



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA PERFILES DE DISOLUCIÓN
DE LISINOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA
EN TABLETAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ARACELI GUERRERO BARRERA

ASESORA: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

m. 344932



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo y Validación de un Método Analítico para Perfiles de Disolución de Lisinopril e Hidroclorotiazida en Tabletas.

que presenta la pasante: Araceli Guerrero Barrera
con número de cuenta: 09306520-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de ENERO de 2005

PRESIDENTE	<u>Q. Juan José Mendoza Flores</u>	
VOCAL	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Juan Chiu Chan</u>	

PRÓLOGO

En muchas ocasiones, cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con un método analítico que cumpla con el atributo de confiabilidad. Como es bien sabido, un proceso que permite desarrollar este fin, es la validación.

El presente es un trabajo que se escribió con el objeto de dar apoyo a los investigadores, estudiantes y usuarios en general sobre el tema de Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos.

El propósito fundamental fue desarrollar y validar un método analítico para determinar de manera simultánea Lisinopril e Hidroclorotiazida en tabletas.

La importancia de este estudio radica en la escasez de bibliografía sobre el desarrollo de este método para cuantificar al mismo tiempo ambos analitos.

Este escrito, es el resultado de numerosos estudios bibliográficos y experimentales (realizados en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia en la FES Cuautitlán) que intentan adentrar al lector de una manera fácil de cómo desarrollar y validar un método analítico.

No se puede pasar por alto el hecho de que el factor más importante en el Desarrollo y Validación de Métodos es siempre el criterio del profesional, responsable de esta decisión, criterio que hay que aplicar después de tomar en cuenta los factores relacionados con el (los) principio activo(s). El contenido de

este trabajo solo es un soporte para aquellas personas que estén interesadas acerca del tema y que no limita de ningún modo el profundizar, de manera particular, sobre el mismo.

Al inicio se plantean las generalidades de los principios activos en cuestión, en este caso, Lisinopril e Hidroclorotiazida, continúa luego con los siguientes temas: análisis de multicomponentes, desarrollo de métodos analíticos, haciendo hincapié sobre el método de Mínimos Cuadrados Parciales - método que fue aplicado en este trabajo- y validación de métodos. Asimismo ofrece todo el proceso experimental apoyado de gráficos y tablas para facilitar el entendimiento de cada paso experimental realizado. Incluso, cuenta con una lista de abreviaturas para allanar la comprensión del lector. También muestra un anexo que ilustra la forma de como fueron preparadas las soluciones. Finalmente, proporciona las fórmulas y las referencias bibliográficas utilizadas.

Se considera que esta obra puede ser de gran utilidad no solo para los estudiantes de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo sino también para todas las carreras afines a ella.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo contribuyeron directa e indirectamente muchas personas, algunas de las cuales quiero mencionar especialmente:

Antes que a nadie quiero agradecer a Dios por haberme dado fuerzas en los momentos más difíciles de mi vida y por haberme dado la sabiduría para seguir por un buen camino.

Mamá, gracias por estar siempre conmigo, pero sobre todo por tu confianza y amor.

Papá, gracias por apoyarme siempre y por enseñarme que la vida no es tan fácil de cómo uno lo desearía.

Tita, agradezco tu amor, consejos, sabiduría y tu fe en mí.

Mari y Juan, gracias por su ejemplo, sus consejos y su apoyo.

Carlos y Sandra, agradezco enormemente su apoyo.

Carlitos, Vanesa, Minerva, Iván y Jessy, gracias por ser el motor de mi vida.

Jeanette, gracias por ser mi mejor amiga.

Claus, agradezco tu respaldo pero sobre todo tu amistad.

Agradezco a mis sinodales por colaborar para mejorar este trabajo.

Profesor Juan José Mendoza, gracias por contribuir para mejorar este trabajo.

Dra. Raquel, Profesor Juan José Díaz y Profesor Rodolfo, gracias por la confianza y la ayuda que me brindaron.

Profesor Pepe, agradezco enormemente su ayuda pero sobre todo su amistad.

Profesor Juan Chiu, gracias por contribuir a mejorar este trabajo.

ICT Mexicana y Laboratorios Kendrik, gracias por el apoyo en la realización de este trabajo.

Adriana y Lupita, gracias por compartir sus conocimientos, pero sobre todo, gracias por ser mis amigas.

Aydée, Oscar, Masche y Chio, gracias por su amistad y por hacer más agradable mi estancia en el LEM Farmacia.

Quique, gracias por ser mi amigo.

Tere, gracias por tu ayuda y amistad.

Mariné, Marlene, Ismael, Lupa, Chelo, Víctor, Tania Aranda, Tere, Hugo, Paco, Gus, Adán, Luis, Chapa, Chema, Miriam, Gerardo, Berna, Isa, Tania Alcántara, Álvaro, Juanita, Fabiola, Bety, Javo, gracias por hacer mi vida mas alegre.

De manera particular, agradezco a la UNAM (FES Cuautitlán C1) por haber forjado un puma más de sangre azul y piel dorada.

Finalmente, quiero agradecer a la persona, que sin ella no hubiese sido posible nada, ella sabe quien es.

Nota: Espero no haber omitido a nadie y si así fue, es mera coincidencia.

CONTENIDO

Prólogo.....	4
Abreviaturas.....	12
Objetivos.....	15
Introducción.....	16
1- Marco teórico.....	18
1.1- Monografía de Lisinopril.....	19
1.1.1- Nombre químico.....	19
1.1.2- Estructura química.....	19
1.1.3- Fórmula molecular.....	19
1.1.4- Peso molecular.....	19
1.1.5- Descripción.....	19
1.1.6- pka's.....	19
1.1.7- Solubilidad.....	20
1.1.8- Uso.....	20
1.1.9- Farmacocinética.....	20
1.1.10- Modo de acción.....	20
1.1.11- Productos de degradación.....	20
1.1.12- Coeficientes de absortividad.....	20
1.1.13- Espectros UV.....	21
1.2- Monografía de Hidroclorotiazida.....	22
1.2.1- Nombre químico.....	22
1.2.2- Estructura química.....	22

1.2.3- Fórmula molecular.....	22
1.2.4- Peso molecular.....	22
1.2.5- Descripción.....	22
1.2.6- pka's.....	22
1.2.7- Solubilidad.....	23
1.2.8- Punto de fusión.....	23
1.2.9- Uso.....	23
1.2.10- Farmacocinética.....	23
1.2.11- Modo de acción.....	23
1.2.12- Productos de degradación.....	23
1.2.13- Espectros UV.....	23
1.3- Análisis de multicomponentes.....	25
1.4- Estrategias analíticas óptimas.....	27
1.5- Criterios para seleccionar un método analítico.....	27
1.6- Desarrollo de métodos analíticos.....	28
1.7- Desarrollo de pruebas de disolución.....	30
1.7.1- Perfil de disolución.....	31
1.8- Análisis Multivariado.....	32
1.8.1- Calibración Multivariante.....	34
1.8.1.1- Fundamentos.....	34
1.8.1.2- Modelos de Calibración Lineales.....	37
1.8.1.3- Método de mínimos cuadrados parciales (MCP).....	40
1.8.1.3.1- Algoritmo para el método de MCP.....	41
1.8.1.3.2- Etapa de Calibración.....	41
1.8.1.3.3- Etapa de predicción.....	46
1.8.1.3.4- Validación del Modelo de Clasificación.....	46
1.8.1.3.5- Validación Cruzada.....	48
1.9- Tipo de errores.....	49
1.10- Validación de métodos analíticos.....	53

1.10.1- ¿Porqué validar?.....	54
1.10.2- Definición y características.....	55
1.10.3- Criterios y requisitos para la evaluación de perfiles de perfiles de disolución en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata.....	58
1.10.3.1- En cuanto al equipo.....	58
1.10.3.2- En cuanto al Perfil de disolución.....	58
1.10.3.3- En cuanto al método analítico.....	60
1.10.3.3.1- Validación del sistema.....	60
1.10.3.3.2- Validación del método.....	60
2- Parte experimental.....	63
2.1- Equipo, software.....	64
2.2- Material.....	64
2.3- Desarrollo experimental.....	66
2.4- Resultados y discusión.....	67
2.4.1- Desarrollo del método analítico.....	67
2.4.1.1- Aditividad e Interferencia.....	69
2.4.1.2- Interacción.....	70
2.4.2- Desarrollo y validación del modelo.....	74
2.4.2.1- Selección del número óptimo de factores.....	74
2.4.2.2- Elección de las soluciones estándar.....	75
2.4.3- Condiciones óptimas para el método.....	79
2.4.4- Ensayo analítico.....	80
2.4.5- Validación del método analítico.....	81
2.4.5.1- Validación del sistema.....	81
2.4.5.1.1- Linealidad.....	81
2.4.5.1.2- Precisión y exactitud.....	86
2.4.5.2- Validación del método.....	88
2.4.5.2.1- Linealidad.....	88

2.4.5.2.2- Precisión y exactitud.....	94
2.4.5.2.3- Repetibilidad y reproducibilidad.....	96
2.4.5.2.4- Límite de cuantificación y límite de detección.....	103
2.4.5.2.5- Sensitividad.....	105
2.4.5.2.6- Estabilidad de la muestra procesada.....	107
3- Conclusiones.....	110
4- Apéndice.....	112
4.1- Criterios de aceptación para la validación del método.....	113
4.2- Preparación de soluciones.....	115
4.3- Disolución.....	119
4.4- Cálculos matemáticos.....	121
4.4.1- Análisis de variancia para reproducibilidad.....	121
4.4.1.1- Modelo factorial anidado-cruzado.....	121
4.4.2- Límite de cuantificación y límite de detección.....	124
4.4.3- Sensitividad.....	125
4.4.4- Estabilidad de la muestra procesada.....	127
5- Anexo.....	128
5.1- Índice de tablas.....	129
5.2- Índice de figuras.....	131
6- Referencias bibliográficas.....	133

ABREVIATURAS

A	Analista
Add	Adicionada
ANADEVA	Análisis de Variancia
°C	Grados Centígrados
CM	Promedio de los cuadrados
Conc.	Concentración
CV	Coeficiente de Variación
D	Día
ϵ	Coeficiente de absortividad molar
E	Error
E _{ap}	Error de apreciación
ECA	Enzima angiotensina convertasa
E _{est}	Errores estadísticos o aleatorios
E _{ex}	Error de exactitud
E _{in}	Error de interacción
Est	Estimada
Fig.	Figura
F.V.	Fuente de Variación
g	Gramos
gl	Grados de Libertad
HCl	Ácido Clorhídrico
HCT	Hidroclorotiazida
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

HPLTC	Cromatografía en Placa de Alta Resolución
IC	Intervalo de Confianza
I_0	Intensidad de luz que incide sobre la muestra
I_t	Intensidad de luz transmitida por la muestra
λ	Longitud de Onda
L	Litro
LIC _b	Límite Superior de Confianza para la ordenada al origen
LSC _b	Límite Superior de Confianza para la ordenada al origen
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
Log	Logaritmo
LSP	Lisinopril
LSP-HCT	Mezcla de Lisinopril e Hidroclorotiazida
μg	Microgramos
m	Metro
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
MCP1	Mínimos Cuadrados Parciales para regresión múltiple
MCP2	Mínimos Cuadrados Parciales para regresión multivariante
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MLR	Regresión Lineal Múltiple
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
Outliers	Muestras desechables
PCR	Regresión por Componentes Principales
Pr	Potencia radiante cuando el haz de luz pasa a través de la muestra

Ps	Potencia radiante cuando el haz de luz pasa a través de la Celda
R	Coefficiente de Correlación
R ²	Coefficiente de Determinación
rpm	Revoluciones por Minuto
s	Segundo
SC	Suma de Cuadrados
SCERP	Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción
Sol.	Solución
Sol. Plac	Solución Placebo
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

OBJETIVO GENERAL

- ♣ Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de Lisinopril-Hidroclorotiazida a fin de que pueda ser utilizado en el estudio de disolución de tabletas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Caracterizar el comportamiento espectrofotométrico en función de la concentración de la mezcla Lisinopril-Hidroclorotiazida.
- ◆ Seleccionar las condiciones de operación que permitan la cuantificación de cada uno de los analitos en la mezcla.
- ◆ Optimizar las condiciones de operación para la determinación de los analitos en la mezcla.
- ◆ Validar el método analítico.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito de las ciencias de la medida o metrología, las variables químicas y físicas, o de cualquier otro tipo, se miden mediante “procedimientos de ensayo”. En Química Analítica, los procedimientos de ensayo se suelen denominar “métodos analíticos”.

En nuestros días, una de las preocupaciones en el campo farmacéutico es encontrar métodos analíticos confiables que demuestren la calidad de sus productos. Sin embargo, esto no es una tarea fácil, ya que un método analítico depende de factores, tales como, la pureza de los reactivos, el funcionamiento de los instrumentos y aparatos, lo cual nos conduce a establecer criterios para determinar la confiabilidad de los resultados.

Un proceso que demuestra la confiabilidad de los resultados es la validación, la cuál es definida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos como el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002, p 11. Mientras que para la NOM 177 es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado y las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. NOM 177, 1998.

La validación de métodos analíticos es una parte esencial del programa de aseguramiento de la calidad de un laboratorio. Por lo tanto, para evaluar dicha calidad y para desarrollar nuevas formulaciones es necesario realizar el perfil de disolución a las formas farmacéuticas orales. Cabe mencionar entonces que disolución es el proceso por el cual un compuesto químico o fármaco sólido llega a estar disuelto en un disolvente, formándose una solución heterogénea controlada por la afinidad entre la sustancia sólida y el disolvente. ^{Morales, 2003, p 19.}

El uso de técnicas espectrofotométricas resulta ser un enfoque atractivo para la Industria Farmacéutica, debido a su buen funcionamiento y sus costos relativamente bajos con respecto a otras técnicas analíticas.

Recientemente, los métodos quimiométricos multivariados parecen ser las técnicas que muestran un mejor funcionamiento en términos de resolución de muestras con un alto grado de complejidad. La aplicación de estas técnicas ofrece como principal ventaja la rápida resolución de sistemas complejos sin la necesidad de separarlos previamente. Una de estas técnicas es la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP).

En este trabajo, se aplicó exitosamente la técnica analítica espectrofotométrica Ultra Violeta utilizando el método de MCP para la cuantificación de la mezcla de Lisinopril (LSP) e Hidroclorotiazida (HCT), buscando seleccionar y optimizar las condiciones de operación para la especificidad del método y demostrar su confiabilidad.

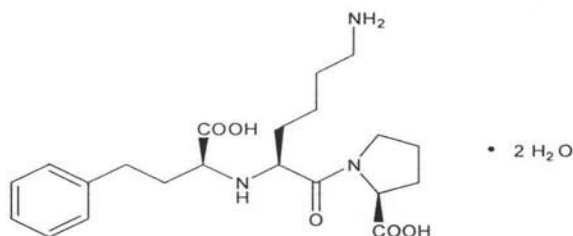
**MARCO
TEÓRICO**

1.1- MONOGRAFÍA DE LISINOPRIL O'Neil, 2001, p 989

El Lisinopril (LSP) es un inhibidor de la enzima angiotensina convertasa (ECA). La inhibición de la angiotensina II, produce vasodilatación y descenso de la presión arterial. Reduce concentraciones de plasma de aldosterona y angiotensina a través de la inhibición de la ECA. Paraskevas, 2002, p 865-872,859.

1.1.1- NOMBRE QUÍMICO: (s)-1-[N²-(1-Carboxi-3-fenilpropil-L-lisil)-L-prolina dihidrato.

1.1.2- ESTRUCTURA QUÍMICA



1.1.3- FÓRMULA MOLECULAR: C₂₁-H₃₁-N₃-O₅-2 H₂O.

1.1.4- PESO MOLECULAR: 441.52 g mol⁻¹

1.1.5- DESCRIPCIÓN: Polvo blanco cristalino.

1.1.6- pKa's: 2.5, 4.0, 6.7, 10.1

1.1.7- SOLUBILIDAD: En metanol 14 mg mL⁻¹; etanol menos de 0.1 mg mL⁻¹; acetona menos de 0.1 mg mL⁻¹; acetonitrilo menos de 0.1 mg mL⁻¹; cloroformo menos de 0.1 mg mL⁻¹; N,N-dimetilformamida menos de 0.1 mg mL⁻¹. En agua 97 mg mL⁻¹ a 25° C.

1.1.8- USO: Es un inhibidor de la ECA, usado en el tratamiento de hipertensión y paro cardíaco, profilácticamente después del infarto al miocardio y en neuropatía diabética.

1.1.9- FARMACOCINÉTICA: Después de la administración oral de LSP, las concentraciones séricas pico ocurren dentro de las siguientes siete horas. En dosis múltiple tiene una vida media de acumulación efectiva de 12.6 horas. El decremento de las concentraciones séricas demuestra una fase terminal prolongada que no contribuye a la acumulación del fármaco. El LSP no aparece unido a otras proteínas séricas. La insuficiencia renal disminuye su eliminación pero esta disminución es clínicamente importante sólo cuando la tasa de filtración glomerular es menor a 30 mL min⁻¹.

1.1.10- MODO DE ACCIÓN: Disminuye la conversión de angiotensina I a angiotensina II, la cual es un potente vasoconstrictor, como resultado promueve vasodilatación y reduce la secreción de aldosterona. Se ha sugerido un aumento de las síntesis de prostaglandinas, sin embargo no ha sido comprobado.

1.1.11- PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN: En medio ácido, dicetopiperazina, en medio neutro y básico, la descomposición es mínima.

1.1.12- COEFICIENTES DE ABSORTIVIDAD: 246 nm: 4.0, 254 nm: 4.5, 258 nm: 5.1, 261nm: 5.1, 267 nm: 3.7

1.1.13- E SPECTRO ULTRAVIOLETA: En solución acuosa presenta picos a 206 y 191 nm. En medio ácido a 206 nm. En medio alcalino a 216, 197 y 195 nm.

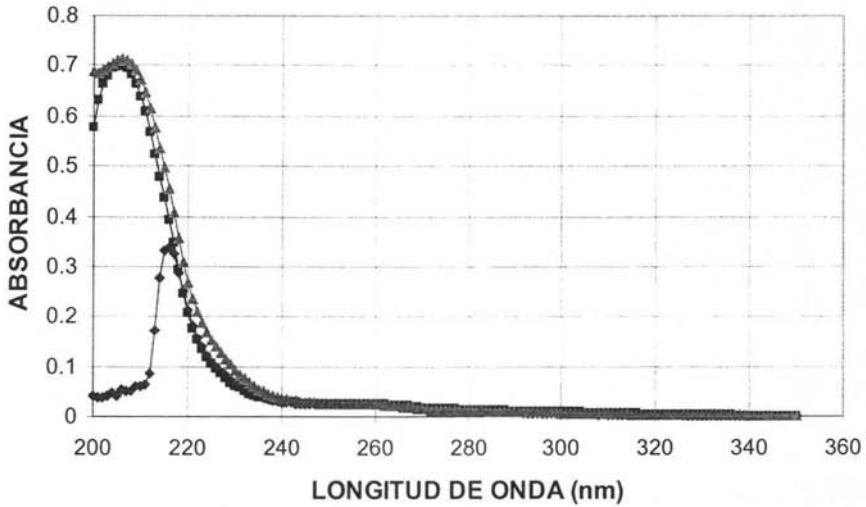


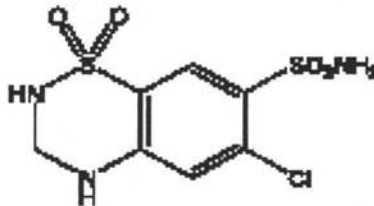
Fig 1. Espectros de absorción en UV LSP $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ en HCl 0.1 (◄) en NaOH 0.1 N (▲) y en solución acuosa (◄) en el rango de 200 – 350 nm.

1.2- MONOGRAFÍA DE HIDROCLOROTIAZIDA^{Osol, 1975, p 872.}

La HCT es un agente diurético y antihipertensor: La utilización de este fármaco por sí solo produce un aumento de la secreción de renina. Aunque el LSP por sí solo es antihipertensivo, aún en pacientes con hipertensión y cifras de renina baja, la administración concomitante con HCT, resulta en una mayor reducción de la presión arterial. El LSP atenúa la pérdida de potasio que se asocia con la HCT.

1.2.1- NOMBRE QUÍMICO: 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1, 2, 4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido

1.2.2- ESTRUCTURA QUÍMICA



1.2.3- FÓRMULA MOLECULAR: C₇H₈ClN₃O₄S₂

1.2.4- PESO MOLECULAR: 297.75 g mol⁻¹

1.2.5- DESCRIPCIÓN: Polvo blanco cristalino^{McEvoy, 2002, p 2568.}

1.2.6- pka's: 7.9 y 9.2^{Osol, 1975, p 872.}

1.2.7- SOLUBILIDAD: Fácilmente soluble en solución de hidróxido de sodio, n-butilamina y en dimetilformamida, bases diluidas, parcialmente en metanol, etanol o acetona, ligeramente soluble en agua; insoluble en ácidos minerales diluidos. LOWE J., 1979, p 360-362

1.2.8- PUNTO DE FUSIÓN: 273-275 °C Hardman, 1996, p 772

1.2.9- USO: Es usado en el tratamiento de edema asociado con paro cardíaco y desordenes hepáticos y renales.

1.2.10- FARMACOCINÉTICA: Cuando los niveles plasmáticos han sido seguidos por 24 horas, la vida media plasmática varía entre 5.6 y 14.8 horas. Finalmente el 61% de la dosis es eliminada sin cambio dentro de 24 horas. Después de su administración oral la diuresis se inicia a las 2 horas, llega al máximo en 4 horas y permanece de 6 a 12 horas.

1.2.11- MODO DE ACCIÓN: La HCT es un agente diurético y antihipertensor, actúa reduciendo la reabsorción de electrolitos desde los túbulos renales, por eso aumenta la excreción de iones cloruro y de sodio y por consiguiente del agua. La excreción de otros iones, tales como magnesio y potasio es también aumentada por la HCT, mientras que la pérdida de calcio es reducida.

1.2.12- PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN: Por hidrólisis, 4-amino-6-cloro-1,3-benzendisulfonamida y formaldehído.

1.2.13- ESPECTRO ULTRAVIOLETA: En solución acuosa presenta picos a 316, 271 y 225 nm. En medio ácido a 316, 271, 225 y 196 nm. En medio alcalino a 322, 273 y 221 nm.

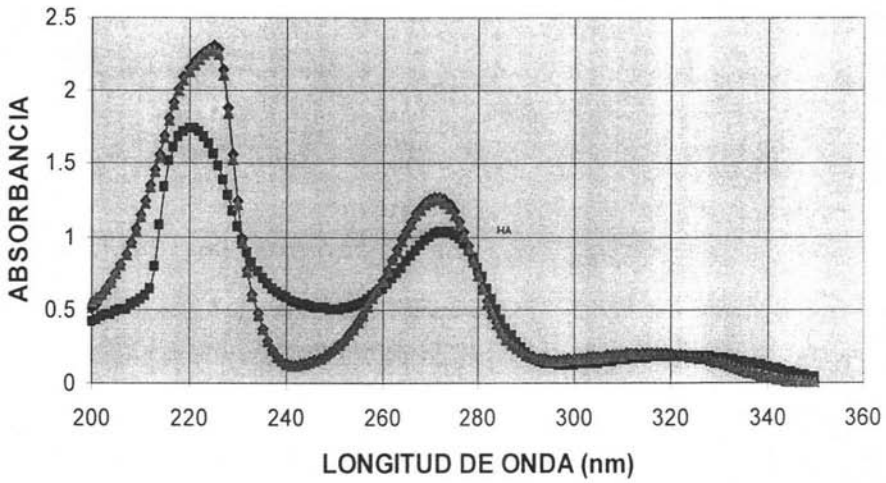


Fig 2. Espectros de absorción en UV HCT $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ en HCl 0.1 (→) en NaOH 0.1 N (←) y en solución acuosa (↔) en el rango de 200 – 350 nm.

1.3- ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES

La quimiometría se define como la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para el diseño o selección de procedimientos experimentales óptimos, a través del análisis de datos químicos.

Desde el punto de vista de la quimiometría, el proceso de análisis puede dividirse en dos etapas:

- a) Optimización/diseño experimental: se busca una alta eficiencia experimental al diseñar e implementar un análisis a partir de la recopilación de información útil.

- b) Análisis de multicomponentes: tiene una amplia aplicación dentro del análisis farmacéutico, el desarrollo de procesos y formulaciones, además es una herramienta en la caracterización de partículas, el establecimiento de porcentajes de disolución y estudios de permeabilidad, entre otras aplicaciones. Gómez, 1998, p 14.

Existen dos diferentes estrategias para aplicar métodos instrumentales en los análisis de multicomponentes y por lo tanto, dos posibles enfoques para dichos análisis, los cuales son mostrados en la figura 3.

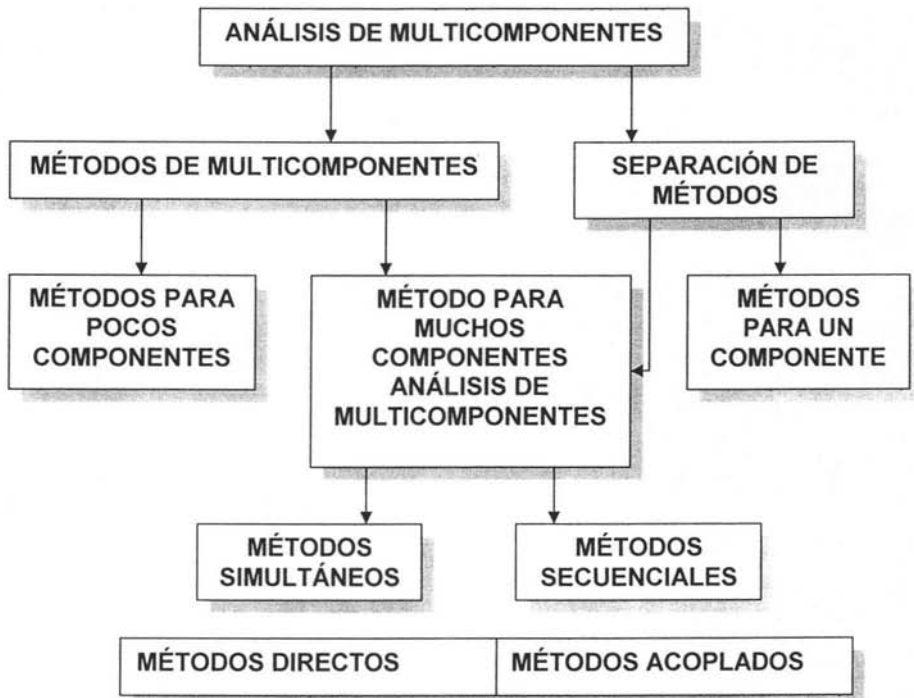


Fig. 3. Posibles análisis de multicomponentes Eckschiager, Vol. 128, 1994, p134.

1) El directo es un método bidimensional con la suficiente resolución para registrar las señales de componentes indistintos.

2) Una técnica acoplada es aquella que separa y determina las señales.

1.4- ESTRATEGIAS ANALÍTICAS ÓPTIMAS Eckschlager, 1994, p 165-166.

El encontrar la estrategia quimiométrica o analítica óptima en el desarrollo de métodos, involucra los siguientes pasos:

- a) Elegir el sistema más adecuadamente considerando la técnica o método analítico.
- b) Optimizar el procedimiento analítico por medio de análisis estadístico y diseños experimentales.
- c) Extraer la información útil de los datos experimentales para analizarlos e interpretarlos.

1.5- CRITERIOS PARA SELECCIONAR UN MÉTODO ANALÍTICO Skoog, 2001, p11, 12.

Para poder seleccionar correctamente un método analítico, es esencial definir con claridad la naturaleza del problema analítico, y esta definición requiere contestar a las siguientes preguntas:

- 1- ¿Qué exactitud se requiere?
- 2- ¿De cuánta muestra se dispone?
- 3- ¿En qué intervalo de concentraciones está el analito?
- 4- ¿Qué componentes de la muestra interfieren?
- 5- ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la matriz de la muestra?
- 6- ¿Cuántas muestras hay que analizar?

Es de vital importancia la respuesta a la primera pregunta, ya que determina el tiempo y el esmero que requerirá el análisis. Las respuestas a la segunda y tercera determinan lo sensible que debe ser el método y al intervalo de

concentraciones a la que debe adaptarse. La respuesta a la cuarta pregunta determina qué selectividad se requiere. Es importante la respuesta a la quinta pregunta porque algunos de los métodos analíticos sirven para disoluciones. Otros se aplican con mayor facilidad a muestras gaseosas, mientras que otros métodos son más adecuados para el análisis directo de sólidos. Una consideración importante desde el punto de vista económico es el número de muestras a analizar.

Existen otras características importantes que se deben tener en cuenta:

- 1- Velocidad.
- 2- Facilidad y comodidad.
- 3- Habilidad del operador.
- 4- Costos y disponibilidad del equipo.
- 5- Costos por muestra.

1.6- DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Gómez, 1998, p 2-4.

El desarrollo de métodos analíticos se refiere a los experimentos realizados para obtener procedimientos capaces de identificar y/o cuantificar una sustancia dada. Por tanto, lo primero que se debe de determinar es:

- Objetivos.
- El (los) analito(s) de interés.
- Si existen métodos que puedan ser adaptados u optimizados.

Posteriormente se buscan las propiedades fisicoquímicas relevantes (estabilidad, pKa, absortividad; coeficiente de absortividad, etc.) y si el(los) analito(s) es (son) estable(s) en diferentes condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad). Esto nos va ayudar a determinar las condiciones con las que se debe de trabajar.

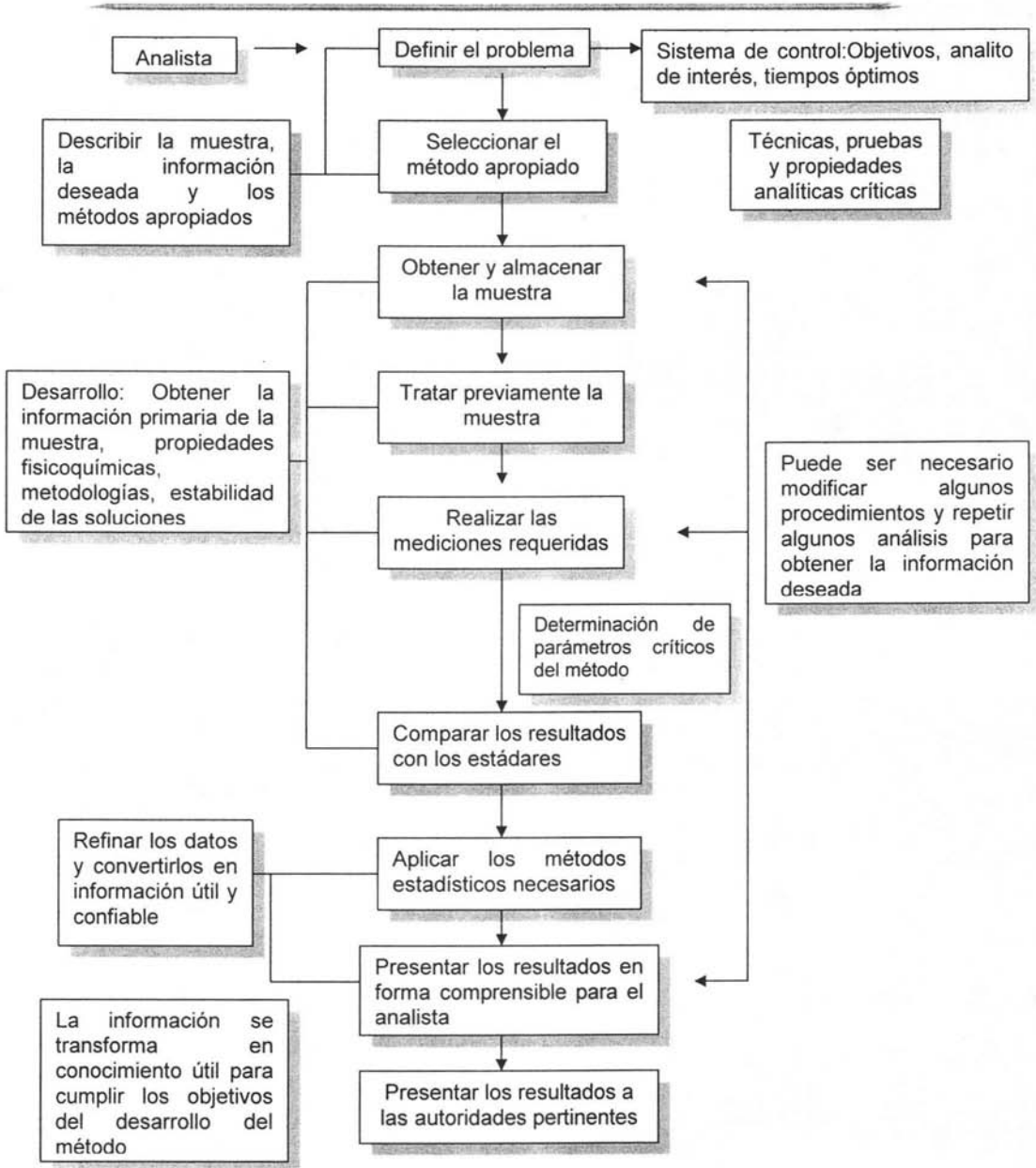


Fig. 4. Etapas principales en el desarrollo de métodos analíticos.

Una estrategia para elegir el método analítico, es seleccionar el conjunto de instrumentos que se encuentren en el laboratorio o con los que el analista esté familiarizado. Tomando en cuenta, el tiempo de duración, la confiabilidad, los costos y la factibilidad del método.

En la figura 4, se presentan las etapas principales en el desarrollo de métodos analíticos.

Existen diversos métodos para la determinación simultánea de mezcla de fármacos, tales como HPLC, HPTLC, espectrofotometría UV/VIS, calorimetría, espectrofluorometría. Este trabajo se realizará mediante espectrofotometría UV aplicando el método de MCP.

Una vez que el método ha sido desarrollado debe realizarse un estudio de validación antes de que el método pueda ser incluido en un documento regulatorio y sea usado.

1.7- DESARROLLO DE PRUEBAS DE DISOLUCIÓN

El diseño y aplicación apropiada de las pruebas de disolución "in vitro" contribuyen en el desarrollo de un producto farmacéutico y forman parte del control de calidad del mismo, ya que permiten:

- El seguimiento de los procesos de formulación.
- Su optimización.
- El monitoreo del desempeño del proceso de manufactura.
- La disminución del riesgo de bioequivalencia de lote a lote.
- Obtener la aprobación regulatoria del producto, etc.

1.7.1- PERFIL DE DISOLUCIÓN García, México, 2002.

En la industria farmacéutica se tiene como objetivo constatar que dos productos diferentes tienen el mismo efecto en el ser humano. Numerosas pruebas estadísticas se emplean para lograr dicho objetivo y se aplican a diferentes tipos de mediciones, dentro de las cuales se encuentran los perfiles de disolución. Las tabletas son disueltas en alguna sustancia "in vitro" y se mide el porcentaje disuelto a diferentes tiempos, con estos datos se construye una gráfica de porcentaje disuelto contra tiempo, esto es lo que recibe el nombre de **perfil de disolución**.

El ensayo de disolución constituye una técnica relativamente rápida y económica para la evaluación de materias primas y formas farmacéuticas. Este ensayo ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a la gran cantidad de aplicaciones prácticas que posee. En ciertos casos la aprobación de los fármacos por la FDA de acuerdo al ensayo de disolución *in vitro* es una condición suficiente para aceptar su comercialización. Para algunos fármacos es necesario demostrar su biodisponibilidad si no logran una adecuada disolución cuando se comparan con el estándar de prueba. Los perfiles de disolución pueden ser además utilizados para establecer los requerimientos y las especificaciones *in vitro* de los productos genéricos.

La comparación de los perfiles de disolución *in vitro* de cápsulas, tabletas y polvos le proporciona al tecnólogo la información necesaria para discernir entre las formulaciones durante el desarrollo del producto, evaluar su estabilidad y optimizar la forma de dosificación. La comparación de las curvas permite además evaluar el efecto producido en la disolución por los cambios en las variables del proceso de manufactura y puede ser empleada como un

instrumento de aseguramiento de la calidad para medir la uniformidad de lote a lote.

Una evaluación satisfactoria del perfil de disolución permite una predicción de una buena biodisponibilidad in vivo, es decir, el medicamento alcanzaría el nivel terapéutico en el tiempo adecuado.

Un problema significativo en esta área es cómo cuantificar el grado de similitud o diferencia entre dos curvas. Muchos autores han trabajado en este sentido. Algunos han ajustado los datos experimentales a una ecuación polinomial a partir del análisis de mínimos cuadrados y han utilizado los coeficientes de la polinomial para la comparación de las curvas; otros han utilizado la función de Weibull, así como el empleo de técnicas estadísticas como el diseño Split-plot, entre otras.

1.8- ANÁLISIS MULTIVARIADO

Cuando en una disolución hay más de una especie absorbente, el espectrofotómetro detecta la suma de absorbancias de todas las especies. El instrumento no puede distinguir la fracción de absorbancia que corresponde a cada molécula. Sin embargo, si las distintas especies tienen absorptividades diferentes a diferentes longitudes de onda y conocemos el espectro de los componentes puros, podemos descomponer matemáticamente el espectro de la mezcla en los espectros de sus componentes.

La clave que nos permite analizar mezclas es que a cada longitud de onda la absorbancia de una disolución (que contiene especies X, Y, Z...) es la suma de las absorbancias de cada una de las especies.

Absorbancia de una mezcla: $A = \epsilon_x b [X] + \epsilon_y b [Y] + \epsilon_z b [Z] + \dots$

donde ϵ es la absorptividad molar de cada especie a la longitud de onda en cuestión y b la longitud del paso de la celda. Harris, Daniel C., 2001, p 531

Sin embargo, muchas veces los espectros de los componentes se superponen a una misma longitud de onda, por lo cual no se puede utilizar un método directo. Así que cuando se presentan estos casos, frecuentemente los analitos son separados y cuantificados de manera individual. Para evitar esto, se utilizan los llamados métodos multivariados.

Los métodos multivariados son extraordinariamente útiles para ayudar a los investigadores a hacer que tengan sentido conjuntos grandes de datos, complicados y complejos que constan de una gran variedad de variables medidas en número de unidades experimentales.

La importancia y la utilidad de los métodos multivariados aumentan al incrementarse el número de variables que se están midiendo y el gran número de unidades experimentales que se están evaluando.

A menudo, el objetivo primario de los análisis multivariados es resumir grandes cantidades de datos por medio de relativamente pocos parámetros. El tema subyacente de muchas técnicas multivariadas es la simplificación. A menudo, el interés de los análisis multivariados es encontrar relaciones entre las variables de respuesta, las unidades experimentales y ambas. Se podría decir que existen relaciones entre las variables respuesta cuando, en realidad, algunas de las variables están midiendo una cantidad común.

Muchas técnicas multivariadas tienden a ser de naturaleza exploratoria en lugar de confirmatoria. Es decir, muchos métodos multivariados tienden a mostrar hipótesis en lugar de probarlas. Los métodos estadísticos tradicionales suelen exigir que un investigador establezca algunas hipótesis, reúna algunos datos y, a continuación, use estos datos para comprobar o rechazar esas hipótesis. Una situación alternativa que se da frecuentemente es un caso en el cual el investigador dispone de una gran cantidad de datos y se pregunta si pudiera haber una información valiosa en ellos.

Las técnicas multivariadas suelen ser útiles para examinar los datos en un intento por saber, si hay información que valga la pena y sea valiosa en esos datos.

Por otro lado, el desarrollo del software especializado en técnicas quimiométricas permite actualmente la aplicación de poderosos algoritmos matemáticos para la resolución de sistemas químicos complejos, utilizando múltiples señales analíticas, que debido a las interferencias presentes en la determinación, desviaciones de la linealidad, ruido, etc., no es posible resolver directamente.^{Sia, 1988, p 765, Cladera, 1997, p 350, 163.} Entre estos algoritmos se encuentran la Regresión Lineal Múltiple (MLR), la Regresión por Componentes Principales (PCR), la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) y las Redes Neuronales Artificiales, por citar algunos. En este trabajo solo mencionaremos el método de MCP.

1.8.1 - CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE Amador, México, 1999.

1.8.1.1- Fundamentos

La calibración multivariante comprende una serie de técnicas matemáticas que constituyen una herramienta de reconocida selectividad y confiabilidad en

el análisis cuantitativo multicomponente, aplicable en la determinación de micro y/o macrocomponentes en muestras complejas de distinta naturaleza y bajo diversas técnicas instrumentales de análisis (Espectroscopía UV-Visible, Cromatografía de Gases, Resonancia Magnética Nuclear, Electroforesis, Espectroscopía de Masas, etc.). Entre las principales ventajas que ofrece están la simplificación en la preparación de las muestras e incremento en la capacidad analítica y confiabilidad de los instrumentos tradicionales.

El nombre de calibración multivariante se deriva del siguiente hecho: puede decirse que calibrar consiste en usar datos empíricos y conocimientos previos para establecer cómo predecir cuantitativamente información desconocida Y (variable dependiente) a partir de mediciones disponibles X (variable independiente), a través de alguna función matemática de transformación.

La calibración multivariante significa entonces utilizar simultáneamente numerosas variables X (x_1, x_2, \dots, x_k) para determinar cierta(s) variable(s) Y . Como su propósito fundamental en química analítica es establecer la fórmula de predicción $Y = f(X)$, se asume que X corresponde a las mediciones instrumentales e Y a la cantidad de analito(s); por ejemplo, X pueden ser mediciones cromatográficas o espectroscópicas e Y la concentración de una especie a determinar.

Para predecir la información Y a partir de X debe identificarse la fórmula de predicción $Y = f(X)$ que describa el modelo de calibración del sistema en estudio, a través de alguno de los distintos métodos de calibración multivariante. El análisis de sistemas complejos requiere una estimación estadística de los parámetros del modelo de calibración basándose en muestras representativas del sistema con el fin de optimizar la calidad del trabajo analítico.

Uno de los principales problemas que enfrentan los investigadores en el análisis químico instrumental son las interferencias, cuyo término se aplica a cualquier efecto en la señal analítica causada por fenómenos físicos o químicos ajenos al de interés.

Las interferencias químicas son errores sistemáticos causados por ciertas sustancias cuya presencia cambia la señal analítica, o bien, interaccionan con los analitos modificando su respuesta frente al instrumento. La mayoría de las muestras (fundamentalmente las de tipo biológico) son mezclas de numerosos componentes, muchos de los cuales son lo suficientemente similares para afectar la señal por lo que es difícil obtener mediciones suficientemente selectivas para el analito, en cuyo caso se recurre normalmente a procesos de separación; sin embargo, la calibración multivariante permite analizar sistemas con interferencias químicas (aún cuando se desconozcan) sin necesidad de manipular excesivamente la muestra.

Por otro lado, ciertos fenómenos físicos aparentemente irrelevantes pueden afectar seriamente la señal de medición (interferencias físicas), siendo necesario mantener constantes sus efectos o compensarlos matemáticamente. Además, la variación de ciertos parámetros como son temperatura, precisión, pH, etc., puede provocar grandes errores en las mediciones. No obstante, con calibración multivariante es posible eliminar fácilmente cada uno de estos problemas.

Finalmente, debe considerarse que en el momento de efectuar la calibración existen anomalías en la preparación de las muestras o variaciones instrumentales (sin importar qué tan cuidadoso sea el analista) que la calibración multivariante identifica como datos anormales, siendo posible

eliminarlos y evitar en un futuro errores mayores en el modelo de calibración estimado.

Así, la calibración multivariante es una herramienta quimiométrica que establece un modelo matemático multivariante del sistema en estudio, donde los parámetros de calibración se derivan de cálculos estadísticos a partir de datos empíricos.

1.8.1.2- MODELOS DE CALIBRACIÓN LINEALES

En el caso más simple, el modelo de calibración de un sistema químico es caracterizado por una variable x (señal analítica) relacionada linealmente con una variable "y" (cantidad del analito) a través de la expresión:

$$y = b_0 + b_1x + e \quad (1.1)$$

donde los parámetros de regresión (b_0 , b_1) y el residuo ($e = y_{\text{real}} - y_{\text{estimada}}$) son cantidades desconocidas.

Sin embargo, la estimación correcta de los parámetros b_0 y b_1 requiere el manejo estadístico de los datos de calibración (x_i , y_i) de $i = 1, 2, 3, \dots$, l muestras independientes:

$$\begin{aligned} y_1 &= b_0 + b_1x_1 + e_1 \\ y_2 &= b_0 + b_1x_2 + e_2 \end{aligned} \quad (1.2)$$

$$y_3 = b_0 + b_1x_3 + e_3$$

$$\begin{matrix} \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \end{matrix}$$

$$y_i = b_0 + b_1x_i + e_i$$

de los cuales se desprenden los siguientes vectores y matrices:

Vector de variables dependientes (a), vector de parámetros de regresión (b), vector de residuos (c), y matriz de variables independientes (d):

$$(a) \quad y = \begin{pmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ Y_n \end{pmatrix}$$

$$(b) \quad b = \begin{pmatrix} b_0 \\ \cdot \\ b_1 \end{pmatrix}$$

$$(c) \quad r = \begin{pmatrix} r_1 \\ \cdot \\ r_n \end{pmatrix}$$

$$(d) \quad X = \begin{pmatrix} 1 & X_{11} \\ 1 & X_{21} \\ \cdot & \cdot \\ 1 & X_n \end{pmatrix}$$

En notación matricial, las expresiones (1.2) pueden reescribirse como:

$$y = Xb + e \quad (1.3)$$

En algunos casos, sin embargo, una sola variable "x" no es suficiente para predecir "y" (falta de selectividad), ya sea porque "y" comprende varios fenómenos representados por distintas variables "x", o bien, la señal analítica

es influenciada por diversos interferentes presentes en el sistema además del analito.

Para evitar esto, el modelo de calibración puede expresarse en función de "k" variables independientes por cada variable "y":

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + e \quad (1.4)$$

cuya notación matricial para "i" muestras tiene la misma forma que la ecuación (1.3), pero con distintas dimensiones en b y X.

En general, para un sistema de "j" componentes en función de "k" variables independientes en "i" muestras, el modelo de calibración es:

$$Y = XB + e \quad (1.5)$$

donde:

$Y = \{y_{ij}; i = 1, 2, \dots, I; j = 1, 2, \dots, J\}$ = variables dependientes $j = 1, 2, \dots, J$ en las muestras $i = 1, 2, \dots, I$

$X = \{x_{ik}; i = 1, 2, \dots, I; k = 1, 2, \dots, K\}$ = variables independientes $k = 1, 2, \dots, K$ en las muestras $i = 1, 2, \dots, I$

$B = \{b_{kj}; k = 1, 2, \dots, K; j = 1, 2, \dots, J\}$

$F = \{f_{ij}; i = 1, 2, \dots, I; j = 1, 2, \dots, J\}$

En este modelo, sin embargo, surge el inconveniente de la posible colinealidad en la información contenida en X, la cual impide la aplicación de métodos donde se asume que cada variable "x" arroja información única acerca de cada variable "y", como es el caso de la Regresión Lineal Múltiple. Es por ello que se requieren métodos en los cuales la información relevante contenida en X sea expresada por nuevas variables que constituyan el modelo de

calibración. El método de MCP parte de la ecuación de la regresión lineal, pero con nuevas variables.

1.8.1.3- MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP) ^{Ramis, 2001, p 226-228.}

El método de MCP fue originado en 1975 por Herman Wold con el fin de modelar un conjunto de datos complicados en términos de matrices. Esto es una simple pero eficiente manera para estimar los parámetros en modelos llamados NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares) ^{Wold, 2001, p 109.}

En el método de MCP se utilizan como variables predictoras vectores que explican menos variancia que otros modelos, por ejemplo el del componente principal, pero a cambio están más correlacionados con las respuestas, esto es, si se combinan linealmente las variables del bloque X con el único criterio de obtener vectores correlacionados con las respuestas, es posible que los vectores resultantes expliquen poca variancia, y por tanto pueden estar dominados por variaciones aleatorias.

En MCP se construyen vectores que establecen un compromiso razonable entre la concentración mínima y la concentración máxima. Dichos vectores se suelen denominar "variables latentes", esta expresión se refiere a cualquier tendencia significativa oculta en una matriz de datos. En el contexto de este método, esta expresión significa que el vector en cuestión ha sido optimizado desde el punto de vista de su utilización como variable predictora para predecir una respuesta dada (método MCP1, para regresión múltiple), o para predecir un pequeño grupo de respuestas (método MCP2, para regresión multivariante).

El algoritmo de MCP es una poderosa técnica para el control de procesos estadísticos multivariados. La base del algoritmo es primero definir los vectores de peso que determinan las direcciones de proyección, enseguida se utilizan las variables latentes derivadas de los vectores de peso para construir finalmente el modelo. Baibing Li, 2003, p 1.

En espectrofotometría, el método de MCP involucra una etapa de calibración en la cual la relación entre las absorbancias a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente es estimada por un conjunto de muestras de referencia, y una etapa de predicción en la cual los resultados de la calibración son usados para estimar las concentración desconocida del componente en una muestra.

1.8.1.3.1- ALGORITMO PARA EL MÉTODO DE MCP Barrera, 2004, p 16

El algoritmo utilizado en este trabajo es de Haaland, en donde se realiza el análisis de la calibración y de la predicción para un solo componente a la vez. Esto significa que solo se emplea la concentración de un solo componente en los datos de la calibración, mientras que las concentraciones de los demás componentes no se incluyen en el análisis. Sin embargo, si se desea conocer la concentración de algún otro componente presente en la mezcla, lo único que se debe saber es realizar el análisis en donde solamente se incluya este componente en los datos de calibración.

1.8.1.3.2- ETAPA DE CALIBRACIÓN Haaland, Vol. 60, p 1193-1208

En esta etapa, la relación entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés se estima a partir de la preparación de un conjunto de mezclas de los analitos,

que representan las posibles combinaciones de los componentes, de esta manera se obtienen la matriz A (absorbancias a las diferentes longitudes de onda) y el vector C (concentraciones del analito de interés) mostrados en la figura 5.

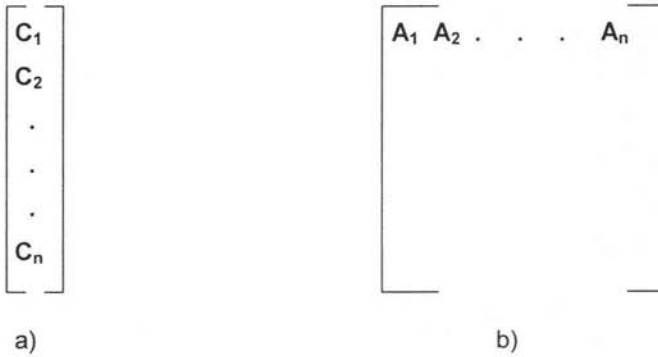


Fig. 5. Muestra el vector de concentraciones (a) y la matriz de absorbancias a las n longitudes de onda (b).

Una vez conociendo esto, se realiza el tratamiento de datos, como se describe a continuación:

1) Se parte de la ecuación lineal inversa:

$$C = Ak + E \tag{1.6}$$

siendo C la concentración, A los valores de las absorbancias y E la variabilidad. Así que, los espectros de la calibración están dados por:

$$A = TB + E_a \quad (1.7)$$

donde T es la variable latente, (vector que ha sido optimizado desde el punto de vista de su utilización como variable predictora para predecir una respuesta dada, o para predecir un pequeño grupo de respuestas); E_a , es la variabilidad del error. T y B son matrices. La concentración del analito de interés esta representada por:

$$C = TV + E_c \quad (1.8)$$

2) Se calculan los promedios, tanto de la matriz A como del vector C, para obtener valores de A y C centrados, esto es, restando el promedio de las absorbancias a cada absorbancia y el promedio de los valores del vector C a cada concentración.

3) Posteriormente se calcula el factor de peso W_h , partiendo de:

$$A = C W_h + E_a \quad (1.9)$$

obtenemos,

$$W_h = A' C / C' C \quad (2.0)$$

donde A' representa la matriz transpuesta de la absorbancia y C' , el vector transpuesto de la concentración del analito.

5) Los valores de W_h se normalizan.

4) Una vez normalizados, se calcula el valor de la variable latente T_h , a partir de:

$$A = T_h W_h + E_a \quad (2.1)$$

$$T_h = A W_h \quad (2.2)$$

Estos valores se relacionan linealmente con la concentración mediante el valor de V, como coeficiente de regresión:

$$C = T_h V_h + E_c \quad (2.3)$$

de donde se obtiene:

$$V_h = T_h' C / T_h' T \quad (2.4)$$

6) Los valores de T, también se relacionan con el vector de carga B_h, el cual puede ser estimado por:

$$A = T B + E_a \quad (2.5)$$

$$A = T_h B_h + E_a \quad (2.6)$$

$$B_h = A T_h' / T_h' T_h \quad (2.7)$$

7) Enseguida se calcula E_a de la ecuación (2.6):

$$E_a = A - T_h B_h \quad (2.8)$$

y E_c de la ecuación(1.8):

$$E_c = C - T_h V_h \quad (2.9)$$

El producto del vector T_h y el vector de carga B_h es una aproximación de MCP para el espectro de calibración. El producto de V_h por T_h es una estimación de la concentración del componente de interés por el método de MCP basado en el espectro.

8) Finalmente, se sustituye E_a por A y E_c por C en el paso 2 y se vuelve a realizar hasta el paso 7 y así sucesivamente, calculando entonces el error de predicción que se expresa como la suma de cuadrados de los errores residuales de predicción (SCERP) los cuales son graficados contra el número óptimo de factores (como se muestra en la figura 6) para encontrar los factores que sean necesarios en la optimización del modelo. La SCERP indica qué tan bien se están estimando las concentraciones de las soluciones de la calibración con cada número de factores.

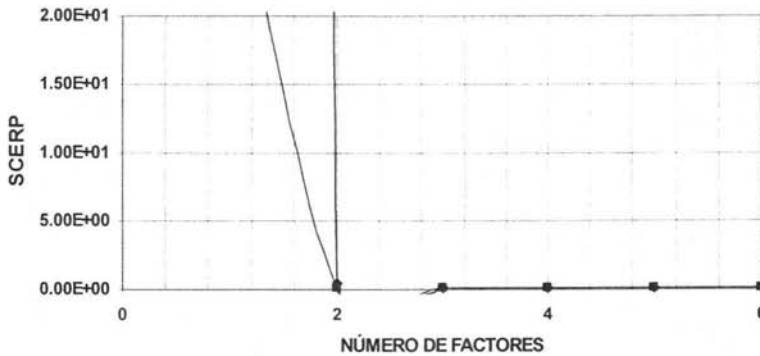


Fig. 6. Valores de la suma de cuadrados de los errores residuales de predicción contra en número de factores.

1.8.1.3.3- ETAPA DE PREDICCIÓN Haaland, Vol. 60, p 1193-1208

En esta etapa se estima la concentración del componente de interés, a partir de los siguientes pasos:

1) Para cuantificar la concentración, es necesario la utilización de los parámetros estimados en la calibración, así que:

$$T_h = A W_h \quad (3.0)$$

$$C_h = C_{h-1} + T_h V_h \quad (3.1)$$

2) Se calcula el valor del residual de la absorbancia:

$$E_h = e_h - T_h B_h \quad (3.2)$$

En donde E_h , es el error asociado al vector de las absorbancias y e_h , el error asociado a una de las calibraciones.

3) Finalmente, de (3.0) se sustituye E_h por A y se vuelve a realizar el cálculo de la concentración y de E_{h2} , y así sucesivamente hasta calcular el número óptimo de factores dado en la etapa de calibración.

1.8.1.3.4- VALIDACIÓN DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN Ramis, 2001, p 193-194.

La validación de un modelo de clasificación consiste en establecer sus capacidades de reconocimiento, de predicción, y su estabilidad o robustez. La capacidad de reconocimiento se evalúa, directamente, como el conjunto de sistemas que son clasificados correctamente.

En cambio, para establecer la capacidad de predicción del modelo, es necesario definir previamente un conjunto de prueba o evaluación, que debe estar formado obligatoriamente por sistemas de los que se conoce su pertenencia a las categorías, pero que no se incluyeron en el conjunto de sistemas con el que se desarrolló el modelo. La capacidad de predicción está dada por el conjunto de sistemas que son clasificados correctamente por el modelo.

Finalmente, un modelo es estable si la eliminación de un objeto, o de unos pocos objetos, o la sustitución de unos objetos por otros, en los conjuntos de entrenamiento y predicción no hace variar sus capacidades de reconocimiento y predicción. Los modelos construidos con un número insuficiente de objetos en el conjunto de entrenamiento son inestables.

Es conveniente determinar ambas capacidades, de reconocimiento y de predicción, puesto que si sólo se determina la primera es probable que se tenga una idea excesivamente optimista sobre la calidad del modelo. Por otra parte, al formar el conjunto de evaluación se está renunciando a utilizar en la construcción del modelo la información contenida en un numeroso grupo de objetos. Se obtendrá así un modelo de peor calidad en relación al que se podría tener si se utilizasen todos los objetos disponibles.

Un problema análogo se tiene en la predicción de variables de escala. Si se dispone de diez puntos para construir una recta de calibrado y se reservan cinco para evaluar la capacidad predictiva de la misma, la recta tendrá que construirse con tan sólo los cinco puntos restantes. Dicha recta estará asociada a incertidumbres mucho mayores que la recta que podría construirse con los diez puntos disponibles. Tanto en análisis clasificatorio, como en calibración,

este problema se resuelve con la denominada validación cruzada, de la cual hablaremos a continuación.

1.8.1.3.5- VALIDACIÓN CRUZADA Ramis, 2001, p 194-195.

En la validación cruzada se encuentran el método del objeto excluido y el método de la navaja.

En el primer método, el modelo se establece con los objetos disponibles menos uno. El conjunto de sistemas queda constituido por $n - 1$ sistema, el proceso se repite con todos los sistemas, excluyendo uno distinto cada vez.

El método construye n modelos casi iguales entre sí, y muy similares al que se construirá finalmente con los n sistemas. Los cálculos que se realizan son los siguientes:

- Se establece la capacidad de reconocimiento de cada uno de los n modelos de $n - 1$ sistemas. Si los porcentajes de acierto obtenidos son iguales o casi iguales, se deduce que el modelo construido con n sistemas es robusto o estable.
- Se establece la capacidad predictiva del modelo de n sistemas como el porcentaje de sistemas excluidos que han sido clasificados correctamente por los n modelos de $n - 1$ sistemas.

El segundo método funciona cuando se tienen muchas observaciones, ya que es posible excluir varias cada vez, en lugar de una sola. Así, si se excluyen p observaciones seleccionadas siguiendo un plan sistemático, se pueden obtener numerosos modelos con $n - p$ observaciones. De este modo, la

estabilidad del modelo y su capacidad de predicción se pueden conocer sobre una base estadística más completa y rigurosa.

1.9- TIPO DE ERRORES www.calidadbioquimica.com.ar/error.htm, 09 Enero 2004

La primera etapa en la resolución de problemas analíticos es precisamente su identificación y una vez que este haya sido claramente identificado puede seleccionarse un camino para encontrar su solución. Archival, 1950, p 639-642.

La elección del método que proporcione la mejor solución del problema es una importante tarea del químico, y debe estar basada en los criterios de practicabilidad y confiabilidad. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica, 1996.

Los criterios de practicabilidad incluyen la educación, el entrenamiento requerido, la disponibilidad de reactivos, los requerimientos instrumentales, el tiempo de ejecución, el costo y la seguridad. Los criterios de confiabilidad describen la ejecución analítica del método e identifica donde ocurren más frecuentemente los errores y cuales son los que conciernen al experimento.

Cuanto mayor sea el número de observaciones y menos difieran entre sí, mas se acercarán los resultados a la verdad. Por tanto, es necesario, definir los tipos de errores que existen.

Existen varias formas de clasificar y expresar los errores de medición. Según su origen los errores pueden clasificarse del siguiente modo:

- 1) Errores introducidos por el instrumento:

Error de apreciación (E_{ap}): si el instrumento está correctamente calibrado la incertidumbre que tendremos al realizar una medición estará asociada a la mínima división de su escala o a la mínima división que podemos resolver con algún método de medición.

Según el autor, podemos definir como el E_{ap} :

- 1) La mínima división del instrumento.
- 2) La mínima división discernible por el observador del instrumento.
- 3) La mitad de la mínima división del instrumento.

La mínima cantidad que puede medirse con un dado instrumento la denominamos apreciación nominal. El error de apreciación puede ser mayor o menor que la apreciación nominal, dependiendo de la habilidad (o falta de ella) del observador. Así, es posible que un observador entrenado pueda apreciar con una regla común fracciones del milímetro mientras que otro observador, con la misma regla pero con dificultades de visión sólo pueda apreciar 2 mm.

Error de exactitud (E_{ex}): representa el error absoluto con el que el instrumento en cuestión ha sido calibrado.

Error de interacción (E_{in}): este error proviene de la interacción del método de medición con el objeto a medir. Su determinación depende de la medición que se realiza y su valor se estima de un análisis cuidadoso del método usado.

- 2) Errores según su carácter:

Según su carácter los errores pueden clasificarse en **sistemáticos, estadísticos o aleatorios e ilegítimos o espurios.**

Errores sistemáticos: se originan por las imperfecciones de los métodos de medición. Por ejemplo, pensemos en un reloj que se atrasa o se adelanta, o en una regla dilatada, el error de paralaje, etc. Los errores introducidos por estos instrumentos o métodos imperfectos afectarán nuestros resultados siempre en un mismo sentido. El valor de E_{ex} sería un ejemplo de error sistemático pero no son lo mismo, ni los errores de exactitud son los únicos responsables de los errores sistemáticos.

La única manera de detectarlos y corregirlos es comparar nuestras mediciones con otros métodos alternativos y realizar un análisis crítico y cuidadoso del procedimiento empleado. También es aconsejable intercalar en el proceso de medición patrones confiables que permitan calibrar el instrumento durante la medición. Los errores sistemáticos afectan directamente a la exactitud de una medición.

Error sistemático constante: es el tipo de error que tiene siempre la misma dirección y magnitud, aun cuando cambia la concentración de las soluciones en cuestión.

Error sistemático proporcional: error que se halla siempre en la misma dirección y cuya magnitud es un porcentaje de la concentración de la solución analítica que se mide.

Errores estadísticos o aleatorios: La existencia de otra clase de errores llamados indeterminados o aleatorios, se revela por pequeñas variaciones en los sucesivos resultados de una serie de mediciones, aún cuando éstas sean

realizadas por un mismo operador, instrumento, etc., en condiciones similares. Estos errores surgen de pequeñas variaciones fortuitas en el instrumentousado, operador, método, etc. Tienen origen en la imposibilidad de controlar todas las variables que afectan a las mediciones.

De lo anterior se deduce que estos errores no son evitables ni previsibles por parte del operador; pero trabajando en condiciones controladas y tomando ciertas precauciones es posible reducir estas variaciones aleatorias en mediciones sucesivas.

Estos errores aleatorios, siguen con bastante aproximación la distribución normal, y por lo tanto pueden tratarse estadísticamente. De un número de datos o resultados el analista puede cuantificar la incertidumbre introducida por estas variaciones aleatorias y estimar como afecta a los resultados de un método analítico.

Este error afecta a la precisión de una serie de mediciones determinadas y tiene efectos en el origen de las variaciones *intraanalíticas e interanalíticas*.

Los errores aleatorios son los que se producen al azar. En general son debidos a causas múltiples y fortuitas. Estos errores pueden cometerse con igual probabilidad por defecto como por exceso. Por tanto, midiendo varias veces y promediando el resultado, es posible reducirlos considerablemente. Es a este tipo de errores a los que comúnmente hace referencia la teoría estadística de errores. Lo denominaremos E_{est} , y afectan directamente a la precisión de una medición.

Errores ilegítimos o espurios: Supongamos que deseamos calcular el volumen de un objeto esférico y para ello determinamos su diámetro. Si al

introducir el valor del diámetro en la fórmula, nos equivocamos en el número introducido, o lo hacemos usando unidades incorrectas, o bien usamos una expresión equivocada del volumen, claramente habremos cometido un error. Este error está más asociado al concepto convencional de equivocación. A este tipo de errores los designamos como ilegítimos o espurios. A este tipo de errores no se aplica la teoría estadística de errores y el modo de evitarlo consiste en una evaluación cuidadosa de los procedimientos realizados en la medición.

1.10- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el principio activo en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. Calpena, 1991, p749-758.

Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas. United States Pharmacopeia Convention USP XXII, 1990, p 1225,1710.

La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Rampazoo, 1990, p 807-815.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias,

NOM 059 y por comisiones de Farmacopeas Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1991, p 73 para el registro de nuevos medicamentos.

1.10.1-¿POR QUÉ VALIDAR?

El prestigio, el desarrollo económico y el crecimiento de una empresa dependen de la calidad de sus productos. Atendiendo a esta necesidad se han venido formulando diferentes programas y parámetros por varias instituciones para lograr el aseguramiento de la calidad de los distintos productos.

Entre los organismos regulatorios más importantes se tiene a nivel nacional la Secretaría de Salud (SSA); a nivel internacional la Food and Drug Administration (FDA), ISO 9000, las Good Manufacturing Procedures (GMP's) y Good Laboratory Procedures (GLP's). Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. 1997, pp. 1-69.

Por tanto, la validación de métodos analíticos es una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada. Inman, Vol 25, 1997, pp.252-256

Por este motivo es necesario el uso de la estadística puesto que la necesidad de poner en evidencia que un proceso está validado, exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios y/o criterios que llevan a una correcta evaluación.

En 1975, Youden publicó un Manual Estadístico en la Asociación de Químico Analistas Oficiales (A.O.A.C.) en el cual se reportaron las bases de la validación de métodos analíticos. En 1978 la Asociación Química de la Sociedad Americana para el Control de Calidad una descripción de diseños y procedimientos evaluativos, así como detalles para las pruebas de tolerancia de métodos analíticos. Comité de Guías Generales de Validación, 1991, p 4-16.

La validación del método establece que sus características (virtudes, parámetros de calidad), son adecuadas para el uso que se pretende. La validación se realiza llevando a cabo una serie de experimentos en los que se emplean unas condiciones específicas del método y el mismo tipo de matriz que el que se espera en las muestras. Ello implica la evaluación de un número de parámetros tales como selectividad, exactitud, veracidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), relación respuesta detector-concentración, sensibilidad, límites de detección y determinación y robustez. La realización de la validación completa es una tarea que puede ser tediosa, pero las consecuencias de no hacerlo aseguran una pérdida de tiempo, dinero y recursos. www.eumetrics.us/es/spanish/validar.htm, 19 Septiembre 2003

1.10.2- VALIDACIÓN: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, establece que validación, es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Cumpliendo con los siguientes requisitos:

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

Especificidad: Habilidad de un método analítico para obtener el resultado analítico debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes que estén presentes en la muestra, como otros principios activos, excipientes, o cualquier otra sustancia interferente.

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

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

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

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

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

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

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

Rango: Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Robustez: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

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

Sensitividad: Mínima diferencia entre la concentración del analito contenido en una muestra que genera una diferencia significativa en la respuesta analítica bajo condiciones de análisis establecidas.

Tolerancia: Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como puede ser: equipos, columnas, etc.

*Requisitos mínimos para la validación.

1.10.3- CRITERIOS Y REQUISITOS PARA LA EVALUACIÓN DE PERFILES DE DISOLUCIÓN EN FORMAS FARMACÉUTICAS ORALES DE LIBERACIÓN INMEDIATA

1.10.3.1- En cuanto al equipo

- Verificación y calibración del equipo de disolución.
- El equipo de disolución utilizado debe cumplir con las dimensiones y especificaciones descritas en el método general de análisis MGA 0291 de la FEUM, así como con la normatividad aplicable.
- Se deben realizar las pruebas de confiabilidad del equipo con tabletas calibradoras cuya certificación sea trazable y los resultados de estas pruebas deben estar dentro de los límites de aceptación.
- Se debe evaluar la magnitud de la vibración del equipo de disolución en condiciones estáticas, y dicha vibración no debe ser mayor que 0.1 mils (aproximadamente 0.025 mm).

1.10.3.2- En cuanto al Perfil de disolución

- Realizar los perfiles de disolución con 12 unidades, tanto del medicamento de prueba como del de referencia, en las mismas condiciones experimentales.
- El método de evaluación del perfil de disolución se debe registrar por escrito antes de realizar el estudio, incluyendo las condiciones experimentales como medio de disolución, aparato utilizado, velocidad de agitación, método de análisis, tiempo de muestreo, forma de muestreo y fórmula de cálculo.

- Las condiciones experimentales para realizar la comparación del perfil de disolución deben ser las establecidas por la FEUM. En caso de que las condiciones no existan en ésta, se aceptan las descritas en las farmacopeas reconocidas internacionalmente. En caso de que no exista información se deberá realizar la prueba de bioequivalencia.
- Para realizar el perfil de disolución, deben seleccionarse por lo menos cinco tiempos de muestreo (excepto el tiempo cero) que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión. Cuando el 85% del fármaco se disuelve en un tiempo menor o igual a 15 minutos, no es necesario caracterizar la curva ascendente, pero los tiempos de muestreo deben estar suficientemente espaciados a lo largo del perfil de disolución.
- Durante la realización del perfil de disolución, los muestreos deben realizarse, dentro de los tiempos establecidos en el método de evaluación (7.2.2) con una variación que no afecte los resultados de la prueba. Utilizar una curva de calibración de la sustancia de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.
- El volumen extraído puede o no reemplazarse. Cuando no se reemplace el volumen, no se debe extraer más del 10% del medio de disolución. En cualquier caso, para el cálculo de porcentaje disuelto se debe considerar el volumen de la alícuota y la cantidad extraída en cada muestreo.

1.10.3.3- En cuanto al Método Analítico

El método analítico que se utilice para realizar el perfil de disolución debe estar debidamente validado, y cumplir al menos con los siguientes parámetros:

1.10.3.3.1- Validación del sistema.

- **Linealidad.** Se debe demostrar una linealidad del sistema con al menos cinco puntos (excepto el cero) por duplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%.
- **Precisión.** De los datos de linealidad se debe demostrar que el coeficiente de variación del factor de respuesta no debe ser mayor que el 2%.

1.10.3.3.2- Validación del método.

Validar el método analítico para los medicamentos de prueba y de referencia. Si se tienen disponibles los placebos de los medicamentos, realizar la validación mediante el porcentaje de recuperación; cuando no sea posible obtener los placebos del medicamento de prueba o del de referencia, realizar la validación mediante el método de estándar adicionado, esto es, agregar a cada medicamento cantidades conocidas del fármaco y determinar:

- **Linealidad.** El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado,

con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 3%.

- **Exactitud.** El promedio del porcentaje de la recuperación de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

- **Precisión.**
 - **Repetibilidad.** El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.

 - **Reproducibilidad.** Evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días, los analistas o los equipos. Debe analizarse una muestra homogénea del producto, al menos por triplicado para probar cada condición. El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

- **Estabilidad de la muestra.** Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable.

- **Selectividad.** Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

- **Evaluación de perfiles de disolución.** El porcentaje disuelto debe calcularse con respecto a la dosis nominal del fármaco.

- Se deben reportar los porcentajes disueltos a cada tiempo de muestreo en cada unidad de dosificación, así como los porcentajes disueltos promedio, los coeficientes de variación y los valores máximo y mínimo.
- Se deben graficar los porcentajes disueltos promedio y los de cada unidad de dosificación contra el tiempo.
- Si el coeficiente de variación del porcentaje disuelto es menor o igual que el 20% para el primer tiempo de muestreo y menor o igual que el 10% para los tiempos subsecuentes, se comparan los perfiles de disolución usando el factor de similitud (f) definido en la siguiente ecuación:

$$f = 50 \text{ Log } \{ [1 + (1/n) S (R_t - P_t)^2]^{-0.5} \times 100$$

Donde:

n = número de tiempos de muestreo.

R_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de referencia.

P_t = porcentaje disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de prueba.

Un factor de similitud entre 50 y 100 indica perfiles de disolución similares.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

2.1- EQUIPO Y SOFTWARE

Las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en un Espectrofotómetro UV (modelo Cary 1E) empleando celdas de cuarzo de 10 mm de longitud. Los espectros fueron obtenidos en un rango de 200-350 nm a intervalos de 1 nm.

Los espectros fueron guardados en el formato ASCII, transferidos a una computadora Genuine Intel x86. Los datos obtenidos para el desarrollo y la validación del método fueron tratados mediante el programa de ISHEJA INC. Versión 1.0.0 soportado en ambiente Windows 98, el cual utiliza el algoritmo NIPALS para MCP.

También fue necesaria la utilización de balanza analítica Metler-Toledo, modelo AB204-S (No. de serie: 1908788), purificador de agua, Milli Q (Millipore, No. Serie: F6MN12661L), NIR System modelo 6500, (No. de serie: 2082), Termo-higómetro electrónico, disolutor automatizado Vankel modelo VK7000, bomba de calentamiento Vankel Modelo VK750D, analizador de humedad HR73 Metler Toledo, pH-metro (modelo 7, corning).

2.2- MATERIAL

La parte experimental fue realizada con Lisinopril dihidrato (pureza 100.00%) e Hidroclorotiazida (pureza 99.99%). Las soluciones stock de LSP e HCT fueron preparadas pesando cantidades exactas de los fármacos y disolviendo en MEOH, grado reactivo, para después utilizar como medio de disolución HCl 0.1 N. preparado de acuerdo a USP 26. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de análisis. Las tabletas utilizadas para

los ensayos de disolución fueron tabletas de Zestoretic (producidas por Astra-Zeneca), conteniendo 20 mg de LSP, 12.5 mg de HCT y excipientes.

El material de vidrio utilizado:

- Matraces volumétricos de 25, 250, 1000 y 2000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 20 mL.
- Mortero con pistilo.
- Agitadores de vidrio.
- Tubos de ensaye.
- Vasos de precipitado de 10, 50, 250, 600 y 1000 mL.

2.3-Desarrollo Experimental

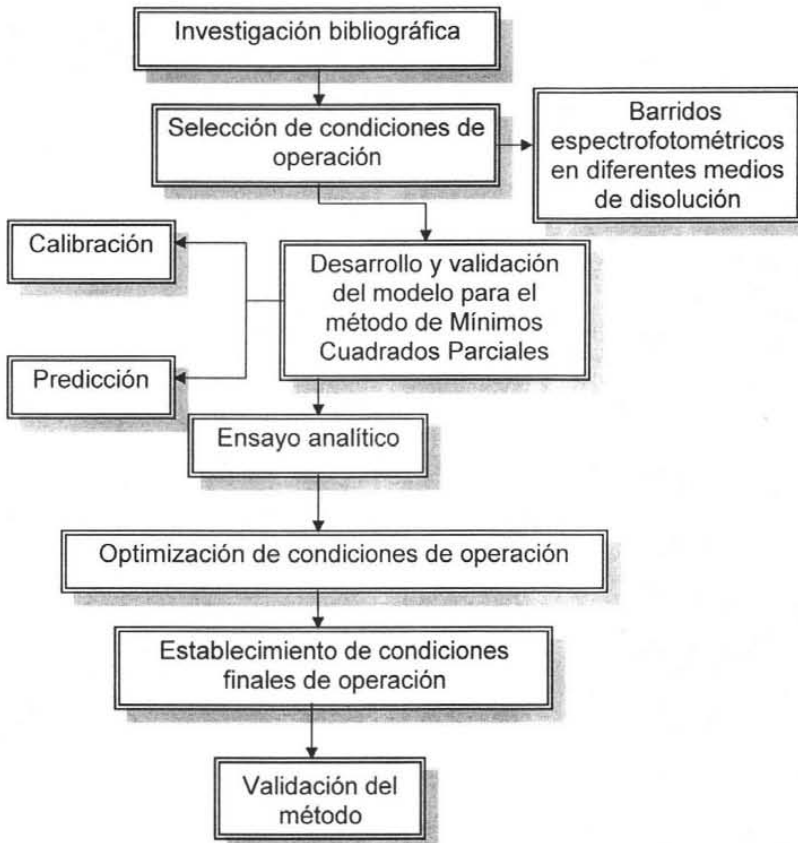


Fig. 7. Desarrollo experimental

2.4.1- DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El medio de disolución para este trabajo fue HCl 0.1 N, debido a que este medio es utilizado por USP 26 para evaluar los perfiles de disolución en tabletas de ambos analitos en forma individual. Sin embargo, también se realizaron barridos de los 2 analitos por separado y en mezcla en diferentes medios de disolución para conocer sus espectros, las λ de sus máximos de absorción y para establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas.

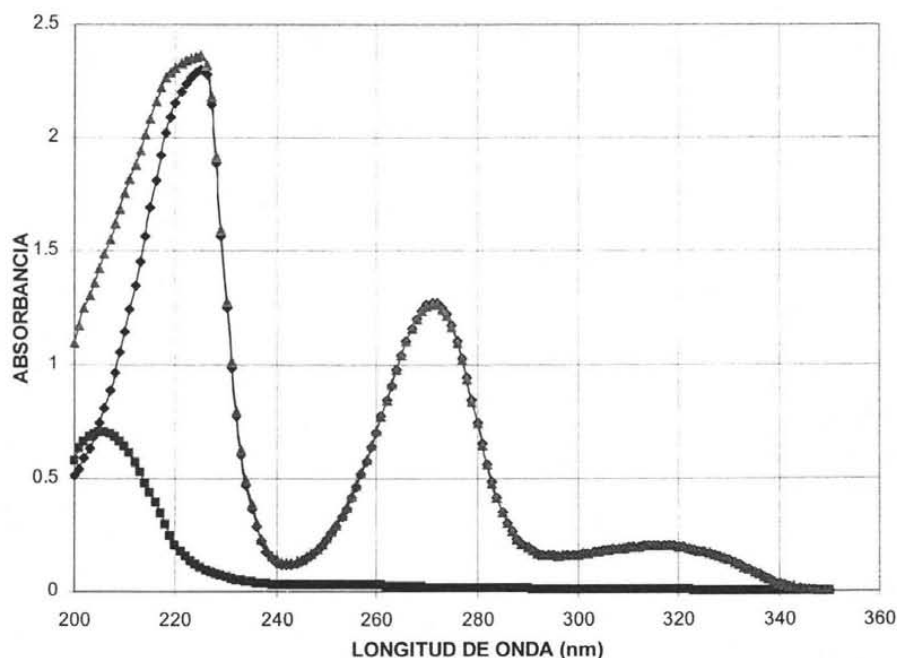


Fig 8. Espectro de absorción en UV (—●—) HCT $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, (—■—) LSP $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—▲—) y mezcla de LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) en HCl 0.1 N en el rango de 200 – 350 nm.

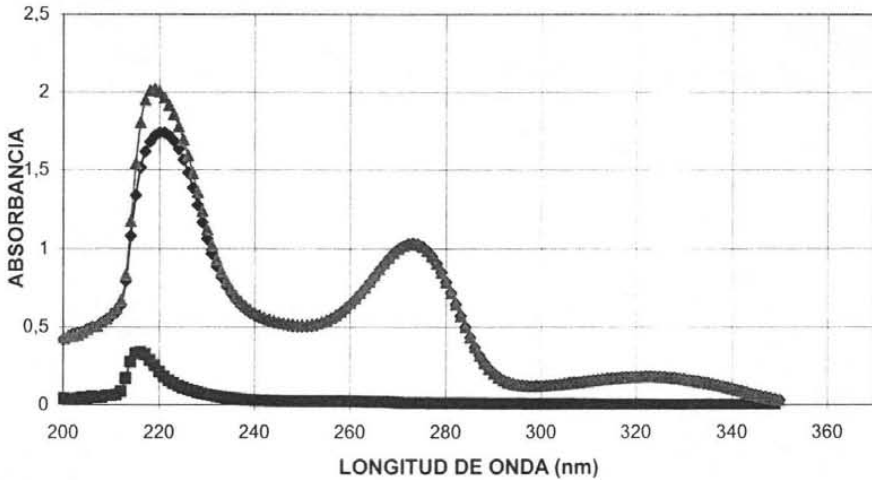


Fig 9. Espectro de absorción en UV (◆) HCT 20 µg mL⁻¹, (■) LSP 20 µg mL⁻¹ (▲) y mezcla de LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en NaOH 0.1 N en el rango de 200 – 350 nm.

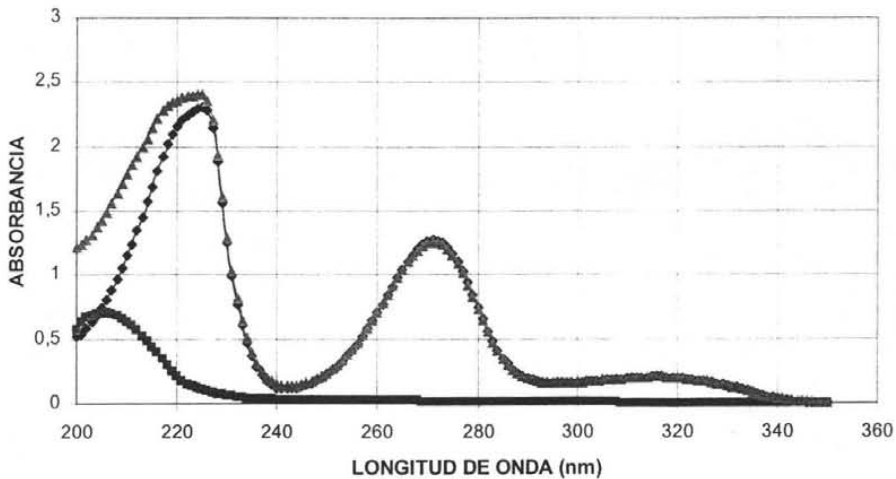


Fig 10. Espectros de absorción en UV (◆) HCT 20 µg mL⁻¹, (■) LSP 20 µg mL⁻¹ (▲) y mezcla de LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en solución acuosa en el rango de 200 – 350 nm.

En las Fig. 8, 9 y 10 se pueden observar las λ de los picos máximos tanto para LSP como para HCT en los diferentes medios de disolución. En medio ácido, el LSP presenta un pico a 206 nm y la HCT a 316, 271, 225 y 196 nm. Mientras que en medio alcalino a 216, 197 y 195 nm para LSP y a 322, 273 y 221 nm para HCT. Finalmente en solución acuosa, los picos para LSP se encuentran a 206 y 191 nm y los de HCT a 316, 271 y 225 nm.

2.4.1.1- ADITIVIDAD E INTERFERENCIA

Con el objetivo de demostrar aditividad se comparó el espectro obtenido de la mezcla LSP-HCT, con el de la suma de los espectros de LSP y de HCT, mostrado en la Fig. 11, en donde se observa que el espectro de absorción de la mezcla de LSP-HCT es igual al espectro de absorción de la suma de los espectros individuales de LSP y de HCT, por ende, se demuestra aditividad y al no haber diferencia entre los espectros podemos decir que no existe el fenómeno de interferencia.

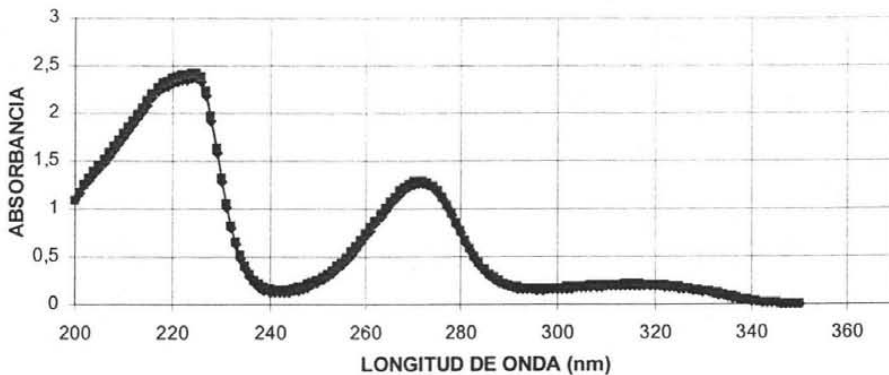


Fig. 11. Espectros de absorción en UV (\blacktriangle) mezcla de LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), (\blacktriangle) y suma de los espectros individuales de LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) en HCl 0.1N

2.4.1.2- INTERACCIÓN

Se realizaron algunos barridos de contraste en diferentes concentraciones para conocer si se presentaba el fenómeno de interacción entre los analitos, estos son mostrados en las Fig. 12, 13 y 14, en las cuales se puede observar que los espectros de contraste, son diferentes a los espectros normales de LSP, tanto en HCl 0.1 N como en solución placebo, la mayor diferencia se encontró en el rango de 225 a 240 nm, y en la concentración más pequeña, esto denota que existe interacción de la HCT sobre el LSP y que a mayor concentración del LSP menor efecto de la HCT; cabe decir también que los excipientes aumentan la absorptividad de dicho analito, aunque se espera que no sea de una manera significativa.

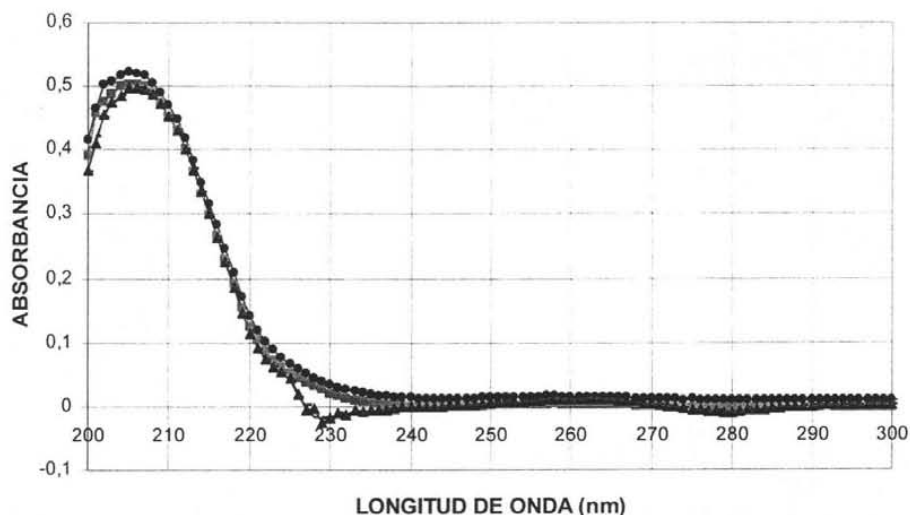


Fig. 12. Espectros de absorción UV (■) LSP $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, (▲) mezcla LSP ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) en HCl 0.1 N, (◆) LSP $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, (—) y mezcla LSP ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) en solución placebo.

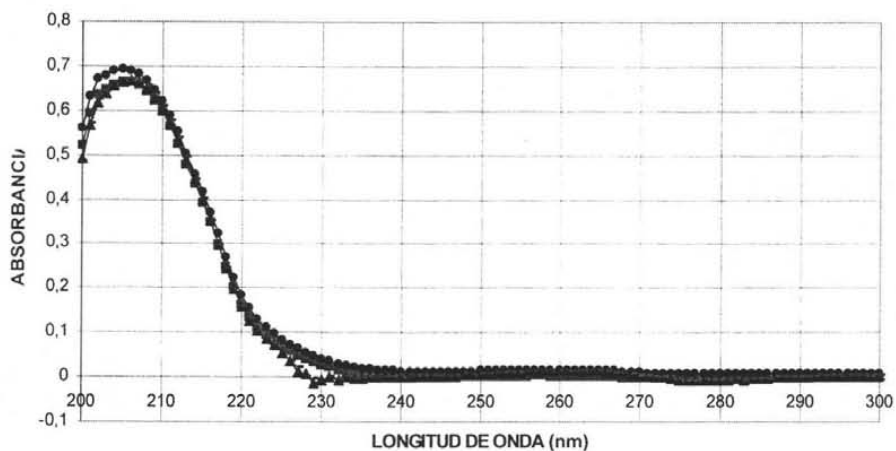


Fig. 13. Espectros de absorción UV (■-) LSP 20 µg mL⁻¹, (▲) mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en HCl 0.1 N, (◆) LSP 20 µg mL⁻¹, (—) y mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en solución placebo.

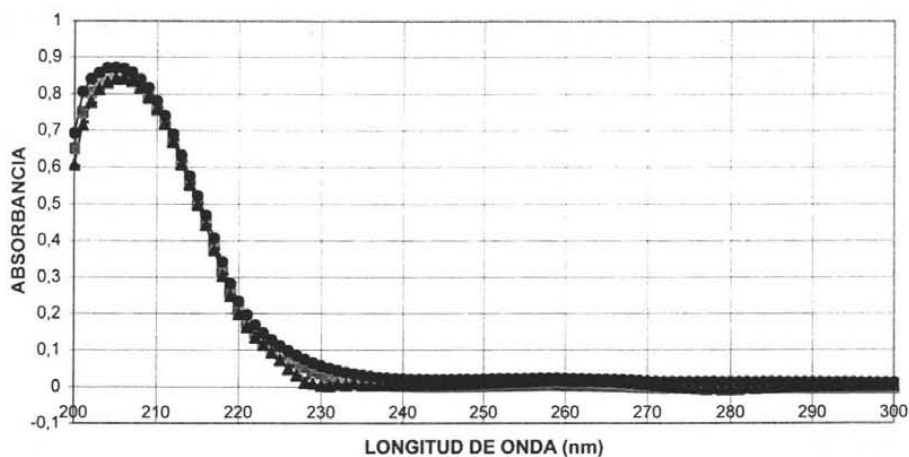


Fig. 14. Espectros de absorción UV (■-) LSP 25 µg mL⁻¹, (▲) mezcla LSP (25 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en HCl 0.1 N, (◆) LSP 25 µg mL⁻¹, (—) y mezcla LSP (25 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en solución placebo.

Para HCT se hizo lo mismo, sin embargo, como se puede observar en las Fig. 15, 16 y 17, no existe diferencia entre los barridos de contraste y los barridos normales de HCT, tanto en HCl 0.1N como en solución placebo, por lo que se puede decir que el LSP no influye en la respuesta analítica de la HCT.

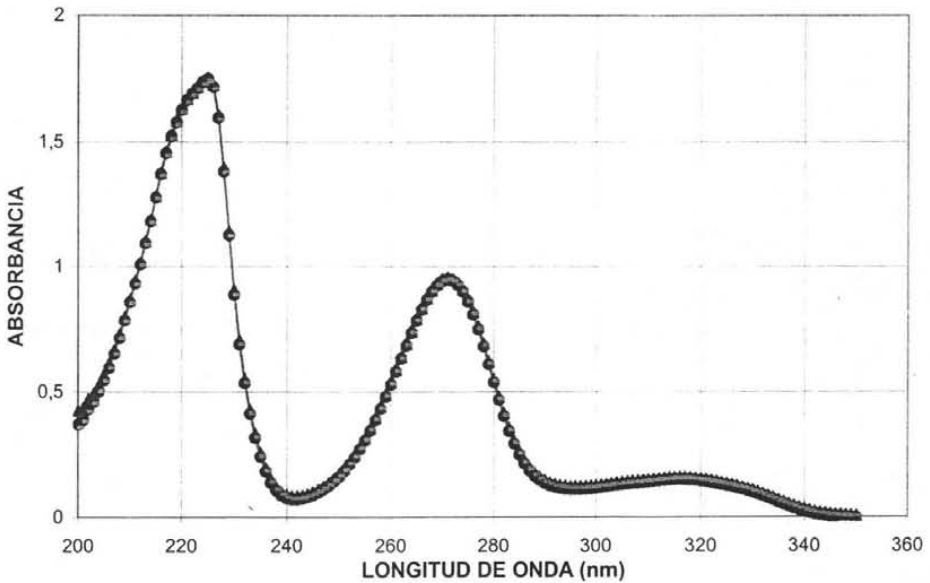


Fig. 15. Espectros de absorción UV (↔) HCT $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, (↔) mezcla LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) en HCl 0.1 N, (↔) HCT $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, (↔) y mezcla LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e HCT ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) en solución placebo.

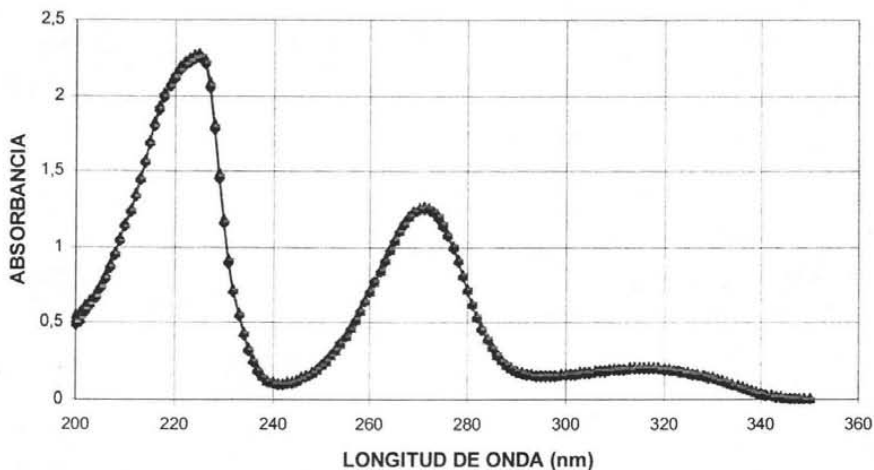


Fig. 16. Espectros de absorción UV (↔) HCT 20 µg mL⁻¹, (↔) mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en HCl 0.1 N, (↔) HCT 20 µg mL⁻¹, (—) y mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (20 µg mL⁻¹) en solución placebo.

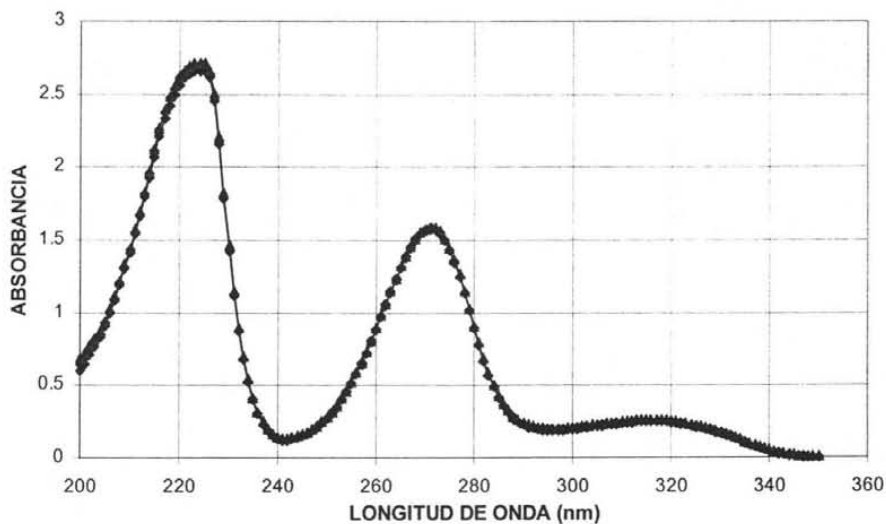


Fig. 17. Espectros de absorción UV (↔) HCT 25 µg mL⁻¹, (↔) mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (25 µg mL⁻¹) en HCl 0.1 N, (↔) HCT 25 µg mL⁻¹, (—) y mezcla LSP (20 µg mL⁻¹) e HCT (25 µg mL⁻¹) en solución placebo.

Sin embargo, aunque existe el fenómeno de interacción, los analitos en la mezcla pueden ser cuantificados, esto es una propiedad importante del método de MCP.

2.4.2- DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MODELO

2.4.2.1-SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES

El método de MCP puede utilizar toda la región espectral para obtener las variables que puedan ser incluidas en el modelo. Para elegir dicha región se preparó un conjunto de 25 mezclas de LSP-HCT, dichos sistemas se leyeron a 16λ , incluyendo el rango de 225 a 240 nm, en donde se presentó la interacción de HCT sobre LSP. En seguida se realizó el tratamiento de datos, realizado de acuerdo a las secciones 1.8.1.3.2 y 1.8.1.3.3, una vez obtenido el valor del error expresado como la SCERP se graficó contra el número de factores para obtener el mínimo valor del número óptimo de factores que va a ser utilizado en posteriores análisis. Esto se muestra en la Fig. 18.

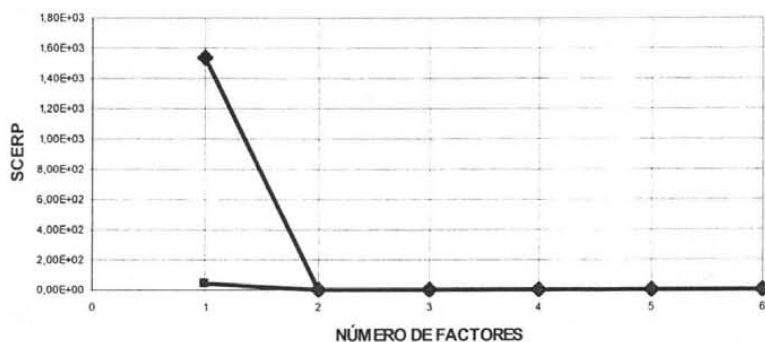


Fig. 18. SCERP acumuladas como función del número de factores para LSP (\blacktriangle) y HCT (\blacksquare).

De acuerdo a la Fig. 18, el número óptimo de factores para ambos analitos es 2, siendo $2.85E-01$ y $9.56E-0.2$ los valores de la SCERP para LSP e HCT, respectivamente. Cabe decir que los valores de la matriz A y del vector C, fueron estandarizados antes de realizar el tratamiento de los datos. Una vez que se conoció el número óptimo de factores se prosiguió a elegir las λ adecuadas para el modelo de MCP. Así que no se consideró ninguna λ del rango de 225 a 240, (recordando que en este periodo la HCT interactúa con el LSP). Por lo tanto, las λ seleccionadas para este método fueron las siguientes: 206, 209, 213, 219, 223, 224, 256, 266, 271, 275 y 280 nm.

2.4.2.2-ELECCIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se preparó una calibración de 25 mezclas con concentraciones diferentes, en el rango de $5-25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y de $4.97-14.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT en HCl 0.1N. Dichos sistemas se leyeron a las 11 λ anteriormente seleccionadas. Posteriormente el modelo fue validado haciendo uso de la validación cruzada citada en la sección 1.8.1.3.5, obteniendo así las 12 soluciones estándares que conformaran la matriz de calibración. Finalmente se graficó la concentración estimada contra la concentración real para cada uno de los analitos.

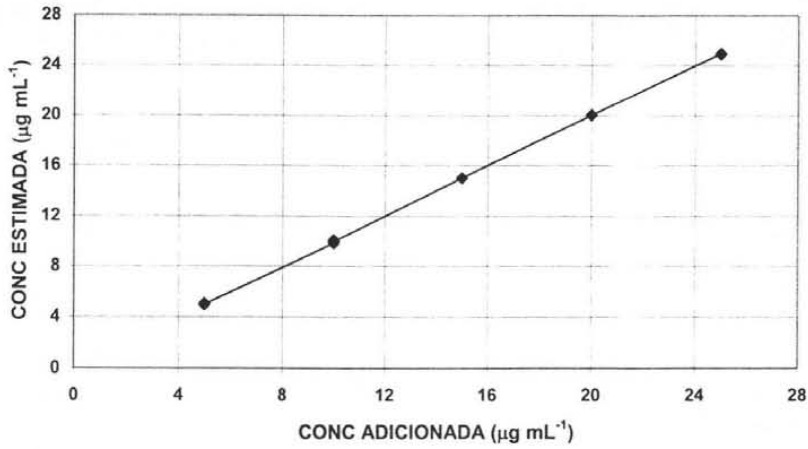


Fig. 19. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para LSP.

PENDIENTE	1.00
INTERCEPTO	7.72E-06
R²	0.99999
LIC_b	- 0.0457
LSC_b	0.0486

Tabla 1. Resultados del análisis de regresión para LSP, en un rango de concentración de 5-25 µg mL⁻¹

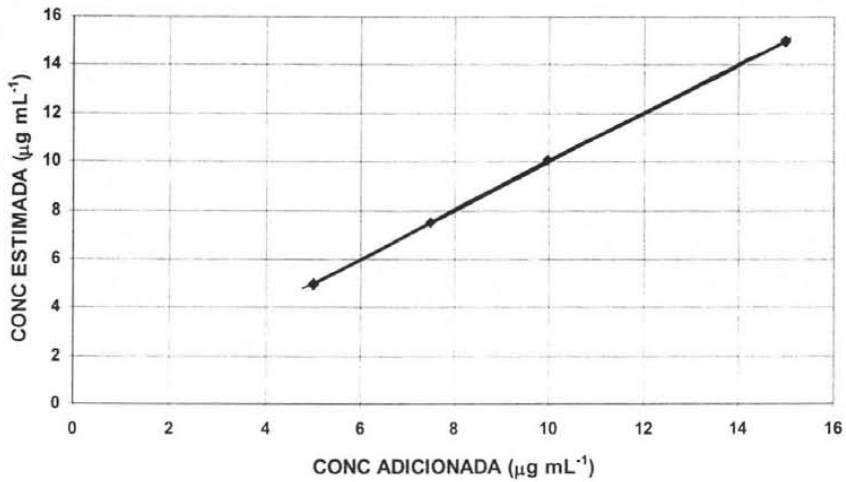


Fig. 20. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para HCT.

PENDIENTE	0.99999
INTERCEPTO	9.24E-06
R²	0.99999
LIC_b	-0.0365
LSC_b	0.0396

Tabla 2. Resultados del análisis de regresión para HCT, en un rango de concentración de 4.97-14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Así que, de acuerdo a las Fig. 19, 20 en donde se observa una relación lineal y a las tablas 1,2, donde los parámetros de regresión se encuentran dentro de los límites establecidos, es decir, un coeficiente de determinación de 0.9999, un valor de la pendiente muy cercano a 1 y una ordenada a la origen de valor cercano al cero, demuestra que existe una relación lineal entre la concentración estimada y la concentración adicionada, lo cual asegura que estas soluciones estándar tienen una buena capacidad predictiva y por tanto, son adecuadas para conformar la matriz de calibración, y son presentadas en la tabla 3:

SISTEMAS	CONC LSP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CONC HCT ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CONC TOTAL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FRACC LSP	FRACC HCT
1	5.0	4.97	9.97	0.501	0.499
2	5.0	14.90	19.90	0.251	0.749
3	10.0	4.97	14.97	0.668	0.332
4	10.0	9.93	19.93	0.501	0.499
5	10.0	14.90	24.90	0.401	0.599
6	15.0	4.97	19.97	0.751	0.249
7	15.0	14.90	29.90	0.501	0.499
8	20.0	4.97	24.97	0.801	0.199
9	20.0	7.45	27.45	0.728	0.272
10	20.0	14.90	34.90	0.573	0.427
11	25.0	4.97	29.97	0.834	0.166
12	25.0	14.90	39.90	0.626	0.374

Tabla 3. Soluciones estándar que conforman la matriz de calibración.* Se considera que la HCT tiene un contenido de humedad del 0.5%

2.4.3- CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL MÉTODO

- ✓ HCl 0.1 N como medio de disolución.
- ✓ Calibración modelada, es decir, se incluyen los excipientes dentro de la calibración.
- ✓ Se preparan las 12 soluciones estándares que conforman la matriz de calibración, en cada ensayo.
- ✓ Tanto las soluciones estándares como las muestras de análisis deben leerse a las siguientes λ : 206, 209, 213, 219, 223, 224, 256, 266, 271, 275 y 280 nm.
- ✓ Utilizar como blanco HCl 0.1 N.
- ✓ El número óptimo de factores es 2 para ambos analitos.
- ✓ El método analítico utilizado es el de Mínimos Cuadrados Parciales.

2.4.4- ENSAYO ANALÍTICO

Conociendo las condiciones finales se estableció el ensayo analítico, el cual es muy sencillo, ya que no es necesaria ninguna dilución y de esta forma pueden ser cuantificados ambos analitos sin la necesidad de separarlos. Es presentado en la figura 21.

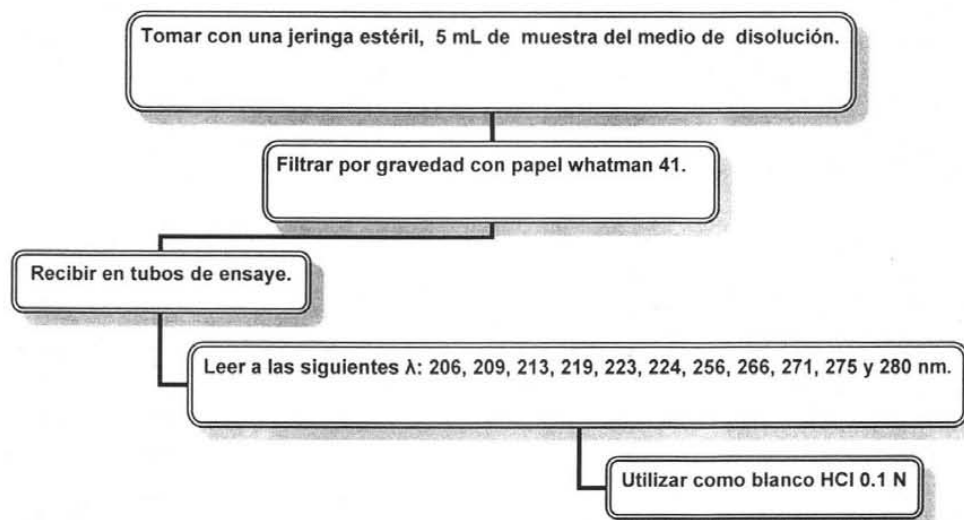


Fig. 21. Ensayo Analítico

2.4.5- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Uno de los objetivos de este trabajo fue validar un método para cuantificar simultáneamente LSP e HCT. Así que se tomaron como referencia la NOM 177, principalmente y la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos; A.C., edición 2002. Los parámetros considerados fueron: para el sistema: linealidad, precisión y exactitud; para el método: linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, límite de cuantificación y de detección, sensibilidad y estabilidad de la muestra procesada.

2.4.5.1- VALIDACIÓN DEL SISTEMA

2.4.5.1.1- LINEALIDAD

La linealidad del sistema se evaluó mediante la estimación de la concentración de 25 mezclas diferentes, en un rango de concentración de 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y de 4.97-14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT en HCl 0.1 N, preparadas por duplicado, a partir de soluciones stock para cada analito, en un día y un analista, bajo las condiciones normales de operación. En la tabla 4 se muestran tanto las concentraciones adicionadas como las concentraciones estimadas por el método de MCP para ambos analitos.

OBSERVACIÓN	SISTEMAS	CONC ADD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CONC EST ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		LSP	HCT	LSP	HCT
1	1	5	4.97	4.97	4.95
2	2	5	7.45	4.96	7.38
3	3	5	9.93	4.95	10.00
4	4	5	12.42	4.95	12.38
5	5	5	14.9	4.96	14.88
6	6	10	4.97	9.81	4.98
7	7	10	7.45	9.90	7.38
8	8	10	9.93	10.05	10.02
9	9	10	12.42	10.00	12.43
10	10	10	14.9	9.99	14.89
11	11	15	4.97	14.99	4.96
12	12	15	7.45	15.04	7.41
13	13	15	9.93	14.95	9.99
14	14	15	12.42	14.94	12.43
15	15	15	14.9	15.01	14.86
16	16	20	4.97	19.98	4.96
17	17	20	7.45	20.00	7.42
18	18	20	9.93	19.98	10.01
19	19	20	12.42	19.81	12.42
20	20	20	14.9	20.04	14.86
21	21	25	4.97	24.97	4.96
22	22	25	7.45	24.97	7.43
23	23	25	9.93	24.97	10.01
24	24	25	12.42	24.90	12.38
25	25	25	14.9	24.99	14.86

Tabla 4. Concentraciones adicionadas y estimadas de LSP e HCT, obtenidas para evaluar la linealidad del sistema.

OBSERVACIÓN	SISTEMAS	CONC ADD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CONC EST ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		LSP	HCT	LSP	HCT
26	1	5	4.97	5.01	4.99
27	2	5	7.45	5.00	7.42
28	3	5	9.93	5.04	9.99
29	4	5	12.42	4.96	12.46
30	5	5	14.9	5.04	14.91
31	6	10	4.97	10.13	4.95
32	7	10	7.45	10.09	7.41
33	8	10	9.93	10.10	10.04
34	9	10	12.42	10.03	12.40
35	10	10	14.9	10.05	14.87
36	11	15	4.97	15.01	4.98
37	12	15	7.45	14.98	7.40
38	13	15	9.93	14.97	9.95
39	14	15	12.42	15.09	12.44
40	15	15	14.9	15.03	14.82
41	16	20	4.97	20.12	4.97
42	17	20	7.45	20.12	7.40
43	18	20	9.93	20.01	9.99
44	19	20	12.42	20.08	12.43
45	20	20	14.9	20.16	14.91
46	21	25	4.97	25.01	4.99
47	22	25	7.45	25.05	7.40
48	23	25	9.93	24.96	10.01
49	24	25	12.42	24.94	12.43
50	25	25	14.9	24.95	14.89

...Continuación de tabla 4

Las Fig. 22 y 23 muestran la relación lineal que existe entre la concentración adicionada y la concentración estimada para ambos analitos, corroborándolo con el análisis de variancia presentado en las tablas 5 y 6, en las que se puede denotar que la f crítica es menor que la f calculada, lo cual confirma la linealidad del sistema.

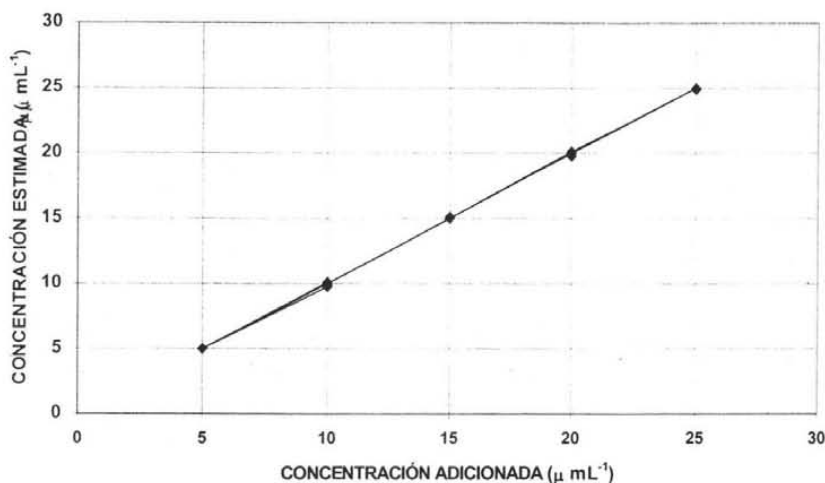


Fig. 22. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para LSP obtenido para evaluar la linealidad del sistema.

	gl	SC	CM	F calculada	F crítica
Regresión	1	2499.51702	2499.51702	499231.437	4.4527E-98
Residuos	48	0.24032304	0.00500673		
Total	49	2499.75735			

Tabla 5. Resultados del análisis de variancia para LSP considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

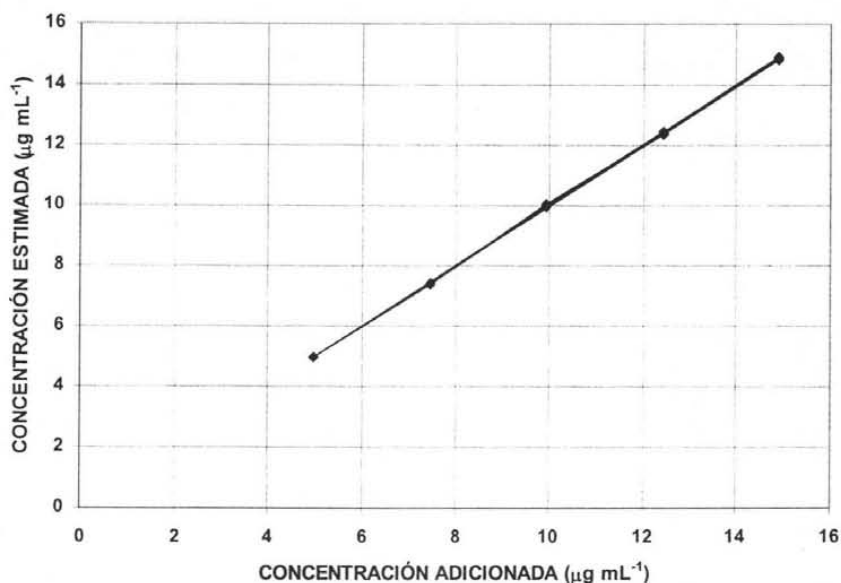


Fig. 23. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para HCT obtenido para evaluar la linealidad del sistema.

	gl	SC	CM	F calculada	F crítica
Regresión	1	622.810421	622.810421	312730.539	3.3357E-93
Residuos	48	0.09559316	0.00199152		
Total	49	622.906014			

Tabla 6. Resultados del análisis de variancia para HCT considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

En las tablas 7 y 8 se observan los resultados del análisis de regresión, los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos para determinar que el sistema es lineal.

R	0.9999
R²	0.9999
Intercepción	0.0014
Pendiente	0.9999
CV (%)	0.61
LIC_b	- 0.0456
LSC_b	0.0486

Tabla 7. Resultados del análisis de regresión, el CV y los intervalos de confianza (95%) para LSP, en un rango de concentración de 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

R	0.9999
R²	0.9998
Intercepción	0.0015
Pendiente	0.9998
CV (%)	0.47
LIC_b	-0.0365
LSC_b	0.0396

Tabla 8. Resultados del análisis de regresión, el CV y los intervalos de confianza (95%) para HCT, en un rango de concentración de 4.97-14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.5.1.2-PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para evaluar la precisión y exactitud del sistema se analizaron 3 diferentes concentraciones (5, 20, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y 4.97, 12.42, 14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT) preparadas por sextuplicado, en un día y un analista, bajo las condiciones normales de operación. En la tabla 9 se muestra el porcentaje de recobro, tanto para LSP como para HCT.

CONC ADD ($\mu\text{ mL}^{-1}$)		PORCENTAJE DE RECOBRO	
LSP	HCT	LSP	HCT
Concentración 1		103.07	100.20
5	4.97	100.63	100.29
		100.25	99.61
		100.25	100.11
		99.27	99.89
		98.97	99.92
Concentración 2		99.27	99.90
20	12.42	98.87	99.78
		99.59	100.12
		99.29	100.09
		99.77	100.11
		99.45	100.05
Concentración 3		100.22	100.17
25	14.90	99.95	100.40
		100.37	100.31
		100.34	100.47
		99.74	100.14
		100.48	100.28

Tabla 9. Porcentajes de recobro tanto para LSP como para HCT.

	LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT
	Concentración 1		Concentración 2		Concentración 3	
Promedio (%)	100.41	100.00	99.37	100.01	100.18	100.29
Desv. Est.	1.45	0.25	0.31	0.14	0.28	0.13
CV (%)	1.45	0.25	0.31	0.14	0.28	0.13

Tabla 10. Parámetros determinados para evaluar la precisión del sistema tanto para LSP como para HCT.

En la tabla 10 se pueden observar que el promedio de los porcentajes de recobro para cada concentración son muy cercanos al 100%, mientras que los valores de CV se encuentran por debajo de las especificaciones establecidas por la NOM 177, que es del 2.0% para ambos analitos con lo cual se puede decir que el sistema es preciso.

Por otra parte se evaluó calculando la t de student, presentada en la tabla 11, En donde se denota que la t calculada es menor que la t crítica por lo que se puede afirmar que el sistema es exacto para las tres concentraciones utilizadas.

	t calculada		t crítica	
	LSP	HCT	LSP	HCT
Concentración 1	0.28	0.02	2.57	
Concentración 2	-2.02	0.05		
Concentración 3	0.65	2.30		

Tabla 11. Cálculo de la t de Student para evaluar la exactitud del sistema considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

2.4.5.2- VALIDACIÓN DEL MÉTODO

2.4.5.2.1- LINEALIDAD

La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de la concentración de 16 mezclas de placebos cargados, en un rango de concentración de 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y de 4.97-14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT en HCl 0.1 N, preparadas por duplicado, a partir de soluciones stock para cada analito, en un día y un analista, bajo las condiciones normales de operación. En la tabla 12 se muestran tanto las concentraciones adicionadas como las concentraciones estimadas por el método de MCP para ambos analito.

OBSERVACIÓN	SISTEMA	CONC ADD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CONC EST ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		LSP	HCT	LSP	HCT
1	1	5	4.97	4.97	5.03
2	2	10	4.97	10.05	5.02
3	3	15	4.97	15.12	5.00
4	4	10	9.93	9.77	9.86
5	5	15	7.45	14.83	7.46
6	6	15	9.93	15.05	9.91
7	7	10	12.45	10.09	12.51
8	8	10	14.90	10.08	14.99
9	9	15	12.45	14.62	12.37
10	10	15	14.90	15.21	14.99
11	11	20	4.97	20.18	5.13
12	12	20	12.45	20.06	12.47
13	13	20	14.90	20.07	15.04
14	14	25	7.45	25.08	7.57
15	15	25	9.93	24.87	9.85
16	16	25	14.90	24.76	14.82
17	1	5	4.97	4.98	4.91
18	2	10	4.97	10.10	5.01
19	3	15	4.97	15.15	5.02
20	4	10	9.93	9.77	9.90
21	5	15	7.45	14.97	7.55
22	6	15	9.93	15.03	9.93
23	7	10	12.45	9.82	12.44
24	8	10	14.90	9.94	14.91
25	9	15	12.45	14.82	12.43
26	10	15	14.90	15.22	14.95
27	11	20	4.97	20.06	5.01
28	12	20	12.45	19.91	12.52
29	13	20	14.90	20.04	15.01
30	14	25	7.45	24.96	7.44
31	15	25	9.93	25.04	9.85
32	16	25	14.90	24.69	14.81

Tabla 12. Concentraciones adicionadas y estimadas de LSP e HCT, obtenidas para evaluar la linealidad del método.

En las Fig. 24 y 25 se observa la relación lineal que existe entre la concentración adicionada y la concentración estimada para cada uno de los analitos, corroborándolo con el análisis de variancia presentado en las tablas 13 y 14, en donde la f crítica es mayor que la f calculada, demostrando una vez más la linealidad del método.

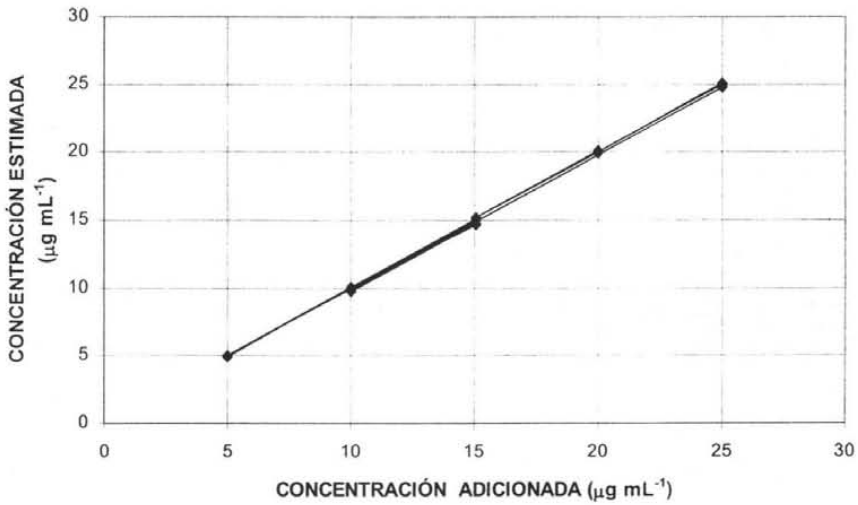


Fig. 24. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para LSP obtenido para evaluar la linealidad método.

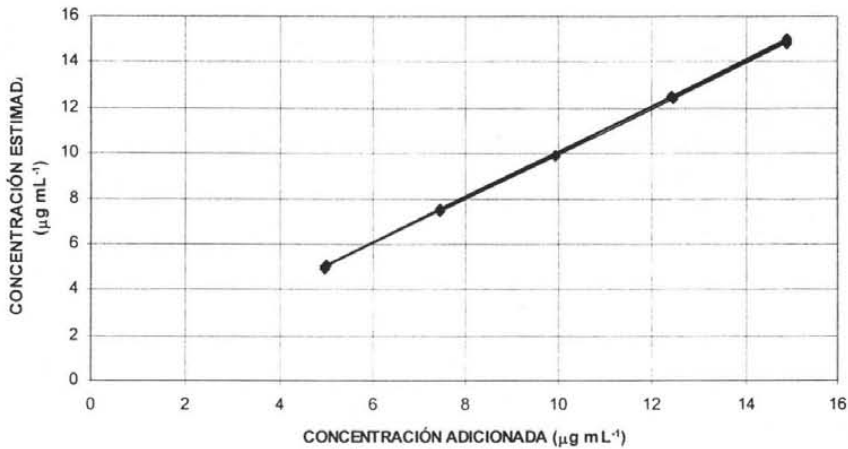


Fig. 25. Gráfico de concentración estimada contra concentración adicionada para HCT obtenido para evaluar la linealidad del método.

	gl	SC	CM	F calculada	F crítica
Regresión	1	1119.3679	1119.3679	46022.3718	2.3331E-49
Residuos	30	0.72966768	0.02432226		
Total	31	1120.09757			

Tabla 13. Análisis de variancia para LSP considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

	gl	SC	CM	F calculada	F crítica
Regresión	1	454.821575	454.821575	85878.1544	2.0236E-53
Residuos	30	0.1588838	0.00529613		
Total	31	454.980459			

Tabla 14. Análisis de variancia para HCT considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Asimismo, las tablas 15 y 16 muestran tanto el análisis de regresión como el CV, el cual es menor al 3% para ambos analitos y los intervalos de confianza (95%) en los cuales se incluye el valor de cero, por ende, los parámetros evaluados se encuentran dentro de los límites establecidos para determinar que el método es lineal.

R	0.9996
R²	0.9993
Intercepción	-0.0041
Pendiente	0.9988
CV (%)	1.08
LIC_b	- 0.1658
LSC_b	0.1575

Tabla 15. Resultados del análisis de regresión, el CV y los intervalos de confianza (95%) para LSP, en un rango de concentración de 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

R	0.9998
R²	0.9996
Intercepción	0.0367
Pendiente	0.9988
CV (%)	0.88
LIC_b	- 0.0382
LSC_b	0.1117

Tabla 16. Resultados del análisis de regresión, el CV y los intervalos de confianza (95%) para HCT, en un rango de concentración de 4.97-14.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La verificación de la linealidad se realizó en función del coeficiente de determinación y con el análisis de los residuales el cuál es presentado en las Fig. 26 y 27, tanto para LSP como para HCT. Éste análisis nos permitió confirmar que el método tiene un menor error de estimación para HCT que para LSP, dado que los residuales en este último presentan mayor dispersión.

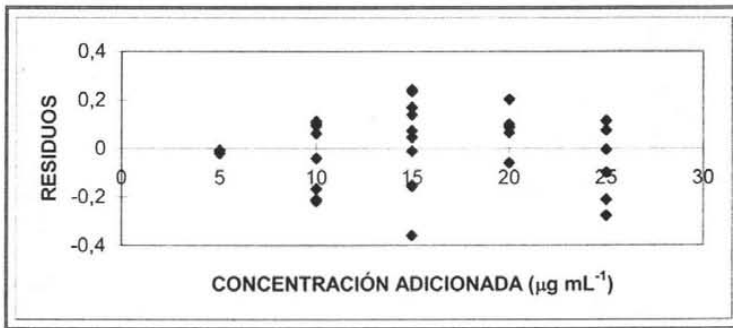


Fig.26 Gráfico de residuales para LSP.

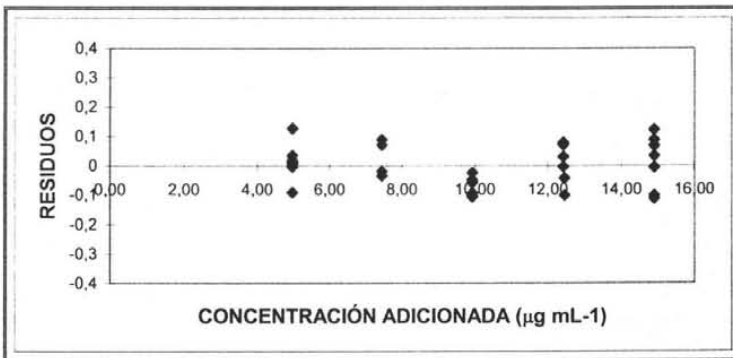


Fig.27 Gráfico de residuales para HCT.

2.4.5.2.2- PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Para evaluar la exactitud y la precisión del método se analizaron 3 diferentes concentraciones de placebos cargados (10, 20, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y 3.10, 12.42, 15.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT) por sextuplicado, en un día y un analista, bajo las condiciones normales de operación. En la tabla 17 se presentan tanto las concentraciones adicionadas como los porcentajes de recobro obtenidos para ambos analitos.

CONC ADD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		PORCENTAJE DE RECOBRO	
LSP	HCT	LSP	HCT
Concentración 1		100.84	101.32
10	3.10	99.68	100.73
		101.57	103.91
		99.68	100.72
		98.89	100.42
		98.48	99.96
Concentración 2		99.80	99.37
20	12.42	99.98	99.68
		100.40	99.73
		100.17	99.97
		100.73	100.11
		100.59	99.74
Concentración 3		99.24	99.71
25	15.52	99.85	99.91
		99.75	99.91
		99.34	100.13
		99.86	100.03
		100.19	100.16

Tabla 17. Porcentajes de recobro tanto para LSP como para HCT a tres diferentes niveles de concentración.

En la tabla 18 se puede observar que el valor de CV tanto para LSP como para HCT se encuentra dentro de las especificaciones marcadas por la NOM 177, este es, por debajo del 3%, y que el promedio de los porcentajes de recobro es muy cercano al 100% para dichos analitos, con lo que se puede decir que el método es preciso.

	LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT
	Concentración 1		Concentración 2		Concentración 3	
Promedio (%)	99.86	101.18	100.28	99.77	99.71	99.98
Desv. Est.	1.17	1.41	0.36	0.26	0.35	0.17
CV (%)	1.17	1.39	0.36	0.26	0.36	0.17
CV (%) Global	LSP	0.73	HCT	1.01		

Tabla 18. Parámetros determinados para evaluar la precisión del método tanto para LSP como para HCT.

La exactitud del método se evaluó con el CV global, el cual es 0.73% para LSP y 1.01% para HCT y con los intervalos de confianza los cuales incluyen el valor del 100% tanto en forma individual como de forma global, estos resultados mostrados en la tabla 19, nos aseguran la exactitud del método. Además se puede corroborar con la prueba de t de Student presentada en la tabla 20, en la que la t calculada es menor que la t crítica.

	Concentración 1		Concentración 2		Concentración 3		Global		
	LIC	LSC	LIC	LSC	LIC	LSC	LIC	LSC	CV(%)
LSP	98.63	101.08	99.90	100.66	99.33	100.08	99.58	100.31	0.73
HCT	99.70	102.66	99.50	100.03	99.80	100.15	99.80	100.81	1.01

Tabla 19. Intervalos de confianza (individual y global) y CV global para ambos analitos.

	t calculada		t crítica	
	LSP	HCT	LSP	HCT
Concentración 1	-0.12	0.84	2.57	
Concentración 2	0.77	-0.92		
Concentración 3	-0.83	-0.15		

Tabla 20. Resultados de la prueba de t de student, evaluada para la exactitud del método considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

2.4.5.2.3- REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad y la repetibilidad del método, se evaluó mediante la estimación por triplicado de 3 concentraciones de placebos cargados (10, 20, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y 6.21, 12.42, 15.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT), en 2 días y 2 analistas diferentes. En las tablas 21, 22 y 23 se muestran las concentraciones utilizadas y sus correspondientes porcentajes de recobro tanto para LSP como para HCT.

Concentración	LSP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	HCT ($(\mu\text{g mL}^{-1})$)
1	10	6.21
2	20	12.42
3	25	15.52

Tabla 21. Concentraciones empleadas para evaluar tanto la repetibilidad como la reproducibilidad del método.

LSP	Porcentaje de recobro			
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Dia 1	100.21	101.19	101.38
		100.86	101.38	101.50
		100.99	101.78	101.35
	Dia 2	101.26	101.28	100.60
		101.19	100.97	100.96
		101.07	100.91	100.91
Analista 2	Dia 1	100.47	99.55	100.68
		100.61	100.79	100.55
		99.10	99.25	99.56
	Dia 2	101.18	101.51	101.24
		101.06	101.73	99.14
		100.59	101.71	101.56

Tabla 22. Resultados de los porcentajes de recobro para Lisinopril.

HCT	Porcentaje de recobro			
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Dia 1	99.26	100.99	100.49
		99.57	101.02	100.48
		100.34	101.16	100.38
	Dia 2	99.55	100.17	99.01
		99.37	99.73	99.09
		99.50	99.69	99.08
Analista 2	Dia 1	99.22	99.01	100.10
		99.67	100.26	100.29
		101.65	101.55	100.68
	Dia 2	99.10	100.80	99.19
		99.27	100.86	99.30
		98.68	100.73	99.21

Tabla 23. Resultados de los porcentajes de recobro para Hidroclorotiazida.

Se realizó el ANADEVA para evaluar si el método era repetible entre días y reproducible entre analistas. Las tablas 24 y 25 muestran los ANADEVA en los que se puede observar que la f calculada para analistas es menor que su f crítica mientras que la f calculada para los días es mayor a su f crítica, esto para ambos analistas, lo cual quiere decir que el método es reproducible entre analistas pero no repetible entre días.

Fuente de variación	gl	SC	CM	f calculada	f crítica (0.05)
Concentración	2	0.5473	0.2736	0.8335	3.4
Analista	1	2.5156	2.5156	7.6627	18.51
Día	2	4.7840	2.3920	7.2862	3.4
Conc-Analista	2	0.0879	0.0439	0.1338	19
Conc-día	4	2.4910	0.6228	1.8970	2.78
Error	24	7.8790	0.3283		
Total	35				

Tabla 24. Análisis de variancia para LSP con un grado de confianza del 95%.

Fuente de variación	gl	SC	CM	f calculada	f crítica (0.05)
Concentración	2	5.4485	2.7242	8.4421	3.4
Analista	1	0.0129	0.0129	0.0401	18.51
Día	2	5.5581	2.7790	8.6119	3.4
Conc-Analista	2	0.0078	0.0039	0.0122	19
Conc-día	4	3.9000	0.9750	3.0214	2.78
Error	24	7.7447	0.3227		
Total	35				

Tabla 25. Análisis de variancia para HCT con un grado de confianza del 95%.

Sin embargo, existe otra forma para evaluar la repetibilidad del método, esta es, calculando el CV. Las tablas 26 y 27 presentan tanto los intervalos de confianza, los cuales se encuentran muy cercanos al 100%, como los CV para los analistas, los días y de manera global y se puede observar que todos los valores se encuentran dentro de los límites establecidos por la NOM 177 y la Guía de Validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, es decir, por debajo

del 3%. Asegurando por tanto, que el método si es repetible entre días y reproducible entre analistas.

Factor de evaluación	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)
Analista 1	100.92	101.28	0.35%
Analista 2	100.13	101.02	0.89%
Día 1	100.35	100.89	0.80%
Día 2	100.85	101.24	0.57%
Global	100.59	101.08	0.72%

Tabla 26. Muestra los intervalos de confianza a un grado de confianza del 95% y los CV para LSP.

Factor de evaluación	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)
Analista 1	99.587	100.289	0.71%
Analista 2	99.522	100.431	0.91%
Día 1	100.078	100.602	0.77%
Día 2	99.355	99.795	0.65%
Global	99.685	100.230	0.81%

Tabla 27. Muestra los intervalos de confianza a un grado de confianza del 95% y los CV para HCT.

En Estadística no paramétrica no se construyen modelos, y por ello, los descriptores no paramétricos pueden utilizarse cualquiera que sea la distribución de la población. En este caso, también se realizaron los diagramas de cajas con bigotes, los cuales son representaciones gráficas de los descriptores no paramétricos que ayudaron a comparar la variabilidad de los datos entre los analistas y en los diferentes días.

Las Fig. 28 y 30 muestran la variabilidad que existe entre los analistas, para ambos analitos. En el caso de LSP se puede observar una mayor dispersión de datos en el analista 2, sin embargo no hay diferencia significativa entre las medias pero si de la variancia, no siendo así para la HCT en donde se puede observar que no existe diferencia significativa ni de las medias ni de la variancia. La variación entre el día 1 y el día 2 se muestra en los gráficos 29 y 31 donde se denota que no existe diferencia significativa entre las medias ni entre las variancias, sin embargo tanto para LSP como para HCT, existe menor variabilidad en el día 2 que en el día 1.

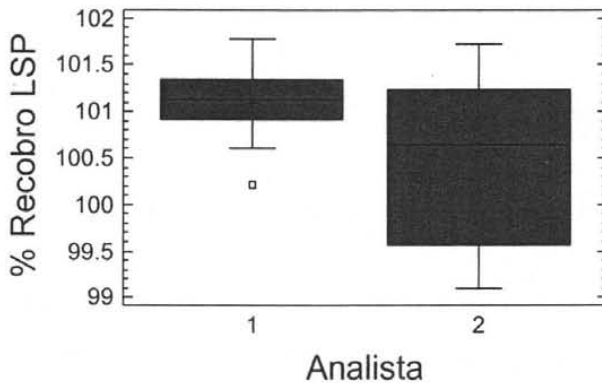


Fig. 28. Diagrama de cajas para comparar la variabilidad del % de recobro de LSP entre analistas.

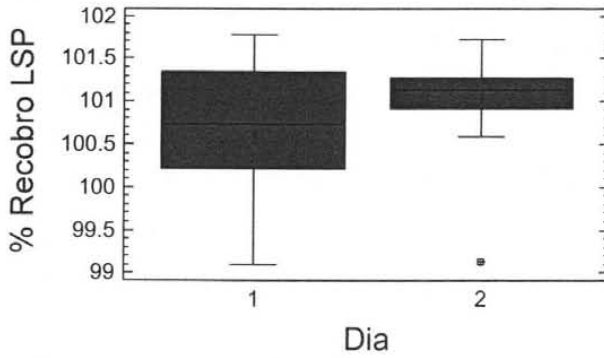


Fig. 29. Diagrama de cajas para comparar la variabilidad del % de recobro de LSP entre días.

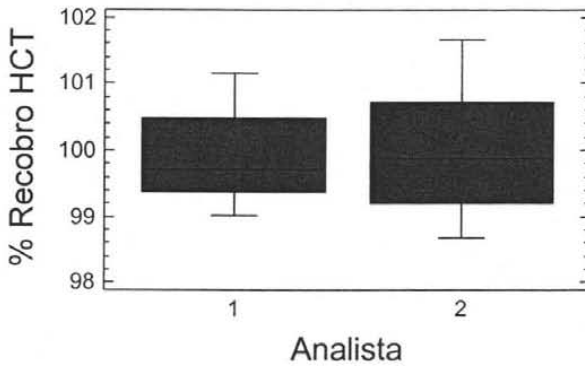


Fig. 30. Diagrama de cajas para comparar la variabilidad del % de recobro de HCT entre analistas.

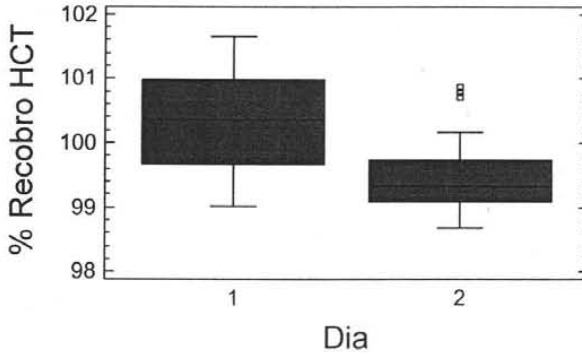


Fig. 31. Diagrama de cajas para comparar la variabilidad del % de recobro de LSP entre días.

2.4.5.2.4- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN

Tanto el límite de cuantificación como el límite de detección fueron estimados con la curva de calibración del método basada en la desviación estándar de regresión. Se calculó el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la regresión ($S_{x/y}$) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)) (Ver apéndice). Y se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{x/y}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{x/y}}{b_1}$$

La tabla 28 muestra los resultados, en donde los valores del límite de detección y el límite de cuantificación fueron 0.52, 1.56 para LSP y 0.24, 0.73 para HCT, respectivamente. Sin embargo, los resultados del LC, al realizarse experimentalmente no fueron ni precisos ni exactos, por lo que se estimó la concentración de un placebo cargado por debajo del intervalo de concentración de la curva de calibración del método, por sextuplicado, un analista, un día y bajo las condiciones normales de operación y los resultados obtenidos son presentados en la tabla 29.

	LSP [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	HCT [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
LD	0.52	0.24
LC	1.56	0.73

Tabla 28. Valores estimados teóricamente del LD y LC mediante la curva de calibración del método basada en la desviación estándar.

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Porcentaje de recobro	
LSP	HCT	LSP	HCT
10	2.48	99.56	98.53
		100.44	101.57
		101.14	99.61
		100.42	99.67
		102.34	101.05
		100.74	98.87
CV (%)		0.92%	1.20%
t calculada		0.8357	-0.0979
t crítica (0.05%)		2.57	

Tabla 29. Valores estimados experimentalmente para el límite de cuantificación.

Como se puede observar en la tabla 29, el CV es menor a 2% para ambos analitos, por otro lado la t crítica es mayor que la t calculada, lo cual quiere decir que tanto LSP como HCT son determinados con precisión y exactitud, por tanto los valores para el límite de cuantificación para LSP e HCT son 10 y 2.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

2.4.5.2.5- SENSITIVIDAD

La sensibilidad se evaluó analizando cinco concentraciones de placebos cargados por triplicado y mediante el cálculo de la DMS (Diferencia Mínima Significativa). La tabla 30 muestra tanto las concentraciones adicionadas como las concentraciones estimadas para LSP e HCT.

CONC ADD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CONC EST ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
LSP	HCT	LSP	HCT
19.11	11.90	18.93	11.86
		18.95	11.88
		18.99	11.87
19.53	12.22	19.20	12.12
		19.19	12.13
		19.20	12.14
20	12.42	19.78	12.51
		19.78	12.48
		19.88	12.56
20.41	12.80	20.00	12.57
		20.05	12.60
		19.99	12.56
20.88	12.99	21.30	13.07
		21.32	13.07
		21.38	13.10

Tabla 30. Concentraciones estimadas y adicionadas para ambos analitos.

En las tablas 31 y 32 se muestran los ANADEVA y los valores de DMS para ambos analitos. Asimismo, en las tablas 33 y 34 se presentan los valores obtenidos entre cada promedio para ser comparados con su respectivo DMS. Se puede apreciar que ninguna de las diferencias entre los promedios es menor a su respectivo DMS, por ende se establece que existe diferencia significativa entre las 5 concentraciones estudiadas.

Fuente de variación	gl	SC	CM	DMS
Concentración	4	10.3347	2.5837	0.0011
Error	10	0.0149	0.0015	
Total		10.3496		

Tabla 31. Análisis de variancia determinado para calcular el valor de la DMS para LSP.

Fuente de variación	gl	SC	CM	DMS
Concentración	4	2.5756	0.6439	0.0003
Error	10	0.0047	0.0005	
Total		2.5803		

Tabla 32. Análisis de variancia determinado para calcular el valor de la DMS para HCT.

Diferencias	C1	C2	C3	C4	C5
C1	0.000	0.236	0.854	1.056	2.372
C2	-0.236	0.000	0.617	0.820	2.136
C3	-0.854	-0.617	0.000	0.203	1.519
C4	-1.056	-0.820	-0.203	0.000	1.316
C5	-2.372	-2.136	-1.519	-1.316	0.000

Tabla 33. Diferencias de los promedios obtenidas para LSP.

Diferencias	C1	C2	C3	C4	C5
C1	0.000	0.266	0.648	0.708	1.215
C2	-0.266	0.000	0.383	0.442	0.949
C3	-0.648	-0.383	0.000	0.059	0.567
C4	-0.708	-0.442	-0.059	0.000	0.507
C5	-1.215	-0.949	-0.567	-0.507	0.000

Tabla 34. Diferencias de los promedios obtenidas para HCT.

2.4.5.2.6- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se prepararon 3 concentraciones de placebo cargados por triplicado, fraccionando cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés, siendo estas, con y sin protección de la luz, a temperatura ambiente y durante 72 horas. Para evaluar, se compararon las respuestas analíticas iniciales con las respuestas analíticas después del periodo de almacenamiento. Se calculó la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje, y la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición. En las tablas 35 y 36 se muestran las concentraciones utilizadas y los porcentajes de recobro para cada condición establecida tanto para LSP como para HCT. Mientras que en las tablas 37 y 38 se muestran los resultados de las diferencias absolutas de las muestras tanto protegidas como no protegidas de la luz.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0 Hrs.		24 Hrs.		48 Hrs.		72 Hrs.	
		LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT
LSP	HCT	PORCENTAJE DE RECUBRO							
10	4.97	100.38	100.18	101.81	101.64	103.02	102.23	105.45	101.95
		99.21	99.91	101.13	100.98	100.80	100.45	102.05	99.96
		100.04	100.87	103.38	102.72	101.98	101.97	104.82	102.00
20	9.93	100.34	100.64	101.46	100.87	102.07	101.32	102.02	100.95
		100.71	101.14	101.70	101.09	101.89	100.90	101.50	100.95
		102.02	102.25	103.67	102.13	102.65	101.35	101.90	100.96
25	12.42	102.20	101.95	101.76	101.12	101.55	100.52	101.43	100.67
		100.45	100.37	102.00	101.20	101.91	100.54	101.42	100.92
		100.31	100.55	102.15	100.91	101.02	100.10	101.28	100.78

Tabla 35. Porcentajes de recobro obtenidos para los sistemas que no fueron protegidos de la luz.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0 Hrs.		24 Hrs.		48 Hrs.		72 Hrs.	
		LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT	LSP	HCT
LSP	HCT	PORCENTAJE DE RECUBRO							
10	4.97	100.38	100.18	102.78	102.19	101.67	101.44	103.49	102.03
		99.21	99.91	102.99	103.32	100.78	100.77	102.40	99.95
		100.04	100.87	102.96	103.78	101.39	101.86	103.40	101.44
20	9.93	100.34	100.64	102.02	100.63	101.70	101.02	102.15	100.70
		100.71	101.14	102.37	101.11	101.85	100.80	103.07	100.74
		102.02	102.25	102.07	101.33	102.09	100.91	102.66	101.41
25	12.42	102.20	101.95	102.05	101.34	101.59	100.31	101.96	101.30
		100.45	100.37	102.42	101.20	101.80	100.42	101.05	100.48
		100.31	100.55	102.01	101.21	101.55	100.50	101.55	100.52

Tabla 36. Porcentajes de recobro obtenidos para los sistemas que fueron protegidos de la luz.

LSP($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SIN PROTEGER DE LA LUZ			PROTEGIDAS DE LA LUZ		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
10	2.227	2.057	4.229	3.034	1.403	3.221
20	1.257	1.183	0.783	1.134	0.861	1.608
25	0.984	0.507	0.389	1.178	0.658	0.531

Tabla 37. Diferencias absolutas de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial para LSP expresadas en %.

HCT($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SIN PROTEGER DE LA LUZ			PROTEGIDAS DE LA LUZ		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
4.97	1.461	1.231	0.982	2.776	1.037	0.821
9.93	0.018	-0.153	-0.390	-0.315	-0.429	-0.394
12.42	0.120	-0.570	-0.165	0.292	-0.546	-0.188

Tabla 38. Diferencias absolutas de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial para HCT expresadas en %.

De acuerdo a los resultados expuestos en las tablas 37 y 38 las diferencias absolutas para LSP se encuentran por debajo del 2%, excepto en el primer nivel de concentración a las 72 horas, mientras que para la HCT todas las diferencias son menores del 2%, así que como los dos analitos se encuentran juntos, se puede afirmar que tanto LSP como HCT en las muestras procesadas son estables durante 48 hrs. protegidas o no de la luz y a temperatura ambiente.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos concluir que el método propuesto:

- Es adecuado para cuantificar simultáneamente ambos analitos, sin la necesidad de separarlos.
- Es lineal en el rango de concentraciones utilizado.
- Preciso con un CV menor al 2% para las 3 concentraciones estudiadas.
- Exacto con un porcentaje de recobro de 99.71-100.28 para LSP y de 99.77-101.18 para HCT.
- Tiene un límite de detección de $0.51 \mu\text{g mL}^{-1}$ para LSP y $0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT.
- Su límite de cuantificación es de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Lisinopril y $2.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT.
- Es repetible entre días y reproducible entre analistas.
- Es capaz de cuantificar confiablemente tanto LSP como HCT en muestras almacenadas por 48 hrs., a temperatura ambiente, protegidas o no de la luz.

Por otra parte podemos concluir el método de Mínimos Cuadrados Parciales es adecuado para la cuantificación simultánea de ambos analitos, y cumple con los parámetros de validación especificados en la Guía de validación de FDA y del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

APÉNDICE

4.1- CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Las características del método, así como los valores de los criterios especificados de acuerdo a la Guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos para establecer la confiabilidad del método se presentan en la tabla 39:

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema	Coefficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$
	Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
	Coefficiente de correlación (r)	≥ 0.999
	Intercepto (b)	$= 0$
Precisión del sistema	Coefficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$
Exactitud del sistema	Prueba de t de student	$t_{calculada} < t_{critica} (\alpha=0.05, 5 \text{ gL})$
Linealidad del método	Coefficiente de variación (CV)	$\leq 3\%$
	Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
	Coefficiente de correlación (r)	≥ 0.999
	Intercepto (b)	$= 0$
	Pendiente (m)	$= 1$
Precisión del método	Coefficiente de variación (CV)	$\leq 3\%$
Exactitud del método	Prueba de t de student	$t_{calculada} < t_{critica} (\alpha=0.05, 5 \text{ gL})$
	Porcentaje de recobro	97-103%
	Coefficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro	$\leq 3\%$
Repetibilidad	Coefficiente de variación (CV)	Global $\leq 3\%$

Tabla 39. Criterios de aceptación para la validación del método de acuerdo a la Guía de Validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos y de la NOM 177, considerando que es un método espectrofotométrico.

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Reproducibilidad	Modelo anidado-cruzado Coeficiente de variación	$f_{\text{calculada}} < f_{\text{critica}} (\alpha=0.05, gL)$ Global $\leq 3\%$
Límite de cuantificación	Prueba de t de student Coeficiente de variación (CV)	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{critica}} (\alpha=0.05, 5 gL)$ $\leq 2\%$
Límite de detección	Coeficiente de determinación (r^2) IC (β)	≥ 0.98 No debe incluir el cero
Sensitividad	Diferencia Mínima Significativa	Se determina la magnitud
Estabilidad de la muestra procesada	Diferencia absoluta de la media aritmética	$\leq 3\%$

...Continuación de Tabla 39.

4.2- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

CALIBRACIÓN

HCl 0.1 N

- Colocar 500 mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1000 mL.
- Adicionar con una pipeta graduada 8.5 mL de HCl concentrado.
- Llevar al volumen de aforo con agua desionizada.

SOLUCIÓN PLACEBO

- Pesar la cantidad equivalente de excipientes contenidos en una tableta.
- Colocar en 900 mL de HCl 0.1 N desgasificado.
- Realizar disolución de la mezcla de excipientes en el aparato 2 USP, a 50 rpm y 40 °C, durante una hora y 30 minutos.
- Enfriar inmediatamente y filtrar a vacío con papel whatman no. 41.

SOLUCIÓN STOCK DE LISINOPRIL [125 µg mL⁻¹]

- Pesar en un vaso de precipitado sin graduación la cantidad equivalente a 31.25 mg de Lisinopril anhidro en una balanza analítica y disolver en la mínima cantidad de metanol.
- Colocar en un matraz volumétrico de 250 mL, enjuagando el vaso de precipitado 3 veces con la solución placebo.
- Llevar al volumen de aforo con la solución placebo.

SOLUCIÓN STOCK DE HIDROCLOROTIAZIDA [62.5 µg mL⁻¹]

- Pesar en un vaso de precipitado sin graduación aproximadamente 15.625 mg de Hidroclorotiazida en una balanza analítica y disolver en la mínima cantidad de metanol.
- Colocar en un matraz volumétrico de 250 mL, enjuagando el vaso de precipitado 3 veces con la solución placebo.
- Llevar al volumen de aforo con la solución placebo.

Nota: El contenido de humedad de Hidroclorotiazida es de 0.5 %.

SOLUCIONES ESTÁNDAR

- Tomar con una pipeta volumétrica 1 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo (**Solución Estándar 1**).
- Tomar con una pipeta volumétrica 1 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 6 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo. (**Solución Estándar 2**).
- Tomar con una pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo (**Solución Estándar 3**).

- Tomar con una pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 4 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo. **(Solución Estándar 4)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 6 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo **(Solución Estándar 5)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 3 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo **(Solución Estándar 6)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 3 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 6 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo **(Solución Estándar 7)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 4 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo **(Solución Estándar 8)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 4 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 3 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo **(Solución Estándar 9)**.

- Tomar con una pipeta volumétrica 4 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 6 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo (**Solución Estándar 10**).
- Tomar con una pipeta volumétrica 5 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 2 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo (**Solución Estándar 11**).
- Tomar con una pipeta volumétrica 5 mL de la solución stock de Lisinopril y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Adicionar con otra pipeta volumétrica 6 mL de la solución stock de Hidroclorotiazida. Llevar al volumen de aforo con la solución placebo (**Solución Estándar 12**).
- Leer cada solución estándar a las siguientes λ : 206, 209, 213, 219, 223, 224, 256, 266, 271, 275 y 280 nm. Utilizando como blanco HCl 0.1 N.
- Estimar las concentraciones de LSP e HCT utilizando el método de MCP.

SOLUCIÓN PLACEBO PARA EL MÉTODO

- Pesar la cantidad equivalente de excipientes contenidos en una tableta.
- Comprimir a 1.5 ton 3 seg. Triturar.
- Colocar en 900 mL de HCl 0.1 N desgasificado.
- Realizar disolución de la mezcla de excipientes en el aparato 2 USP, a 50 rpm y 37 °C, durante una hora y 30 minutos.
- Enfriar inmediatamente y filtrar a vacío con papel whatman no. 41

4.3- DISOLUCIÓN

Los ensayos de disolución se realizaron utilizando el aparato 2 descrito en la USP 25 (o de paletas) a una velocidad de agitación de 50 rpm, temperatura de 37 +/- 0,5 °C y como medio de disolución 900 mL de HCl 0.1 N. Las concentraciones de la mezcla LSP-HCT disueltas a los diferentes tiempos de muestreo se determinaron por espectrofotometría directa a 11 longitudes de onda (206, 209, 213, 219, 223, 225, 236, 266, 271, 275 nm).

Se realizó la disolución de 1 Lote del producto innovador (Zestoretic de Astra- Zeneca) por sextuplicado, para corroborar que el método utilizado cuantifica de manera adecuada a ambos analitos. La disolución fue manual por lo que la toma de muestra se realizó cada 3 minutos hasta el minuto 15, a partir de este, cada 5 hasta el minuto 40 y finalmente cada 10 hasta cumplir 1 hora. Las muestras fueron filtradas y posteriormente leídas a las 11 λ anteriormente mencionadas.

Las absorbancias obtenidas se analizaron por el Método de MCP y se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el % disuelto, el cual fue graficado contra el tiempo de muestreo, dando como resultado los perfiles de disolución para ambos analitos, los cuales son mostrados en las figuras 32 y 33.

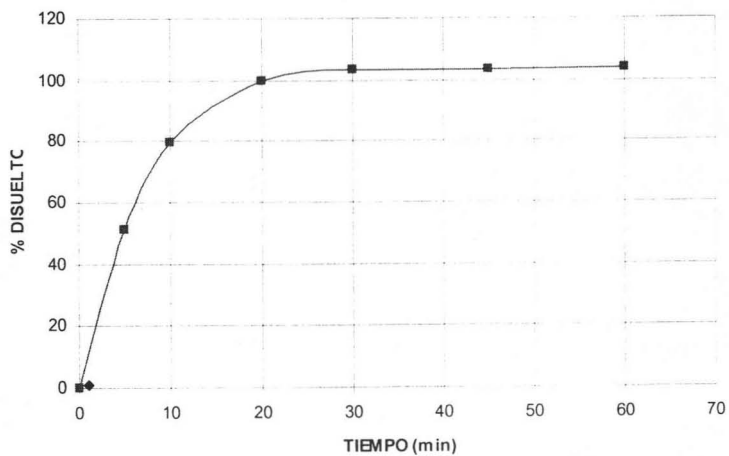


Fig. 32. Perfil de disolución de LSP

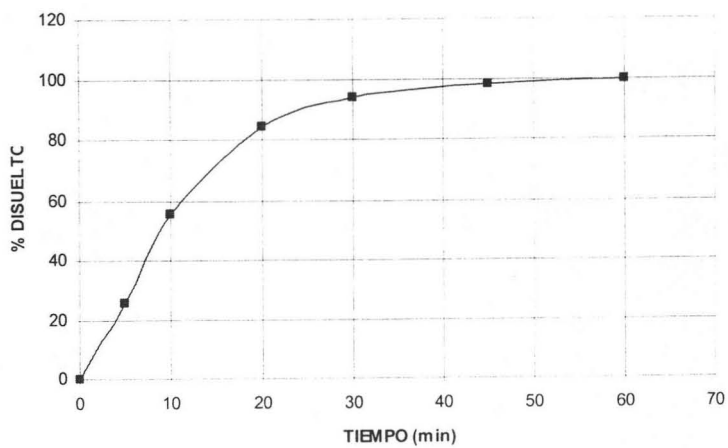


Fig. 32. Perfil de disolución de HCT

4.4- CÁLCULOS MATEMÁTICOS

4.4.1- ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA REPRODUCIBILIDAD Barrera, 2004, p 135

MODELO FACTORIAL ANIDADO-CRUZADO

Modelo matemático:

$$Y_{ijkL} = \mu + C_i + A_j + D_{(j)k} + CA_{ij} + CD_{ik(j)} + E_{i(j)k}$$

donde:

μ = Media general.

Y_{ijkL} = Porcentaje determinado asociado a la i ésima observación del k ésimo día del j ésimo analista para la i ésima concentración.

C_i = Efecto de la i ésima concentración sobre el porcentaje determinado.

A_j = Efecto del j ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$D_{(j)k}$ = Efecto del k ésimo día en el j ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

CA_{ij} = Efecto de la i ésima concentración y el j ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$CD_{ik(j)}$ = Efecto de la i ésima concentración y el k ésimo día en el j ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$E_{i(j)k}$ = Efecto al azar (error).

Representación de los datos:

		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Dia 1	Y_{1111}	Y_{2111}	Y_{3111}
		Y_{1112}	Y_{2112}	Y_{3112}
		Y_{1113}	Y_{2113}	Y_{3113}
	Dia 2	Y_{1121}	Y_{2121}	Y_{3121}
		Y_{1122}	Y_{2122}	Y_{3122}
		Y_{1123}	Y_{2123}	Y_{3123}
Analista 2	Dia 1	Y_{1211}	Y_{2211}	Y_{3211}
		Y_{1212}	Y_{2212}	Y_{3212}
		Y_{1213}	Y_{2213}	Y_{3213}
	Dia 2	Y_{1221}	Y_{2221}	Y_{3221}
		Y_{1222}	Y_{2222}	Y_{3222}
		Y_{1223}	Y_{2223}	Y_{3223}

Calcular las siguientes sumatorias:

$$Y_{i...}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{.j..}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{.jk.}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113})^2 + (Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213})^2 + (Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{ij..}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{ijk}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113})^2 + (Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123})^2 + (Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123})^2 + (Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213})^2 + (Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213})^2 + (Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213})^2 + (Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{\dots}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223} + Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223} + Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

Realizar la tabla de ANADEV A:

Fuente de variación	gl	SC	CM	f calculada	f crítica (0.05)
Concentración	a-1	SC _C	SC _C / a-1	CM _C /CM _{error}	f(gl _C /gl _{error})
Analista	b-1	SC _A	SC _A / b-1	CM _A /CM _{error}	f(gl _A /gl _{error})
Día	c-1	SC _D	SC _D / c-1	CM _D /CM _{error}	f(gl _D /gl _{error})
Conc-Analista	(a-1)(b-1)	SC _{C-A}	SC _{C-A} /(a-1)(b-1)	CM _{C-A} /CM _{error}	f(gl _{C-A} /gl _{error})
Conc-día	(a-1)(c-1) b	SC _{C-D}	SC _{C-D} /(a-1)(c-1) b	CM _{C-D} /CM _{error}	f(gl _{C-D} /gl _{error})
Error	(d-1) abc	SC _{error}	SC _{error} /(d-1) abc		
Total	N-1				

$$SC_C = (Y_{i\dots}^2/bcr) - (Y_{\dots}^2)/N$$

$$SC_A = (Y_{.j\dots}^2/acr) - (Y_{\dots}^2)/N$$

$$SC_D = (Y_{.jk\dots}^2/ar) - (Y_{.j\dots}^2/acr)$$

$$SC_{C-A} = (Y_{ij\dots}^2/cr) - (Y_{.j\dots}^2/acr) - (Y_{i\dots}^2/bcr) + (Y_{\dots}^2)/N$$

$$SC_{C-D} = (Y_{ijk\dots}^2/r) - (Y_{ij\dots}^2/cr) - (Y_{.jk\dots}^2/ar) - (Y_{.j\dots}^2/acr)$$

$$SC_{error} = (Y_{ijkl}^2) - (Y_{ijk\dots}^2/r)$$

a = No. de concentraciones.

r = No. de replicas.

b = No. de analistas.

N = abcr

c = No. de días.

4.4.2- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN Guía de Validación

de Métodos Analíticos, 2002, p 74.

Calculados de acuerdo a la desviación estándar de la regresión.

Fórmulas

Pendiente:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = No. de mediciones (concentración(x)-respuesta analítica (y))

Coficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{x/y} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Buscar el valor de $t_{0.975, n-2}$

4.4.3- SENSITIVIDAD Barrera, 2004, p 138

1- Realizar el análisis de variancia para determinar el cuadrado medio.

Modelo matemático: $Y_{ij} = \mu + C_i + E_{ij}$

a) Ordenar los datos de acuerdo a la siguiente tabla:

b)

Respuestas analíticas para cada nivel de concentración					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
	Y ₁₁	Y ₂₁	Y ₃₁	Y ₄₁	Y ₅₁
	Y ₁₂	Y ₂₂	Y ₃₂	Y ₄₂	Y ₅₂
	Y ₁₃	Y ₂₃	Y ₃₃	Y ₄₃	Y ₅₃
Promedio	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅

b) Calcular las siguientes sumatorias:

$$Y_{i.}^2 = (Y_{11} + Y_{12} + Y_{13})^2 + (Y_{21} + Y_{22} + Y_{23})^2 + (Y_{31} + Y_{32} + Y_{33})^2 + (Y_{41} + Y_{42} + Y_{43})^2 + (Y_{51} + Y_{52} + Y_{53})^2$$

$$Y_{..}^2 = (Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{53})^2$$

$$Y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + \dots + (Y_{53})^2$$

c) Construir la siguiente tabla

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados (CM)	f calculada	f crítica
Concentración	a-1	SC _C	SC _C /(a-1)	CM _C /CM _{error}	f(gl _C /gl _{error})
Error	(r-1) a	SC _{error}	SC _{error} /((r-1) a)		
Total	(ar)-1				

2- Realizar la prueba de DMS

- a) Calcular el promedio de las respuestas analíticas para cada nivel de concentración.
- b) Ordenar los promedios en forma creciente como se muestra en la siguiente tabla:

c)

Medias	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
Y ₁	y ₁ -y ₁	y ₂ -y ₁	y ₃ -y ₁	y ₄ -y ₁	y ₅ -y ₁
Y ₂	y ₁ -y ₂	y ₂ -y ₂	y ₃ -y ₂	y ₄ -y ₂	y ₅ -y ₂
Y ₃	y ₁ -y ₃	y ₂ -y ₃	y ₃ -y ₃	y ₄ -y ₃	y ₅ -y ₃
Y ₄	y ₁ -y ₄	y ₂ -y ₄	y ₃ -y ₄	y ₄ -y ₄	y ₅ -y ₄
Y ₅	y ₁ -y ₅	y ₂ -y ₅	y ₃ -y ₅	y ₄ -y ₅	y ₅ -y ₅

- c) Restar el valor de las medias entre si como se observa en la tabla anterior.
- d) Determinar el valor de DMS de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DMS = t_{0.05, 2, gl\ error} [(2CM_{error})/r]^{1/2}$$

- e) El valor de DMS obtenida debe ser comparado con la diferencia de las medias obtenidas.

4.4.4- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA Guía de Validación de Métodos

Analíticos, 2002, p 69.

Fórmulas

Media aritmética del análisis inicial

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras del análisis inicial.

Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de almacenaje.

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

El valor de d_i no debe exceder el 2%

*Utilizar el porcentaje de recobro.

ANEXO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	
1	Análisis de regresión para LSP.....	76
2	Análisis de regresión para HCT.....	77
3	Soluciones estándar de la matriz de calibración.....	78
4	Concentraciones de la linealidad del sistema.....	82
5	ANADEVA para LSP.....	84
6	ANADEVA para HCT.....	85
7	Análisis de regresión, CV e IC para LSP.....	86
8	Análisis de regresión, CV e IC para HCT.....	86
9	Porcentajes de recobro para LSP e HCT.....	87
10	Parámetros para evaluar precisión del sistema.....	87
11	t de student para evaluar exactitud del sistema.....	88
12	Concentraciones de la linealidad del método.....	89
13	ANADEVA para LSP.....	91
14	ANADEVA para HCT.....	91
15	Análisis de regresión, CV e IC para LSP.....	92
16	Análisis de regresión, CV e IC para HCT.....	92
17	Porcentajes de recobro para LSP e HCT.....	94
18	Parámetros para evaluar precisión del método.....	95
19	IC individuales y global para LSP e HCT.....	96
20	t de student para evaluar exactitud del método.....	96
21	Conc. para evaluar repetibilidad y reproducibilidad.....	97
22	Porcentajes de recobro para LSP.....	97
23	Porcentajes de recobro para HCT.....	98
24	ANADEVA para LSP.....	99
25	ANADEVA para HCT.....	99

26	IC y CV para LSP.....	100
27	IC y CV para HCT.....	100
28	Valores teóricos de LD y LC.....	104
29	Valores experimentales del LC.....	104
30	Conc. Est y add para evaluar sensibilidad.....	105
31	ANADEVA y DMS para LSP.....	106
32	ANADEVA y DMS para HCT.....	106
33	Diferencias de los promedios obtenidas para LSP.....	106
34	Diferencias de los promedios obtenidas para HCT.....	107
35	Porcentajes de recobro (s/protección de luz).....	108
36	Porcentajes de recobro (c/protección de luz).....	108
37	Diferencias absolutas para LSP.....	109
38	Diferencias absolutas para HCT.....	109
39	Criterios de aceptación para la validación.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título
1	Espectro de de absorción de LSP en diferentes medios de disolución.....21
2	Espectro de de absorción de HCT en diferentes medios de disolución.....24
3	Posibles análisis de multicomponentes.....26
4	Etapas en el desarrollo de métodos.....29
5	Vector de concentraciones y la matriz de absorbancias.....42
6	Gráfico de la SCERP contra el número de factores.....45
7	Desarrollo experimental.....66
8	Espectros de absorción de LSP, HCT y Mezcla en HCl 0.1N.....67
9	Espectros de absorción de LSP, HCT y Mezcla en NaOH 0.1N.....68
10	Espectros de absorción de LSP, HCT y Mezcla en agua.....68
11	Espectros de absorción de LSP, HCT y Mezcla en HCl 0.1N para demostrar aditividad.....69
12	Espectros de absorción de LSP ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....70
13	Espectros de absorción de LSP ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....71
14	Espectros de absorción de LSP ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....71
15	Espectros de absorción de HCT ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....72

16	Espectros de absorción de HCT ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....	73
17	Espectros de absorción de HCT ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) para demostrar interacción.....	73
18	Gráfico de valores de SCERP vs número de factores.....	74
19	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para LSP.....	76
20	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para HCT.....	77
21	Ensayo Analítico.....	80
22	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para LSP para linealidad del sistema.....	84
23	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para HCT para linealidad del sistema.....	85
24	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para LSP para linealidad del método.....	90
25	Gráfico de Conc. Est. vs. Conc. Add. para HCT para linealidad del método.....	91
26	Gráfico de residuales para LSP.....	93
27	Gráfico de residuales para HCT.....	93
28	Diagrama de cajas para LSP (entre analistas).....	101
29	Diagrama de cajas para LSP (entre días).....	102
30	Diagrama de cajas para HCT (entre analistas).....	102
31	Diagrama de cajas para HCT (entre días).....	103
32	Perfil de disolución de LSP.....	120
33	Perfil de disolución de HCT.....	120

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Amador, Hernández, J., López, Martínez L., Determinación simultánea de seis hidrocarburos policíclicos aromáticos en medio micelar por regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS1) utilizando espectros de fluorescencia de ángulo variable lineal, Instituto de Investigaciones Científicas; Guanajuato, México, 1999.
2. Archival, R.M., Criteria of Analytical Methods for Clinical Chemistry, Analytical Chemistry., Vol 22 (5) Mayo, 1950.
3. Baibing Li, Per A. Hazle, A non-linear nested partial least-squares, Centre for Process Analytics and Control Trchnology, School of Chemical Engineering and Advanced, England, October 2003.
4. Barrera, Galicia Mauricio, Aplicación de métodos de calibración multivariante en la cuantificación simultánea por espectrofotometría UV, de acetominofén (APAP) y naproxeno (NAP) presentes en un medio de disolución, Tesis, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 2004.
5. Calpena AC, Escribano E, Fernández C., Validación de los métodos analíticos, Farm Clin, 7(9), 1991.
6. Cladera, A, Alpizar, J, Estela, J.M., Cerdá, V., Catasús, M., Lastres, E., García, L., Analytica Chimica Acta, 1997.
7. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. México, 1997.

8. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Métodos Analíticos Validación. México: Secretaría de Salud, 1991.
9. Comité de Guías Generales de Validación. Proyecto de norma Técnica que establece las guías Generales de Validación, A.F.M. México, 1991.
10. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica, Mejora continúa de la calidad, Guía para los laboratorios de América Latina, Médica Panamericana, 1996.
11. El-Gindy, A. Ashour, A. Abdel-Fattah, L. Shabana, MM. Spectrophotometric and HPTLC-densitometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in binary mixtures, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 25(5-6, Egipto, 2001.
12. El-Yazbi, F.A. Abdine, HH. Shaalan, RA., Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the assay of lisinopril in single and multicomponent pharmaceutical dosage forms, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 19(6), Egipto, 1999.
13. Eugene C. Inman, Joseph K. Frischman. General Method Validation Guidelines for pharmaceutical samples, Journal of Chromatographic science, Vol 25, USA, 1997.

14. FDA, Guidance for industry validation of analytical procedures: methodology, USA Department of health and human Services, Noviembre 1996.
15. Ferraro, C. F., Mónica, Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hidrochlorotiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, Argentina, 2002.
16. Ficaró, S.M., Yshah, K.A., Validation of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography Assays, Pharmaceuticals Manufacturin, Beckman, USA, 1984.
17. Food and drug administration. Center for Drugs and Biologics, Department of Health and Human Service. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation, Febrero, 1987.
18. García Reynaldo, Lara Maricela, Jiménez Rubén, Consideraciones sobre algunos métodos matemáticos empleados en la comparación de perfiles de disolución, Centro de investigación y desarrollo de medicamentos (cidem), SINTEFARMA 8(1), Enero-Junio, 2002.
19. Gómez, Mirón Margot, Desarrollo de un método espectrofotométrico confiable para cuantificar la cantidad de sulfametazina sódica liberada en el proceso de dilución de bolos de liberación controlada, Tesis, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 1998.

20. Haaland, M.D., Thomas E.V., Partial Least Squares Methods for Spectral Análisis 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction for quantitative information, Analytical Chemistry, 1998, Vol. 60 (11).
21. Haaland, M.D., Thomas E.V., Partial Least Squares Methods for Spectral Análisis 2. Application to simulated and glass spectral data, Analytical Chemistry, 1998, Vol. 60 (11).
22. Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Goodman (eds.). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1996.
23. Harris, Daniel C., Análisis Químico Cuantitativo, 2a ed., Reverté, España, 2001.
24. Huber, L. Validación y validación de métodos. En Buenas prácticas de Laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Conceptos básicos, Hewler Packard, Holanda, 1995.
25. Islas, Hernández J. Alejandro, Desarrollo de un método espectrofotométrico UV para la obtención del perfil de disolución de una forma farmacéutica que contenga Trimetropin y Sulfametoxazol, Tesis, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2004.
26. Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte Y., Kaufman, L., Chemometrics: a textbood, Elsevier, Amsterdam, 1988.

27. McEvoy, G.K. (ed.). American Hospital Formulary Service- Drug Information 2002. Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 2002 (Plus Supplements).
28. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998.
29. O'Neil, M.J., The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001.
30. Osol, A. and J.E. Hoover, et al. (eds.). Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1975.
31. Paraskevas, G. Atta-Politou, J. Koupparis, M. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 29(5), Grecia
32. Rampazoo, P., Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. Il Farmaco, 45, 1990.
33. Ramis, Ramos Guillermo, Quimiometría, Síntesis, España, 2001.
34. Sane, RT. Valiyare, GR. Deshmukh, UM. Singh, SR. Sodhi, R., Simultaneous HPLC determination of lisinopril and hydrochlorothiazide from its pharmaceutical preparations, Indian Drugs. 29(Sep), 1992.
35. Sla, G., MasPOCH, S., Iturriaga, H., Blanco M., Cerdá. V., Pharm. & Biochem. Anal., 6, 1988, p 765.

36. Skoog, Douglas A., Principios de Análisis Instrumental, Mc Graw Hill, España.
37. United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopeia. 22ed. Easton: Mack Printing, 1990.
38. Wold, Svante, Michael Sjostrom a, Lennart Eriksson b., PLS-regression: a basic tool of chemometrics, a Research Group for Chemometrics, Institute of Chemistry, Umea University, SE-901 87 Umea, Sweden, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Vol. 58, 2001.
39. Zupan, J., Gasteiger, J., Neural Networks for Chemists. An Introduction, VCH, Weinheim, 1993.

DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

1. www.prof.uniandes.edu.co/~infquimi/ANALISIS/espectrofotometria/espectrofotometria.htm, 05092003
2. www.upo.es/depa/webdex/quimfis/GUIONE_1.PDF, 050903
3. www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/esp_opt.htm, 220304
4. www.calidadbioquimica.com.ar/error.htm, 09012004
5. [/www.calidadbioquimica.com.ar/error.htm](http://www.calidadbioquimica.com.ar/error.htm), 09012004
6. www.eumetrics.us.es/spanish/validar.htm, 19092003