitrilo: Metanol: Tetrahidrofurano 92:6:1:1
- Columna analítica: Agilent Zorbax SB C18 250\*4.6mm DI
- Flujo: 1.5 mL/min
- Longitud de onda: 206 nm



**Figura 10.** Cromatograma representativo de Lisinopril (100 µg/mL) en el sistema basado en el propuesto por Wong y Charles.

El resultado obtenido con este sistema cromatográfico no fue el deseado ya que el Lisinopril presentó un factor de capacidad menor a 1. La diferencia en el factor de capacidad obtenido en este trabajo con respecto al obtenido por Wong y Charles se debe principalmente a la columna utilizada. Es conocido que las columnas µBondapak presentan una gran actividad de grupo silanol y contienen una baja carga de carbono, lo cual ocasiona que los compuestos polares, principalmente los que tienen grupos funcionales amino sean retenidos con mayor intensidad a pH cercanos o mayores a 3. Esto se da principalmente por la interacción de las cargas generadas por los grupos silanoles residuales (carga negativa) y la de los grupos funcionales amino (carga positiva). Las columnas con mayor carga de carbono y menor actividad de grupo silanol más modernas, como la utilizada (Agilent Zorbax SB C18), minimizan la interacción del grupo silanol por dos mecanismos: el primero utiliza un impedimento estérico y el segundo inactiva los silanoles con un sello terminal. La combinación de la columna utilizada con una baja actividad de grupo silanol (impedimento estérico) sumado a un pH en el cual la molécula se encuentra con cargas positivas y negativas hace que la retención y el factor de capacidad del Lisinopril sea muy bajo.

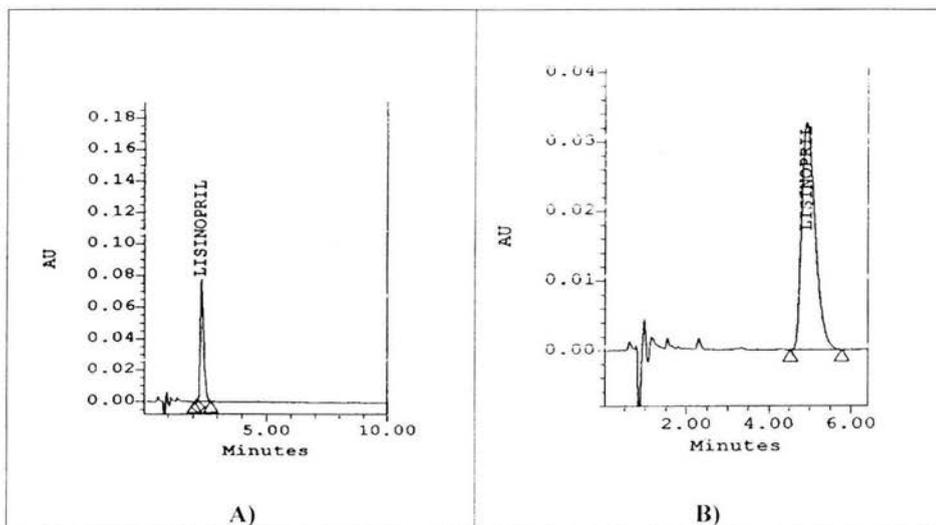
Aunque las columnas con baja carga de carbono y gran actividad de grupo silanol retienen a los compuestos polares con mayor intensidad que la nueva generación de columnas, no son una buena opción ya que los equilibrios secundarios que presentan hacen que la eficiencia de la separación sea baja, además de producir picos anchos y coleados que causan problemas en la integración. Otro problema que presentan las columnas de este tipo es la poca reproducibilidad de lote a lote de columnas.

El siguiente paso fue diseñar un sistema cromatográfico con una fase acuosa a pH de 2.0 y 10 mM de hexanosulfonato de sodio y una columna C8 de 15 cm de longitud (basado en el sistema propuesto por USP 25, ref. 42). Se diseñó un experimento con tres proporciones de modificador orgánico, para evaluar con cual proporción se obtenía el mejor resultado.

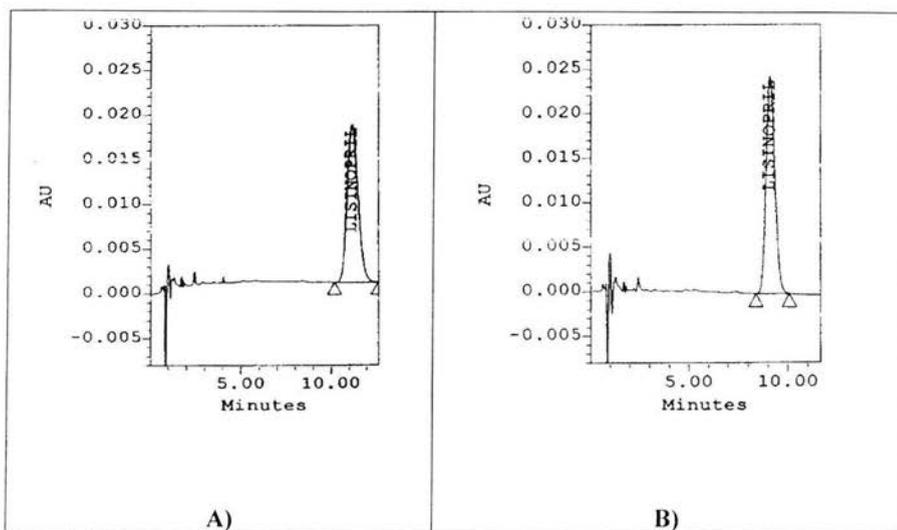
- Fase móvil A. Acetonitrilo : Fosfatos pH 2.0  $\pm$  0.05 hexanosulfonato de sodio 0.1% 15:85.
- Fase móvil B. Acetonitrilo : Fosfatos pH 2.0  $\pm$  0.05 hexanosulfonato de sodio 0.1% 10:90.
- Fase móvil C. Acetonitrilo : Fosfatos pH 2.0  $\pm$  0.05 hexanosulfonato de sodio 0.1% 5:95.

La columna analítica utilizada fue una Waters X Terra RP 8, 150 \*3.9 mm DI y partículas híbridas irregulares de 5 $\mu$ m, el flujo fue de 1.5 mL/min y detección U.V. a 206 nm. La temperatura utilizada fue de 50°C. Durante el análisis se decidió incluir una temperatura adicional para la fase móvil C, la cual es fue de 60° C.

Los resultados mostraron que a pH de 2.0 el hexanosulfonato de sodio que actúa como reactivo de par iónico se carga negativamente y se une a los grupos amino de Lisinopril que presentan carga positiva, haciendo que la retención y el factor de capacidad aumente de manera significativa, permitiendo una separación más efectiva que la que se obtendría sin la formación del par iónico. Ver Figuras 11 y 12



**Figura 11.** Cromatogramas representativos de Lisinopril (10  $\mu$ g/mL). **A)** fase móvil A a 50°C. **B)** Fase móvil B a 50°C.



**Figura 12.** Cromatogramas representativos de Lisinopril (10  $\mu\text{g/mL}$ ). **A)** Fase móvil C a 50°C. **B)** fase móvil C a 60°C.

Se encontró que las condiciones con las que se obtuvo el mejor compromiso entre tiempo de corrida y factor de capacidad fueron cuando se utilizó una columna analítica Waters X Terra RP 8, 150 \*3.9 mm DI y partículas híbridas irregulares de 5 $\mu\text{m}$ , con flujo de 1.5 mL/min. con temperatura de 60°C y detección U.V. a 206 nm. Con esto se concluyó la parte del diseño del sistema cromatográfico.

### 9.3.2. Diseño del Procesamiento de Muestra

Una vez establecido un sistema cromatográfico el siguiente paso fue el diseño del método de procesamiento de la muestra.

Debido a las características físico-químicas del Lisinopril no es posible realizar una extracción líquido-líquido ya que a cualquier pH la molécula se encuentra ionizada (presenta grupos funcionales amino y carboxilo) lo que impide su extracción a la fase orgánica, esto concuerda con lo ya descrito por Wong y Charles (ref. 47). Esta fue la razón por la cual se descartó desde un principio como una alternativa de procesamiento. La precipitación de proteínas se descartó ya que la orina en sujetos sanos se encuentra prácticamente libre de éstas. En este punto, la alternativa de procesamiento se limitaba a la extracción en fase sólida.

#### 9.3.2.1. Extracción en fase sólida

Se diseñaron experimentos en los cuales se procesaron soluciones de Lisinopril con los cartuchos de extracción en fase sólida Waters Sep-Pak C18 y Waters Oasis HLB.

#### 9.3.2.1.1. Experimento 1.

Acondicionamiento de los cartuchos de extracción Sep-Pak C18.

- Se activó con 5 mL de metanol.
- Se equilibró con 5 mL de solución reguladora de pH 6.5.

Acondicionamiento de los cartuchos Oasis HLB

- Se activó con 3 mL de metanol.
- Se equilibró con 3 mL de solución reguladora de pH 6.5.

Procesamiento de muestra en cartuchos Sep-Pak C18 u Oasis HLB.

- Se colocaron 2 mL de solución de Lisinopril (1 µg/mL) o blanco de orina.
- Se realizaron tres lavados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.5.
- Se eluyó la muestra con 6 mL de metanol.
- Se evaporó a sequedad a 60°C con un flujo suave de nitrógeno.
- Se reconstituyó con 200 µl de agua.
- Se inyectó al sistema cromatográfico.

Los blancos de orina procesados presentaron un color ámbar con partículas en suspensión y no se inyectaron para evitar que la columna analítica se dañara.

#### 9.3.2.1.2. Experimento 2.

Acondicionamiento de los cartuchos de extracción Sep-Pak C18.

- Se activó con 5 mL de metanol.
- Se equilibró con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 y hexanosulfonato de sodio 0.1%.

Acondicionamiento de los cartuchos de extracción Oasis HLB.

- Se activó con 3 mL de metanol.
- Se equilibró con 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 y hexanosulfonato de sodio 0.1%.

Procesamiento de muestra en cartuchos Sep-Pak C18 u Oasis HLB.

- Se colocaron 4 mL de solución diluida 1:1 de Lisinopril (1 µg/mL) o blanco de orina con solución amortiguadora de pH 2.0 0.1% de hexanosulfonato de sodio.
- Se realizaron dos lavados con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 y hexanosulfonato de sodio 0.1%.

- Se realizaron dos lavados con 2 mL de HCl 0.1N
- Se eluyó la muestra con 4 mL de metanol.
- Se evaporó a sequedad a 60°C con un flujo suave de nitrógeno.
- Se reconstituyó con 200 µl de agua.
- Se inyectó al sistema cromatográfico

Con este procesamiento nuevamente el aspecto de los blancos de orina después de reconstituir fue de color ámbar con partículas en suspensión por lo que no se inyectaron las muestras para no dañar la columna.

Las sustancias contenidas en la orina son de características polares, lo que dificultó su procesamiento ya que al tratar de retener al Lisinopril, se retienen también dichas sustancias. Debido al fracaso para lograr una extracción en fase sólida eficiente se recurrió entonces a la cromatografía bidimensional.

### 9.3.2.2. Extracción en fase sólida en línea (cromatografía bidimensional).

Para implementar la cromatografía bidimensional el primer paso realizado fue caracterizar el tiempo de retención del analito de interés en la guarda columna.

#### 9.3.2.2.1. Caracterización de tiempos de retención en diferentes guarda columnas.

La evaluación de los tiempos de retención del Lisinopril se llevó a cabo con la siguiente condición.

- Fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 y heptanosulfonato de sodio 0.01%.
- Velocidad de flujo: 0.5 mL/min.
- Temperatura de la guarda columna: 50°C.

El tiempo de retención de Lisinopril en las distintas guarda columnas se puede ver en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Caracterización de tiempos de retención del Lisinopril en diferentes guarda columnas.

Marca	Características	Tiempo de retención (min)
Waters Resolve	CN guarda columna de 20*4.6mm DI	1.8
Waters Nova-Pak	CN-IP guarda columna de 20*4.6mm DI	1.5
Waters Nova-Pak	Phenil guarda columna de 20*4.6mm DI	>70.0
Waters Nova-Pak	C8 guarda columna de 20*4.6mm DI	>20.0
Agilent Zorbax SB	CN guarda columna de 12.5*4.6mm DI	1.8

Una vez caracterizados los tiempos de retención en las diferentes guarda columnas, se procedió a optimizar la fase móvil para la limpieza de la muestra en las guarda columnas

Waters Nova-Pak Phenil y en Waters Nova-Pak C8. En la Tabla 16 se pueden ver los resultados obtenidos.

**Tabla 16.** Caracterización de tiempos de retención del Lisinopril en diferentes guarda columnas y con diferentes proporciones de modificador orgánico.

Marca	Fase móvil	Tiempo de retención (min)
Waters Nova-Pak Phenil	Solución amortiguadora de pH 2.0 heptanosulfonato de sodio de 0.1%:Acetonitrilo 95:5	20.9
Waters Nova-Pak C8	Solución amortiguadora de pH 2.0 heptanosulfonato de sodio de 0.1%:Acetonitrilo 95:5	2.8
Waters Nova-Pak Phenil	Solución amortiguadora de pH 2.0 heptanosulfonato de sodio de 0.1%:Acetonitrilo 90:10	3.34

Con los resultados anteriores se determino que la mejor opción para ser utilizada como columna de limpieza es la Waters Nova-Pak Phenil y que el tiempo de lavado propuesto es de 2.5 min, ya que con este tiempo se asegura que el analito se mantendrá en la guarda columna.

#### 9.3.2.2.2. Diseño de la cromatografía bidimensional.

Se seleccionó la elución a contra flujo, ya que esta disposición permite disminuir el ancho de pico, aumentando de esta forma la sensibilidad del método.

##### 9.3.2.2.2.1. Experimento 1

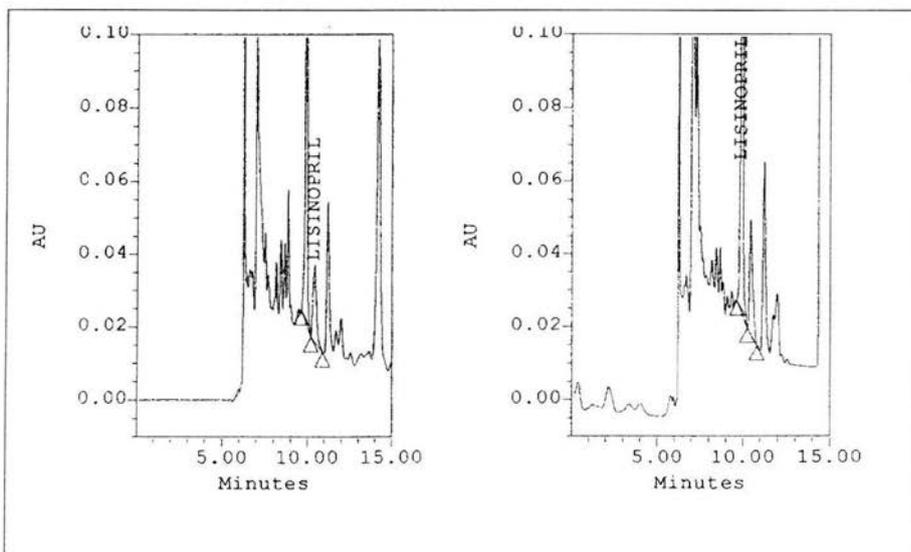
En éste se realizaron inyecciones de blancos de orina, soluciones acuosas de Lisinopril a 10 µg/mL y orina adicionada con Lisinopril a una concentración de 10 µg/mL. Las soluciones, blanco de orina y orina adicionada se inyectan sin ningún procesamiento previo ya que la limpieza de la muestra se llevó a cabo en línea.

Sistema cromatográfico bidimensional:

- Columna analítica: Waters X Terra RP 8 150\*4.6 mm de DI y 5 µm de tamaño de partícula.
- Guarda columna de limpieza: Waters Nova-Pak Phenil de 20\*4.6 mm de DI y partículas esféricas de 4 µm.
- Elución a contra flujo.
- Fase móvil de lavado: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10
- Fase móvil de elución: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10.
- Velocidad de flujo de lavado: 0.5 mL/min.
- Velocidad de flujo de elución: 1.5 mL/min.

- Tiempo de lavado: 2.5 min.
- Tiempo de elución: 2.5 min.
- Temperatura de la columna y guarda columna: 50°C
- Detección U.V.: 206 nm.
- Volumen de inyección: 100  $\mu$ L.

Los resultados del experimento 1 (ver Figura 13) muestran que el sistema cromatográfico bidimensional no cumplió con el objetivo de separar selectivamente al Lisinopril de los componentes de la matriz biológica, por que la resolución en la columna analítica es pobre. Una alternativa para mejorar la resolución fue modificar el empaque de la columna cambiando de un empaque RP8 a uno C18.



**Figura 13.** Cromatogramas representativo de una solución de Lisinopril (10  $\mu$ g/mL) en orina con el sistema cromatográfico bidimensional del experimento 1.

#### 9.3.2.2.2. Experimento 2

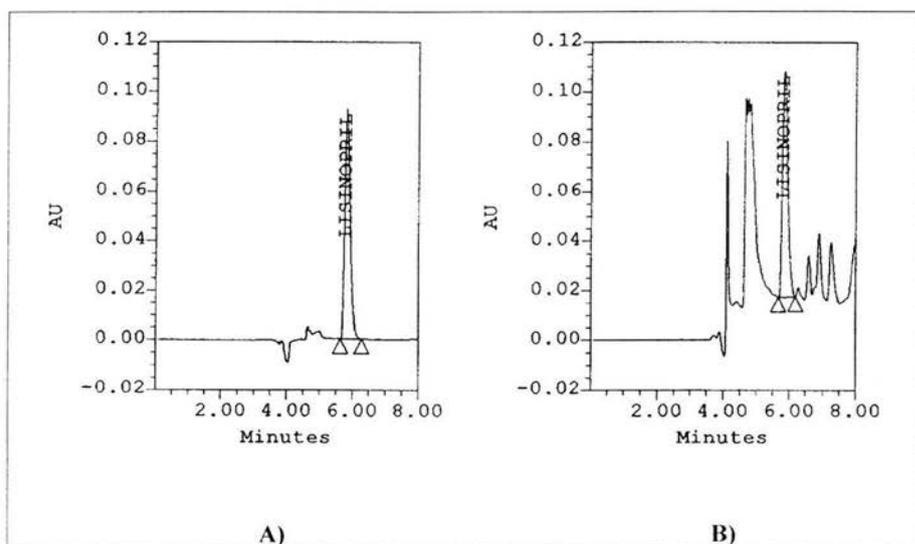
Éste tuvo como objetivo optimizar el sistema cromatográfico bidimensional al cambiar la columna analítica Waters X Terra RP 8 por una Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm. Se aumentó el flujo para acortar el tiempo de la corrida. No existe tratamiento previo de los blancos de orina. soluciones acuosas y orina adicionada.

El sistema cromatográfico bidimensional se diseñó de la siguiente forma:

- Columna analítica: Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm de DI con partículas esféricas de 5 $\mu$ m.

- Guarda columna de limpieza: Waters Nova-Pak Phenil de 20\*4.6 mm de DI y partículas esféricas de 4  $\mu\text{m}$ .
- Elución a contra flujo.
- Fase móvil de lavado: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10
- Fase móvil de elución: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 78:22.
- Velocidad de flujo de lavado: 0.5 mL/min.
- Velocidad de flujo de elución: 2.5 mL/min.
- Tiempo de lavado: 2.5 min.
- Tiempo de elución: 0.5 min.
- Temperatura de la columna y guarda columna: 50°C
- Detección U.V.: 206 nm.
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{L}$ .

Los resultados de este experimento (ver Figura 14) mostraron claramente una mejora en la resolución del Lisinopril de las sustancias endógenas de la matriz biológica. Aunque la mejora en la resolución es alta este sistema cromatográfico aún no es capaz de cuantificar de manera exacta y precisa la concentración de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 14.** Cromatogramas representativos: **A)** Solución de Lisinopril (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en agua. **B)** Solución de Lisinopril (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en orina.

### 9.3.2.2.3. Experimento 3

Utilizando la propiedad del Lisinopril de no ser extraído con disolventes orgánicos, se decidió eliminar las interferencias de la matriz con una extracción líquido-líquido e inyectar

la fase acuosa en el sistema cromatográfico. Se diseñó un experimento en el cual se utilizó cloroformo y hexano para limpiar la zona de elución de Lisinopril utilizando el siguiente sistema de cromatográfico bidimensional:

- Columna analítica: Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm de DI con partículas esféricas de 5µm.
- Guarda columna de limpieza: Waters Nova-Pak Phenil de 20\*4.6 mm de DI y partículas esféricas de 4 µm.
- Elución a contra flujo.
- Fase móvil de lavado: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10
- Fase móvil de elución: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con heptanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 78:22.
- Velocidad de flujo de lavado: 0.5 mL/min.
- Velocidad de flujo de elución: 2.5 mL/min.
- Tiempo de lavado: 2.5 min.
- Tiempo de elución: 0.5 min.
- Temperatura de la columnas y guarda columna: 50°C
- Detección U.V.: 206 nm.
- Volumen de inyección: 100 µL.

Tratamiento previo de la muestra:

- Se transfirió una alícuota de 2.0 mL de muestra a un tubo de ensayo de vidrio.
- Se adicionaron 2 mL de disolvente orgánico (Cloroformo o Hexano).
- Se agitó durante 5 minutos con vortex.
- Se centrifugó a 2500 rpm durante 3 min para romper posibles emulsiones.
- Se separaron las fases y se conservó la acuosa.
- Se inyectaron 100 µL de la fase acuosa en el sistema cromatográfico bidimensional.

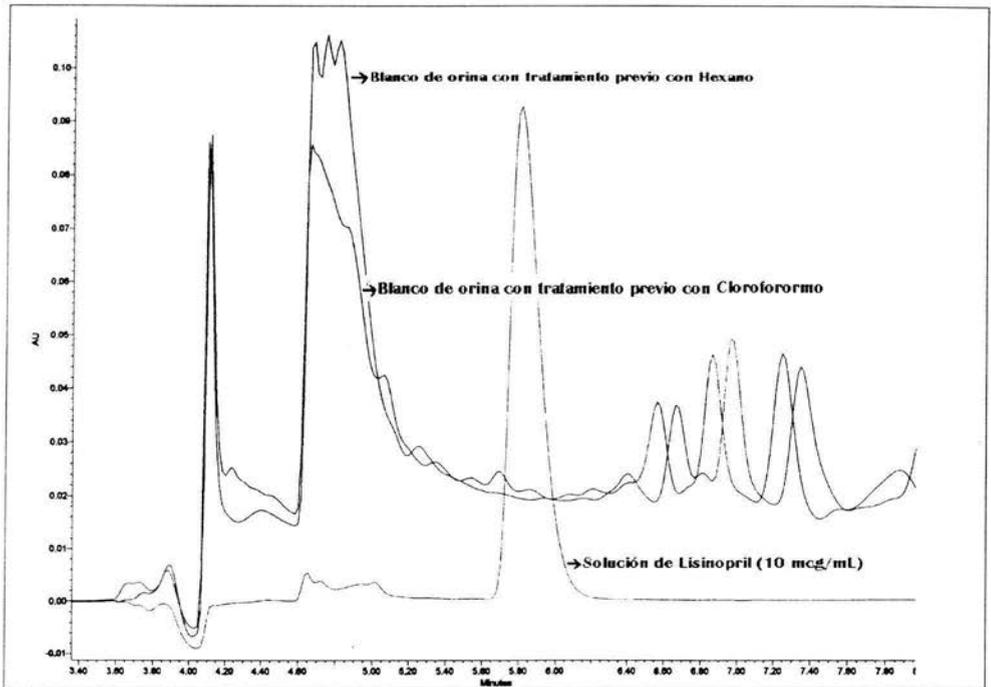


Figura 15. Cromatogramas representativos del experimento 3 del diseño de la extracción en fase sólida en línea.

Los resultados muestran (ver Figura 15) que el tratamiento previo con hexano es la mejor alternativa para mejorar la limpieza de la zona de elución del Lisinopril.

Se evaluó el recobro de Lisinopril en orina utilizando el pretratamiento de la muestra con hexano y el sistema cromatográfico bidimensional del experimento 3 a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, y 20.0  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados se pueden ver en la Tabla 17 los que muestran como a medida que va disminuyendo la concentración de Lisinopril el recobro aumenta; esto fue debido a una interferencia que tiene un efecto aditivo en el área del pico de Lisinopril. La propuesta para lograr una mejor selectividad y resolver el problema de la interferencia, fue cambiar el reactivo de par iónico utilizado (Heptanosulfonato de sodio) por Octanosulfonato de sodio para tener una mayor retención del Lisinopril y tratar de dar mayor selectividad a la separación.

**Tabla 17.** Evaluación del recobro de Lisinopril en orina a diferentes concentraciones con el sistema cromatográfico bidimensional del experimento 3 y pretratamiento con hexano.

<b>Concentración teórica (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% Recobro</b>
20.0	100.4
10.0	100.6
5.0	106.2
2.0	110.6
1.0	129.5
0.5	158.3

#### 9.3.2.2.2.4. Experimento 4

El diseño de este experimento se basó en las recomendaciones del experimento anterior.

Este experimento se realiza utilizando el tratamiento previo de muestra siguiente:

- Se transfirió una alícuota de 2.0 mL de muestra a un tubo de ensayo de vidrio.
- Se adicionaron 2 mL de Hexano.
- Se agitó durante 5 minutos con vortex.
- Se centrifugó a 2500 rpm durante 3 min para romper posibles emulsiones.
- Se separaron las fases y se conservó la acuosa.
- Se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa en el sistema cromatográfico bidimensional

En este procesamiento se omite el paso de la centrifugación ya que se ha observado que las fases se separan al reposar unos cuantos segundos.

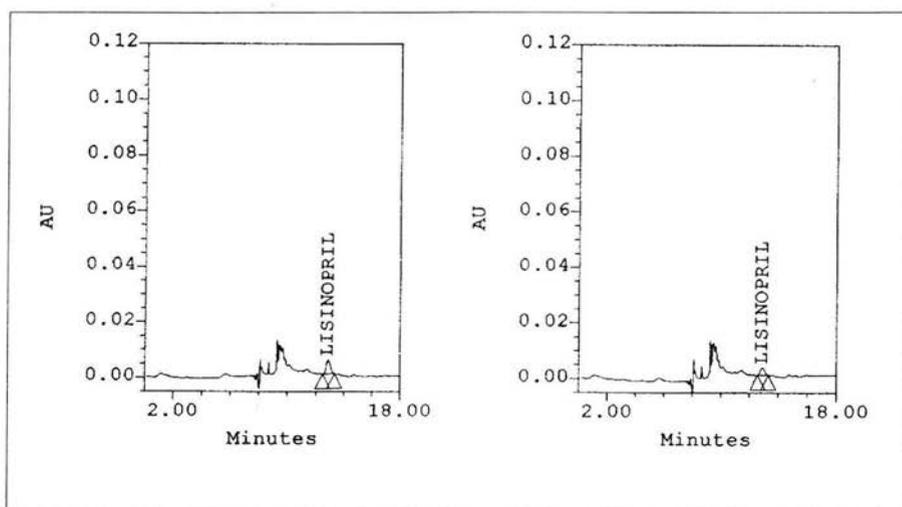
Se evaluó el tiempo de retención de Lisinopril en la guarda columna con la fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con Octanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10 a flujo de 0.5 mL/min y se observó que éste era mayor a 15 min. Por lo anterior, se decidió aumentar el flujo a 1.0 mL/min para disminuir el tiempo de la corrida.

Se realizó también la reducción de la velocidad de flujo de elución para incrementar la interacción del analito con la columna y lograr de esta forma una mejor separación.

Finalmente el sistema cromatográfico bidimensional quedó conformado de la siguiente manera:

- Columna analítica: Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm de DI con partículas esféricas de 5 $\mu\text{m}$ .

- Guarda columna de limpieza: Waters Nova-Pak Phenil de 20\*4.6 mm de DI y partículas esféricas de 4  $\mu\text{m}$ .
- Elución a contra flujo.
- Fase móvil de lavado: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con Octanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10.
- Fase móvil de elución: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con Octanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 78:22.
- Velocidad de flujo de lavado: 1.0 mL/min.
- Velocidad de flujo de elución: 2.0 mL/min.
- Tiempo de lavado: 6.5 min.
- Tiempo de elución: 0.7 min.
- Temperatura de la columna y guarda columna: 50°C
- Detección U.V.: 206 nm.
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{L}$



**Figura 16.** Cromatogramas característicos de orina adicionada con procesamiento de muestra con cromatografía bidimensional del experimento 4. Orina adicionada con Lisinopril izquierda 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y derecha 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los resultados obtenidos (ver Figura 16) muestran que el pretratamiento de la muestra en conjunto con la cromatografía bidimensional lograron tener una resolución adecuada entre las sustancias endógenas de la matriz y el Lisinopril. Dados los resultados anteriores, se propuso realizar un experimento de linealidad.

Se evaluó la linealidad del método utilizando concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados muestran (ver en la Tabla 18) la existencia de proporcionalidad entre la concentración y área ya que la  $r^2$  tiene un valor mayor a 0.99, asimismo se observó

que las diferencias entre la concentración teórica y la interpolada en ninguno de los niveles probados fueron mayores al 10.0%.

**Tabla 18.** Linealidad del método con el procesamiento del experimento 4.

Concentración de Lisinopril	Área	Concentración interpolada	% Diferencia
20.00	2118955	19.98	0.12
10.00	1067980	10.05	0.47
5.00	531712	4.98	0.40
2.00	227159	2.10	5.15
1.00	104078	0.94	5.99
0.50	52700	0.45	9.05
<b>Pendiente</b>	105848.9		
<b>Ordenada</b>	4566.9		
<b>r</b>	0.99997		
<b>r<sup>2</sup></b>	0.99993		

Debido a los resultados de linealidad, se planteó realizar un experimento para evaluar la estabilidad del sistema cromatográfico bidimensional (tolerancia), ya que en muchas ocasiones las sustancias muy retenidas pueden interferir con la cuantificación en este tipo de sistemas cromatográficos al perder eficiencia en la guarda columna por saturación. El experimento se realizó inyectando sucesivamente orina adicionada a una concentración de 10 µg/mL procesada previamente, se observó que la respuesta de Lisinopril tenía una tendencia a bajar conforme pasaba el tiempo hasta que en la inyección 66 se perdió por completo la señal. Se supuso que la pérdida de la señal de Lisinopril en el sistema cromatográfico era debida a la saturación de la guarda columna con sustancias endógenas muy retenidas, lo cual disminuye la capacidad de retención, provocando que el Lisinopril no se retenga en la guarda columna; para resolver esto se propone realizar una regeneración en línea.

#### 9.3.2.2.5. Experimento 5

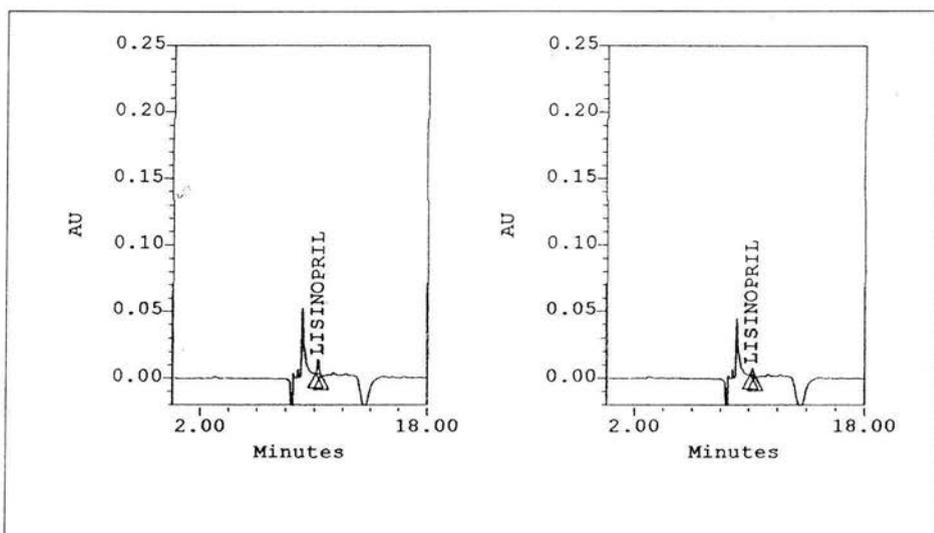
Tomando en cuenta la propuesta del experimento 4 se planteó un experimento para realizar la limpieza en línea con regeneración de la guarda columna.

El sistema cromatográfico quedó conformado de la siguiente forma:

- Columna analítica: Agilent Zorbax SB C18 de 250\*4.6 mm de DI con partículas esféricas de 5µm.
- Guarda columna de limpieza: Waters Nova-Pak Phenil de 20\*4.6 mm de DI y partículas esféricas de 4 µm.
- Elución a contra flujo.
- Fase móvil de lavado: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con Octanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 90:10.
- Fase móvil de elución: Solución amortiguadora de fosfatos a pH 2.0 con Octanosulfonato de sodio 0.1%:Acetonitrilo 78:22.

- Velocidad de flujo de lavado: 1.0 mL/min.
- Velocidad de flujo de elución: 2.0 mL/min.
- Tiempo de lavado: 6.5 min.
- Tiempo de elución: 0.7 min.
- Temperatura de la columna y guarda columna: 50°C
- Detección U.V.: 206 nm.
- Regeneración en línea: Se realiza un gradiente en la guarda columna cambiando el porcentaje de Acetonitrilo de 10% a 50% del minuto 6.5 al 10 utilizando gradiente lineal y regresando a la proporción inicial del minuto 10 al 14 con gradiente cóncavo.

Los resultados obtenidos (ver Figura 17) mostraron que el sistema cromatográfico bidimensional con regeneración de la guarda columna en línea mantiene una selectividad y sensibilidad adecuada.



**Figura 17.** Cromatogramas característicos de orina adicionada con Lisinopril izquierda 1  $\mu\text{g/mL}$  y derecha 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .

Con este sistema cromatográfico bidimensional y el pretratamiento de muestra se realizó nuevamente un experimento para evaluar la tolerancia a un gran número de inyecciones. Se realizaron inyecciones sucesivas de orina adicionada a 10  $\mu\text{g/mL}$  previamente procesada obteniéndose como resultado que al cabo de 50 inyecciones el coeficiente de variación fue menor a 1.0%.

Ya que los resultados fueron apropiados se decidió realizar los experimentos de verificación del método.

### 9.3.3. Verificación del método.

En esta etapa se estableció si efectivamente la metodología propuesta se comporta de manera selectiva, exacta, precisa y lineal.

Las pruebas de verificación del método fueron las siguientes:

- Linealidad
- Recobro absoluto
- Precisión y exactitud
- Selectividad

Al inicio de cada experimento se evaluó la adecuación del sistema con la inyección sucesiva de 5 soluciones de orina adicionada a una concentración de 10 µg/mL. El sistema se consideraba acondicionado si el coeficiente de variación era menor a 2.0%, solo después de cumplir esta condición se inyectaron las muestras. La Tabla 19 muestra un ejemplo de adecuación del sistema.

**Tabla 19.** Adecuación del sistema del experimento de linealidad del método.

NÚMERO DE INYECCIÓN	AREA LISINOPRIL
1	1016382
2	1010353
3	1019628
4	1023878
5	1008972
PROMEDIO	1015843
DESV. ESTANDAR	6256
C.V.	0.6

#### 9.3.3.1. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó mediante el procesamiento de tres curvas independientes y procesadas el mismo día.

Las concentraciones utilizadas para evaluar la linealidad fueron 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 µg/mL de Lisinopril en orina.

Para realizar el análisis de regresión se utilizó el método de los mínimos cuadrados tomando como variable independiente "X" la concentración teórica y como variable dependiente "Y" el área obtenida del pico cromatográfico del Lisinopril. Se realizó la curva y se obtuvo la ecuación de la recta tomando en cuenta todas las replicas.

Los criterios de aceptación para este experimento fueron que la  $r^2$  debe de ser mayor a 0.99 y que la diferencia entre la concentración teórica y la concentración interpolada no

fuera mayor a 15.0%, excepto para el punto de 0.5 µg/mL, que podía tener una diferencia de hasta 20.0%. Se evaluó individualmente y el promedio de las replicas.

La Tabla 20 muestra los resultados de la linealidad del método. Se observa que la linealidad cumple con el criterio establecido para la  $r^2$ , cumple el criterio establecido para la diferencia, excepto, para uno de los puntos bajos en que se desvía mas de 20%; este error es atribuible a un error de procesamiento y no es causa suficiente para afirmar que el método no es lineal. De acuerdo a los resultados anteriores, se comprueba que existe proporcionalidad entre la concentración y la respuesta obtenida, por lo que el método se considera lineal en el intervalo de 0.5 – 2.0 µg/mL.

**Tabla 20.** Linealidad del método.

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN LISINOPRIL (µg/mL)	AREA LISINOPRIL	CONC. INTERPOLADA	% DIF.
C11	20.00	2030308.0	19.62	1.91
C21	20.00	2071436.0	20.02	0.08
C31	20.00	2108769.0	20.38	1.88
C12	10.00	1005623.5	9.70	3.05
C22	10.00	1047277.0	10.10	0.99
C32	10.00	1061584.0	10.24	2.37
C13	5.00	499299.0	4.79	4.15
C23	5.00	519689.5	4.99	0.20
C33	5.00	525612.5	5.05	0.95
C14	2.00	224929.0	2.14	6.79
C24	2.00	215489.5	2.04	2.22
C34	2.00	214883.5	2.04	1.93
C15	1.00	115592.5	1.08	7.72
C25	1.00	99703.0	0.92	7.67
C35	1.00	100540.0	0.93	6.85
C16	0.50	66729.5	0.60	20.81
C26	0.50	48771.0	0.43	13.96
C36	0.50	50287.0	0.44	11.03
Pendiente(B) =	103275.6618			
Ordenada (A) =	4343.5870			
Coef.Reg.(r) =	0.999676			
Coef.Det.(r <sup>2</sup> ) =	0.999353			

### 9.3.3.2. Recobro absoluto

El recobro absoluto se evaluó a concentraciones de 0.5, 10.0 y 20.0 µg/mL. Para evaluar el recobro se prepararon por triplicado soluciones acuosas de Lisinopril a las concentraciones mencionadas y se inyectaron en la columna analítica. La respuesta promedio de las soluciones acuosas se utilizó para calcular el recobro del Lisinopril en el método. Así mismo se prepararon soluciones de orina adicionada a las concentraciones mencionadas y se procesaron por triplicado. El recobro se calcula mediante comparación directa de las áreas de las muestras procesadas contra las áreas promedio de las soluciones acuosas (sin procesar).

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Recobro absoluto a tres concentraciones dentro del intervalo establecido.

	CONCENTRACION		
	20.00	10.00	0.50
% RECOBRO	93.5	93.7	94.8
EN	91.7	94.4	87.6
ORINA	91.1	92.1	94.5
PROMEDIO	92.1	93.4	92.3
DESV. EST	1.2	1.2	4.1
%C.V.	1.3	1.3	4.4
%C.V. GLOBAL	2.5		

Aun cuando no existe una especificación para la prueba de recobro absoluto es importante que la misma sea reproducible a lo largo del intervalo, ya que esto asegurara una respuesta lineal y será un indicativo de la reproducibilidad del método.

#### 9.3.3.3. Precisión y exactitud.

Los experimentos de precisión y exactitud se llevaron a cabo durante dos días, analizando muestras homogéneas de orina adicionada, por quintuplicado, a tres concentraciones no incluidas en la curva (0.6, 6.0 16.0  $\mu\text{g/mL}$ ). La cuantificación se realizó con una curva preparada a partir de pesada independiente y cargada en una matriz diferente a la de las muestras.

Para cumplir con el criterio de aceptación para la prueba de precisión, el coeficiente de variación de las replicas debió de ser menor al 15.0%. tanto por día, global y por nivel de concentración.

Para la exactitud el criterio empleado fue que la cuantificación de las replicas no podía diferir más del 15% del valor real, tanto individual, global y por nivel de concentración.

La Tabla 22 muestra los resultados obtenidos en el primer día del experimento de precisión y exactitud. En este día los resultados cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos, ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a 15.0%, la diferencia de la concentración cuantificada con respecto la teórica no sobrepaso el límite de 15.0% en ninguna de los casos.

**Tabla 22.** Primer día de exactitud y precisión.

	CONCENTRACIÓN TEÓRICA		
	16.00	6.00	0.60
CONCENTRACION INTERPOLADA	15.70	5.50	0.58
	15.75	5.90	0.59
	15.53	5.50	0.58
	15.85	5.72	0.57
	15.27	5.63	0.58
PROMEDIO	15.62	5.65	0.58
DES. EST	0.2	0.2	0.0
% C.V.	1.5	3.0	1.5
% DIFERENCIA RESPECTO A LA TEORICA	1.9	8.4	2.8
	1.6	1.7	0.8
	2.9	8.3	2.9
	0.9	4.6	5.0
	4.6	6.2	3.5
% DIFERENCIA PROMEDIO	2.4	5.9	3.0

La Tabla 23 muestra los resultados obtenidos en el segundo día del experimento de precisión y exactitud. En este día los resultados cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a 15.0%, la diferencia de la concentración cuantificada con respecto la teórica no sobrepaso el límite de 15.0% ni individual ni global.

**Tabla 23.** Segundo día de precisión y exactitud.

	CONCENTRACIÓN TEÓRICA		
	16.00	6.00	0.60
CONCENTRACION INTERPOLADA	15.93	5.85	0.64
	15.47	5.54	0.63
	16.07	5.54	0.63
	16.01	5.31	0.69
	14.65	5.85	0.68
PROMEDIO	15.63	5.62	0.66
DES. EST	0.6	0.2	0.0
% C.V.	3.8	4.1	4.2
% DIFERENCIA RESPECTO A LA TEORICA	0.5	2.5	6.3
	3.3	7.7	5.7
	0.4	7.6	5.6
	0.0	11.4	14.4
	8.4	2.6	14.0
% DIFERENCIA PROMEDIO	2.3	6.4	9.2

La Tabla 24 muestra los resultados obtenidos para los dos días del experimento de precisión y exactitud. Los resultados globales cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos ya que el coeficiente de variación para las replicas fue menor a

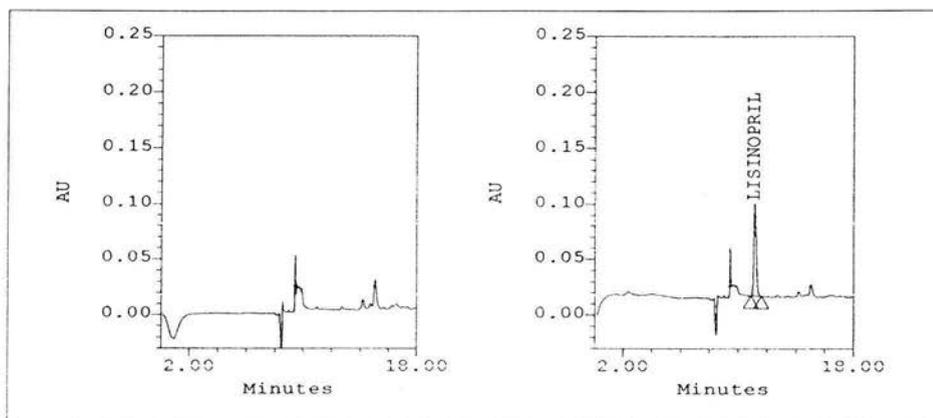
15.0% y la diferencia de la concentración cuantificada con respecto la teórica no sobrepasa el límite de 15.0%.

**Tabla 24.** Resultados globales de los experimentos de exactitud y precisión.

	CONCENTRACIÓN TEÓRICA		
	16.00	6.00	0.60
CONCENTRACION CUANTIFICADA	15.93	5.85	0.64
	15.47	5.54	0.63
	16.07	5.54	0.63
	16.01	5.31	0.69
	14.65	5.85	0.68
	15.70	5.50	0.58
	15.75	5.90	0.59
	15.53	5.50	0.58
	15.85	5.72	0.57
15.27	5.63	0.58	
PROMEDIO	15.62	5.63	0.62
DES. EST	0.4	0.2	0.0
% C.V.	2.7	3.4	7.0
% DIFERENCIA PROMEDIO	2.4	6.1	3.1

#### 9.3.3.4. Selectividad

La selectividad fue probada inyectando seis blancos de orina de diferentes fuentes, procesados de la misma manera que las muestras. El criterio de aceptación de esta prueba fue que ninguno de los blancos presentara señal al tiempo de retención del Lisinopril. Los seis blancos no presentaron señal al tiempo de retención del Lisinopril. En la figura 18 se muestra un cromatograma típico de un blanco de orina comparado con una solución de orina adicionada con Lisinopril a 10 µg/mL.



**Figura 18.** Cromatograma típico de un blanco de orina ( a la izquierda) contrastado contra una solución de orina adicionada a 10 µg/mL (a la derecha).

Los resultados de la verificación del método demuestran, que el método se comporta de manera lineal en el intervalo de 0.5-20  $\mu\text{g/mL}$ . El recobro absoluto es reproducible a lo largo del intervalo, lo que sumado a la precisión y exactitud mostrada durante cuantificación de Lisinopril, comprueba que no es necesaria la utilización de un estándar interno. La ausencia de señal al tiempo de retención de Lisinopril en los 6 blancos de orina de distintas fuentes, permiten intuir que durante el análisis de muestras el método se comportará de manera selectiva. Dado que se utilizaron diferentes fuentes de orina para cargar las muestras de la curva en el experimento de exactitud y precisión durante los dos días de análisis, se comprueba que la concentración cuantificada no se encuentra influenciado por la fuente de orina utilizada.

De acuerdo a todos los resultados anteriores se determina que el método desarrollado permite cuantificar de manera confiable al Lisinopril en orina humana a concentraciones comprendidas entre 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 20  $\mu\text{g/mL}$ , con un procesamiento de muestra sencillo, prácticamente automatizado.

## 10. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones experimentales necesarias para cuantificar de manera exacta y precisa Lisinopril en orina humana utilizando CLAR bidimensional, en un intervalo de concentraciones de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

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

El sistema de cromatografía empleado proporcionó parámetros cromatográficos adecuados, ya que el método desarrollado cumple con los requerimientos de sensibilidad, exactitud y precisión, para ser empleado en el análisis de muestras de estudios de bioequivalencia.

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

## 11. REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids en *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. USA. CRC Press. 1987: 25-31.
- <sup>2</sup> NOM-177-SSA1-1998. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a los que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas. *Diario Oficial* 05-07-1999.
- <sup>3</sup> Harris D. Introducción a las separaciones analíticas en *Análisis químico cuantitativo*. México. Grupo editorial Iberoamérica. 1992:604-607.
- <sup>4</sup> Fritz J. Introduction and principles y Practical considerations en *Analytical Solid Phase Extraction*. USA. John Wiley & Sons Inc. 1999:1-14 y 63-87.
- <sup>5</sup> Weston A. Instrumentation for high performance liquid chromatography en *HPLC and CE principles and practice*. USA. Academic Press. 1997:116-118.
- <sup>6</sup> Connors K. Liquid chromatography en *A textbook of pharmaceutical analysis*. New York. John Wiley & Sons Inc. 3<sup>a</sup> ed. 1987:373.
- <sup>7</sup> Skoog D. Introducción a las separaciones analíticas en *Fundamentos de química analítica*. Barcelona. Ed. Reverté S.A. 4<sup>a</sup> ed. 1997:667-686.
- <sup>8</sup> Darío R. Red Latinoamericana de Química "Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia" [en línea]. <<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm>> [consulta: 01 de Abril de 2003].
- <sup>9</sup> Florey editor Lisinopril en *Analytical profiles of drug substances and excipients- vol. 21:236-273*.
- <sup>10</sup> Windholdz M comp. *The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. USA. Merck & Co. 12ed. 1986:869.
- <sup>11</sup> Lunn, George. *HPLC Methods for pharmaceutical analysis*. USA. Jhon Wiley and Sons Inc. 1997: 836.
- <sup>12</sup> The United States Pharmacopeial Convention Inc. USP 25 2002 NF 20. USA. USP. 2002:1012-1013.
- <sup>13</sup> Erk N, Kartal M. Comparison of high performance liquid chromatography and absorbance methods for the determination of hydrochlorothiazide and lisinopril in pharmaceutical formulations. *Analytical Letters* 1999 Apr 32(6):1131-1141.
- <sup>14</sup> Bonazzi D, Gotti R. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997 Nov 16(3):431-438.
- <sup>15</sup> Barbato F, Morrica P. Analysis of ACE inhibitor drugs by high performance liquid chromatography. *Il Farmaco* 1994, 49: 457-460.
- <sup>16</sup> Ranadive S, Chen A. Relative lipophilicities and structural-pharmacological considerations of various angiotensina-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharmaceutical Research* 1992, 9: 1480-1486.
- <sup>17</sup> Kocijan A. Effect of column temperature on the behaviour of some angiotensina converting enzyme inhibitors during high performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, 2001, 755:229-235.
- <sup>18</sup> Tracqui A, Kintz P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD. *Journal of Forensic Science* 1995, 40: 254-262.

- <sup>19</sup> Wong Y, Charles B. Determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1995, 673: 306-310.
- <sup>20</sup> Anzenbacherová E. Determination of enzyme (angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 2001, 24:1151-1156.
- <sup>21</sup> Goodman A. comp. *Cardiovascular Drugs en The pharmaceutical basis of therapeutics*. New York. Mc. Graw-Hill. 8<sup>a</sup>ed. 1993:760-761.
- <sup>22</sup> Thomson PLM. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. México. PLM 48<sup>a</sup> ed. 2002:1866-1867.