



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

MÉTODOS DE SEPARACION PARA EL ANLISIS QUIMICO
Y EL DESARROLLO TECNOLÓGICO:

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HIDROCLOROTIAZIDA Y
CAPTOPRIL EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
POR ELECTROFORESIS CAPILAR.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :

ALMA ESTHER HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESORA: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS Y OTROS

A MIS PADRES ISMAEL Y ENEMIA

Porque me han dado todo, empezando por la vida, su tiempo (valiosísimo), su dedicación (admirable), su perseverancia (innata), sus enseñanzas (múltiples y en todos los sentidos). Siempre que tengo oportunidad he dicho una gran verdad: "No hubiera sobrevivido con otros padres", ya que ustedes tienen la mezcla de amor, sabiduría, tolerancia, sentido del humor, tolerancia (otra vez), un gran sentido de la responsabilidad y del compromiso y sobre todo tolerancia (sí, tolerancia, tolerancia y tolerancia). He creído firmemente toda mi vida que soy una persona muy afortunada por tenerlos y les agradezco el que me soporten y que no me hayan enviado nunca a la cárcel, al manicomio, a la calle o no se a donde más, tanto a mí como a la bola de malvivientes que tengo como amigos, conocidos y compañeros de juerga (Con sus excepciones claro esta). Ustedes (Padres míos) más que nadie, saben que soy una persona muy difícil, muy complicada y que no demuestro mis sentimientos con facilidad. Los AMO y estoy cien por ciento ORGULLOSA de ustedes, SON LAS PERSONAS MÁS AMABLES, INTELIGENTES, DECIDIDAS, COMPROMETIDAS Y EXITOSAS QUE CONOZCO, vivan intensamente como hasta ahora.

*Madre querida,
Madre adorada,
Que flota airosa,
Triunfante y feliz...
Queremos que luzca
En cada jornada...*

A MIS HERMANOS

Porque me sentí comprometida de mencionarlos, (jajajajajaja). Por estar conmigo siempre, por compartir su niñez, adolescencia y juventud conmigo, porque son mis hermanos y porque LOS QUIERO. Espero que cumplan todas sus metas y que sigan el ejemplo que nuestros padres nos han dado siempre. Ana te agradezco por darme el regalo de ver crecer a Frida Luz. Cuídala y edúcala lo mejor que puedas. Héctor, lucha por lo que quieres y se perseverante toda tu vida. Nalo, eres un triunfador y un ejemplo a seguir en todos los aspectos.

Cúidense y sean exitosos siempre.

*Y ante todo,
Sean siempre capaces
De sentir en carne propia
Cualquier injusticia*

Cometida contra cualquiera.

Che Guevara

A FRIDA LUZ

Porque eres una luz que guía nuestras vidas, porque eres una niña muy inteligente y talentosa que llegaste a cambiar mi percepción del mundo y de las relaciones humanas. Disfruta de tu niñez y de la vida todo lo que puedas. Se Feliz y ¡VIVE!

*Majestic, majic
infinite
my little girl is
sun on the carpet
-out the door
picking a flower, ha!
an old man,
battle-wrecked,
emerges from his
chair
and she looks at me
but only sees
love,
ha!, and I become
quick with the world
and love right back
just like I was meant
to do.*

Marina, poem by Charles Bukowski

Agradecimientos varios a la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, porque sin su ayuda, no estaría elaborando esta tesis, por sus consejos, regaños y apoyo en todo. Por sus jalones de oreja y porque confió en que 2 años después de mi prolongada ausencia, terminé la elaboración de esta, mi tesis.

Agradezco a todas las personas que directa e indirectamente han estado presentes en mi vida. Me han ayudado a forjar mi carácter para bien y para mal. Compartimos muchas cosas en nuestra vida personal y académica, por esos bellos tiempos que tanto añoro.

Quiero agradecer a mis Amiguísimas Elizabeth Canseco Pérez y Cristina Osiris Sánchez por todo, su amistad invaluable y su conocimiento pleno de mis indiscreciones, porque sé

que puedo contar con ustedes para lo que quiera, cuando quiera y como lo quiera. Gracias chicas, ustedes son el lado fresa y decente de mi conciencia.

*A **Mayra Esther Rojas**, te agradezco infinitamente tu ayuda en todos los aspectos. Durante la bendita carrera no eras de mi agrado, pero ahora, tiempo después, te he llegado a estimar demasiado. Cuida de ti de la misma forma en que cuidas a tu pequeño.*

*A **Rogelio Serrato** por tu gran ayuda, por tramitar mi papelería engorrosa y porque me caes bien.*

Envío un saludo afectuoso a la pandilla femenina de la FEESC, mujeres como nosotras ya no hay (gracias a dios, jajajajajajajaja), las voy a mencionar para que se sientan queridas e importantes:

***Emily** (Por tu amistad y tu alegría desbordante, 🎵 Mueve tus patitas, tortuga de bar, tortuga de bar... 🎵).*

***China Salvaje** (Por sacrificarte por la banda en tiempos de escasez, tú me entiendes).*

***Fionobertha González** (Tu gran fundamento en la vida también ayudó a sobrevivir, nunca cambies).*

***Luz Eleine** (Tus sacrificios en bienestar de la pandilla son únicos).*

Saludos afectuosos a todos los que me restan, los aprecio...

***Fidel** por nuestra "Aventura" bibliotecaria, que casi nos cuesta (a ti) el empleo y (a mí) la expulsión escolar.*

***Pollo** como has cambiado, me decepcionas...*

Y a todos los que me faltaron...

A la UNAM DGAPA por el apoyo brindado a los proyectos PAPIIT208608 y PAPIIME 203405

Al CONACYT por los recursos del proyecto 52723 (2007).

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. GENERALIDADES	6
2.1 Fundamentos de la Electroforesis Capilar (EC)	6
2.2 Validación de Métodos Analíticos	12
2.3 Parámetros de desempeño a evaluar en una validación.	15
2.4 Propiedades fisicoquímicas de los activos	16
2.3.1 Hidroclorotiazida	16
2.3.2 Captopril	18
3. OBJETIVOS	22
4. PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1 Material y equipo	24
4.2 Reactivos	24
4.3 Plan de trabajo	25
4.5 Procedimientos	26
4.4.1 Preparación de Soluciones	26
4.4.2 Obtención de electroferogramas	27
4.4.3 Plan para la Validación de la metodología analítica	28
5. RESULTADOS Y DISCUSION	35
5.1 Optimización del método	35
5.1.1 Electrolito soporte	35
5.1.2 Temperatura del capilar	36
5.1.3 Longitud del capilar	37
5.1.4 Lavado entre corridas	38
5.1.5 Acondicionamiento del capilar	39
5.2 Validación del Método Analítico	40
5.2.1 Adecuabilidad del sistema	40
5.2.2 Linealidad del sistema	42
5.2.3 Especificidad	48
5.2.4 Exactitud y repetibilidad del método	49
5.2.5 Linealidad del método	51
6. CONCLUSIONES	61
7. REFERENCIAS	63

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La calidad de los medicamentos es un tema de gran importancia tanto para los laboratorios farmacéuticos, como para las personas a las que están destinados, a pesar de que estas no tengan contacto directo con los estudios de calidad de cada medicamento que utilizan, sin embargo confían en que cumplan con los parámetros de calidad requeridos [1].

Los parámetros de calidad mencionados se encuentran establecidos en varios documentos oficiales como la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), así como las normas oficiales mexicanas relacionadas a la calidad de los medicamentos; además de la FEUM se utilizan como respaldo otras farmacopeas como la USP, la británica o la europea [2].

Entre los parámetros de calidad, la valoración del principio activo presente en cada forma farmacéutica es fundamental y esta se realiza siguiendo un método analítico previamente desarrollado, dichos métodos permiten determinar si los productos farmacéuticos cumplen con las especificaciones marcadas con respecto al contenido de él o los principios activos presentes en ellos, según su marbete [3].

La validación de un método o procedimiento analítico surge de la necesidad de tener métodos analíticos que no presenten variaciones durante su uso cumpliendo con su proceso analítico para obtener datos exactos, precisos y sobre todo confiables [4]. Se llevan a cabo pruebas en el laboratorio que cumplan con parámetros y criterios de aceptación previamente establecidos [1].

Una de las guías más consultadas en la industria farmacéutica es la llamada "Validation of Compendial Methods" encontrado en el apartado de métodos generales de la USP. Existen Guías como la de Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés) y la Guía International Conference Harmonisation (ICH por sus siglas en inglés) las cuales describen los parámetros de validación [5].

En nuestro país existen guías como la de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB (CNQFB) y normas como la Norma Oficial NOM-059. Buenas prácticas de fabricación y otras normas relacionadas publicadas en el diario oficial de la Federación [1].

En este trabajo se llevó a cabo la optimización y posterior validación de un método analítico previamente desarrollado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos (L-401), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, U.N.A.M., [3]. Dicho trabajo presenta el desarrollo de una metodología analítica que permite la separación y determinación cuantitativa de captopril e hidroclorotiazida en tabletas, empleando la técnica de electroforesis capilar [6].

2. GENERALIDADES

2. GENERALIDADES

2.1 Fundamentos de la Electroforesis Capilar (EC)

La electroforesis capilar se basa en los mismos principios de la electroforesis convencional, pero utiliza condiciones y tecnología distinta que permiten obtener una serie de ventajas en comparación a la electroforesis tradicional. La separación se realiza empleando un capilar de sílice fundida empleando potenciales elevados 20 a 30 kV, en un campo de 400 a 500 v/cm, utilizando además un sistema de enfriamiento para el capilar [7].

La corriente electroosmótica o flujo electroosmótico (FEO) generado por la ionización de los grupos silanol de la superficie interna del capilar, da como resultado un frente plano de líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución.

Otra ventaja de la electroforesis capilar (Fig. 1) es que el capilar de sílice fundida, que generalmente se cubre con una capa de poliimida para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja, que permite, a través de él, el paso de la luz UV/VIS, de tal manera que la detección es "on-line". Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea [7].

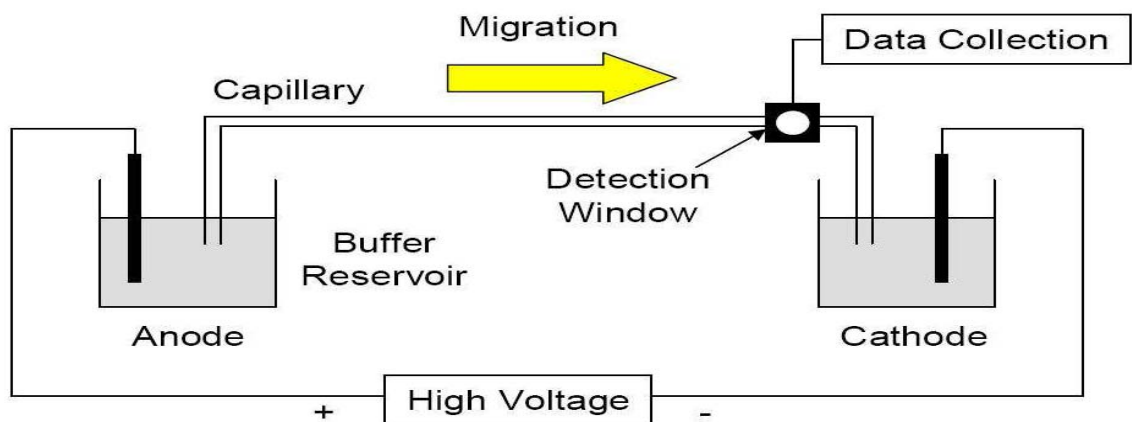


Fig. 1 Esquema general del equipo de electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) también llamada electroforesis capilar de zona (ECZ), electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), o electroforesis capilar de solución independiente (FSCE), se parece a la técnica de cromatografía de alta resolución (HPLC), ya que para el análisis de una muestra se usan parámetros similares [6].

La electroforesis capilar es una técnica relativamente nueva, muy eficiente y de bajo costo. Se utiliza en la separación de una amplia gama de compuestos y diversos tipos de muestras, determinándose desde metales y compuestos inorgánicos hasta compuestos orgánicos en fluidos biológicos, alimentos, fármacos, entre otros. El problema fundamental en México es que ésta técnica no se ha difundido mucho y se emplea preferentemente el HPLC debido a que muchos métodos ya están establecidos en ésta técnica y en los documentos base de análisis en diferentes sectores industriales; aunado a ello se encuentra la falta de tiempo o recursos económicos para realizar investigación en el desarrollo de nuevos métodos por parte del sector industrial.

En CE, la separación depende de las diferentes velocidades con que migran los analitos a través de un medio conductor (tampón) en respuesta al campo eléctrico generado por la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos; la velocidad con la que se mueve un analito depende en gran medida de su relación carga/masa [7].

Las especies de la muestra están sometidas a dos efectos principales. 1) la movilidad electroforética propia o aparente (μ_{EF}) y la movilidad del flujo electroosmótico o movilidad electroosmótica (μ_{EO}). Para iones del mismo tamaño, la fuerza impulsora será mayor en el de mayor carga y tendrá una velocidad de migración más rápida. Para los iones que presentan la misma carga, la fuerza de rozamiento será menor en el ión más pequeño y tendrá una velocidad de migración mayor. Esto se cumple cuando las especies se analizan en polaridad normal (Fig. 2)

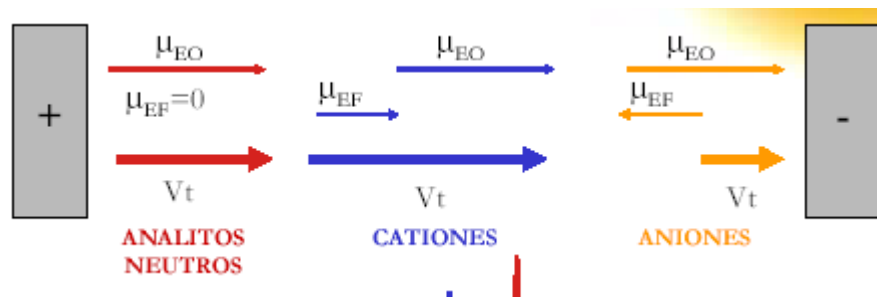


Fig.2 Migración de los diferentes analitos.

La velocidad de migración de un ión, ($V_{EF} = \text{cm /s}$) depende de la intensidad del campo eléctrico (E) y de la movilidad electroforética ($\mu_{EF} = \text{cm}^2/\text{V s}$) que tendrá el signo según la naturaleza catiónica o aniónica de la especie; de tal manera que se tiene:

$$\boxed{V_{EF} = \mu_{EF} E} \quad \text{Ecuación 1.0}$$

E es la magnitud del campo aplicado ($V = \text{volts}$) y la longitud L sobre la que se aplica:

$$\boxed{V_{EF} = \mu_{EF} \frac{V}{L}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

$$\boxed{E = \frac{V}{L}} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Al aplicar una diferencia de potencial elevada se tendrán migraciones y separaciones rápidas.

El flujo del electrolito soporte o flujo electroosmótico (FEO) se caracteriza por su movilidad electroosmótica propia (μ_{EO}):

$$\boxed{\mu_{EO} = \frac{V_{EO}}{E}} \quad \text{Ecuación.... 2}$$

Este flujo se produce porque las paredes del capilar contienen grupos silanol (Si-OH) que a un pH ácido, se ionizan formando iones de silanoato (Si-O^-) con carga negativa. Los cationes presentes en la solución tienen interacciones con los iones silanoato formando una doble capa difusa (Fig 3).

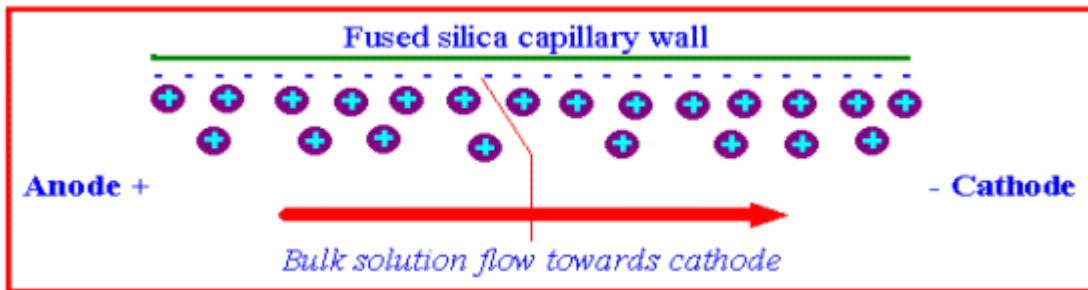


Fig. 3 Esquema del FEO generado dentro del capilar.

La velocidad del FEO está dada por:

$$v = (\mu \pm \mu_{EO}) / VL \quad \text{Ecuación..... 2.1}$$

L= longitud total del capilar.

V= voltaje aplicado

La movilidad electroforética de un analito se determina experimentalmente como sigue:

$$\mu = \left(\frac{lL}{VTm} \right) \quad \text{Ecuación..... 2.2}$$

μ (cm² / V min)

l= longitud al detector.

L= longitud total del capilar.

V= voltaje aplicado

Tm= tiempo de migración

Para determinar el tiempo de migración (tm) se tiene:

$$tm = \frac{lL}{(\mu_{EF} + \mu_{FEO})V} \quad \text{Ecuación 3}$$

Así, se tiene que aplicando un mayor voltaje o con un capilar más corto se reduce el tiempo de análisis.

La movilidad electroforética de un analito se determina experimentalmente como sigue:

$$\mu \text{ (cm}^2 \text{ / V min)} = (l_D \text{ LT} / \text{V tm}) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

l_D = longitud al detector.

l_T = longitud total del capilar.

V = voltaje aplicado.

Como consecuencia de una velocidad alta del FEO (pH mayor a 7) el orden de migración es:

1. Cationes pequeños y carga elevada.
2. Cationes de carga menor y mayor tamaño.
3. Todas las especies neutras, junto con el FEO.
4. Aniones grandes y menor carga.
5. Aniones más pequeños y de mayor carga.

Eficiencia

La eficiencia [8], se define en base a dos términos: 1º *la altura del plato H* y 2º *el número de platos N*. La eficacia aumenta cuanto mayor es el número de platos, y cuanto menor es la altura de plato. Las eficacias en términos de número de platos varían de cientos a miles, y las alturas de plato de unas pocas décimas a milésima de centímetro o menos.

La eficiencia depende de los platos teóricos [8], y se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{Tm}{W} \right)^2$$

Ecuación 4

W = ancho de pico

Tm = tiempo de migración

Esta es independiente de la longitud del capilar.

Resolución

Es el parámetro cuantitativo [8] de la capacidad para separar dos analitos; esta dada en términos de selectividad ($\Delta\mu$ y la eficiencia); es influenciada por tanto en factores como $\Delta\mu$ (movilidad electroforética de los analitos), voltaje aplicado, temperatura y flujo electroosmótico. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$R = \left(\frac{Tm_2 - Tm_1}{0.5(W_1 + W_2)} \right)$$

Ecuación 5

La resolución es menor si existe un FEO alto en el mismo sentido de la migración de los analitos. [9]

2.2 Validación de Métodos Analíticos

Validación: "Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto." [10].

La validación se define como el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas [10].

Los estudios de validación verifican el sistema en estudio y en condiciones de prueba extremas semejantes a las que cabría esperar durante el proceso, a fin de comprobar que dicho sistema está bajo control. Una vez que el sistema o proceso se ha validado, cabe prever que permanezca bajo control, siempre y cuando no se hagan cambios en el mismo. Si se producen modificaciones o surgen problemas, o si un equipo se sustituye o se cambia de ubicación, habrá que efectuar la revalidación. Los equipos y procesos de importancia crítica se revalidan en forma sistemática a intervalos adecuados a fin de demostrar que el proceso sigue bajo control [11].

La validación de valoraciones (ensayos) analíticas es el proceso por el cual se establecen una o varias de las siguientes propiedades del tipo de valoración correspondiente: exactitud, precisión, linealidad, intervalo, límite de detección, límites de cuantificación, especificidad y robustez. Los métodos fisicoquímicos tienen límites definidos aceptados para estos parámetros de prueba [12].

Dependiendo del uso del ensayo, durante la validación habrá que medir diferentes parámetros. La OMS, varios organismos normativos y las farmacopeas han publicado información sobre la validación de procedimientos analíticos [12 - 15].

La **exactitud** es el grado de concordancia entre el valor real del fármaco y el valor medido [16]. Para medir la exactitud se efectúan estudios de picos de

adición y recuperación de cantidades conocidas: se agrega una cantidad conocida de analito a los excipientes y el valor real del medicamento se compara con el valor determinado mediante la valoración. La exactitud se expresa como el desvío o el error porcentual entre el valor observado y el valor verdadero ($\text{valor experimental} / \text{valor real} \times 100\%$).

La **precisión** es el grado de concordancia entre los valores obtenidos en una valoración [11]. Se expresa como el coeficiente de variación (CV%). El coeficiente de variación es el cociente entre la desviación estándar de los valores del ensayo y la concentración del analito. Se pueden medir varios tipos de precisión: intra-ensayo (repetibilidad), que es el CV% de determinaciones múltiples de una sola muestra en una sola tanda de pruebas; inter-ensayo (también llamada precisión intermedia), que se expresa como el CV% de determinaciones múltiples de una sola muestra, controles y reactivos analizados en varias tandas de ensayos realizados en el mismo laboratorio; por último, la reproducibilidad, que es la precisión entre distintos laboratorios, se suele determinar con motivo de estudios en colaboración y no tiene importancia directa para la validación de ensayos en una planta productora.

La **robustez** es la capacidad de una prueba de no ser afectada por cambios deliberados en diversos parámetros del método y constituye un indicio de su confiabilidad en las condiciones de ensayo normales [11]. Las variaciones pueden estar en la temperatura o la humedad del cuarto o la incubadora, en los tiempos de incubación, en el pH (dentro de un pequeño margen) de un reactivo, etc. La exactitud y la precisión u otro parámetro de la valoración se pueden medir en cada una de esas condiciones para determinar qué variaciones son toleradas en las condiciones de ensayo.

Por **linealidad** se entiende la capacidad de una prueba de generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra [11]. El valor de este parámetro determinará el intervalo de la valoración analítica. Puede expresarse como la pendiente de la línea de regresión y su varianza o como el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R).

El **intervalo** es una medida de la concentración más elevada de analito susceptible de ser medida con exactitud y precisión aceptables. Constituye el límite superior de la determinación de linealidad [11]. Si la relación entre respuesta y concentración no es lineal, el intervalo puede calcularse mediante una curva de calibración.

La **selectividad** (también llamada especificidad) es la capacidad de una valoración analítica para medir el analito en una muestra en presencia de otros componentes previsibles en el producto [11]. Este parámetro se determina para las pruebas de identidad, pruebas de contenido o potencia y pruebas de pureza, para asegurar que la prueba permite establecer con exactitud la identidad, la potencia o la pureza de un producto.

La selectividad (especificidad), de manera análoga a la exactitud, se expresa como el desvío o el error porcentual entre el valor medido y el valor conocido.

El **límite de detección** (LDD) es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como una concentración o cantidad exacta [11].

El **límite de cuantificación** (LDC) es la cantidad más baja de analito que puede medirse cuantitativamente en una muestra con exactitud y precisión aceptable [11]. El LDC es un parámetro para las pruebas que miden la presencia de impurezas en un medicamento.

El siguiente cuadro está basado en el documento de la OMS sobre validación de pruebas analíticas [15]. Como se observa, dependiendo de la aplicación del método a validar, los parámetros de desempeño a evaluar pueden variar.

Tabla 1. Parámetros de desempeño a evaluar durante una validación

Parámetros funcionales importantes para validar diferentes tipos de procedimientos analíticos					
Parámetro	Identidad	Impurezas		Potencia	Composición
		Cuantificación	Límites		
Exactitud		+		+	+
Precisión		+		+	+
Robustez	+	+	+	+	+
Linealidad e intervalo		+		+	+
Selectividad (especificidad)	+	+	+	+	+
Límite de detección	+		+		
Límite de cuantificación		+			

2.4 Propiedades fisicoquímicas de los principios activos [6].

2.4.1 HIDROCLOROTIAZIDA (HCT)

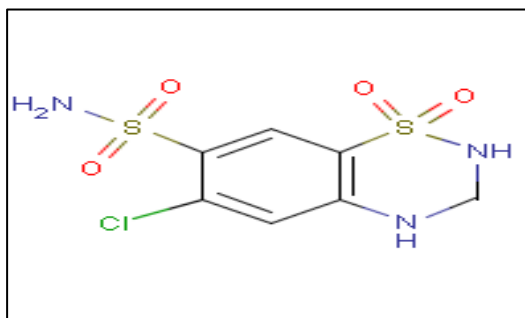


Fig. 4 Estructura química de la Hidroclorotiazida .

Fórmula molecular:	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$
Peso molecular:	297.74 g / mol
Punto de fusión:	273-275 °C
Constante de disociación ácida:	$pK_{a1} = 7.9, pK_{a2} = 9.2$

Designado como: 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido.

Descripción: Polvo blanco cristalino

Solubilidad: Poco soluble en agua 722mg/L a 25°C Soluble en disolución de hidróxido de sodio, metanol, etanol, acetona, n-butilamina, dimetilformamida.

Origen y Química

Son medicamentos de origen sintético y pertenece al grupo de las Tiazidas o Benzotiazinas.

Farmacodinamia.

En pacientes hipertensos provoca un descenso apreciable de la presión sistólica y diastólica, la reducción promedio de la presión arterial es de 30 mmHg para la sistólica y de 15 mmHg para la diastólica. El efecto hipotensor aparece a los 2 ó 3 días después de iniciada la administración del fármaco por vía oral, al

mismo tiempo que se produce una depleción de agua y sodio por el riñón (acción diurética y natriurética) y una reducción del líquido extracelular y de plasma sanguíneo en forma constante; la respuesta antihipertensiva máxima se produce a las 2 o 3 semanas.

Como consecuencia de la reducción del volumen sanguíneo y baja concentración de sodio, se produce un aumento de liberación de renina con aumento de la actividad de la renina plásmica y a la larga, aumento de la secreción de aldosterona que al provocar retención renal de sodio puede contrarrestar la acción diurética después de tratamiento prolongado.

Modo de acción de los diuréticos antihipertensivos

Se ha demostrado que después de varias semanas de tratamiento, el volumen de líquido extracelular y del plasma sanguíneo y el volumen minuto cardiaco vuelven a sus valores normales, mientras que la acción hipotensora continúa.

En cuanto al sinergismo de los diuréticos con antihipertensivos, se debe sobre todo a que los diuréticos contrarrestan la retención de agua y sodio que provoca la mayoría de dichos compuestos y que produce un aumento del líquido extracelular y del plasma sanguíneo, y por ende de la presión arterial, todo lo que es obviado por los diuréticos .

Toxicidad

Son importantes los trastornos por depleción de potasio.

Indicaciones terapéuticas y plan de administración

Se han de utilizar en todos los casos de hipertensión arterial, algunas veces solos, pero sobre todo junto con otros medicamentos antihipertensivos. En pacientes que reciben medicamentos antihipertensivos y se desea añadir diuréticos, la dosis de aquellos deben reducirse siendo la dosis para hidroclorotiazida de 50mg.

Los diuréticos antihipertensivos pueden ser suficientes por si solos en caso de hipertensión leve, pero si la presión arterial no se normaliza en un mes, se agregan otros medicamentos antihipertensivos. Para la hipertensión grave se comienza directamente con una asociación medicamentosa con diuréticos [6].

2.4.1 CAPTOPRIL(CAP) [6]

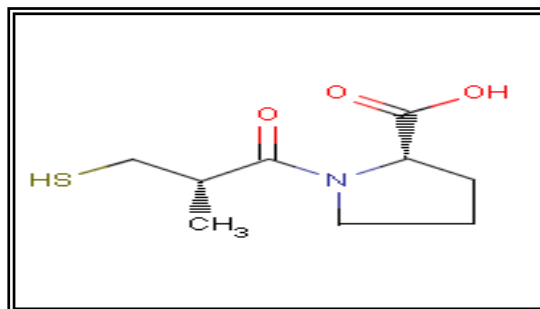


Fig. 5 Estructura química del Captopril.

Formula química:	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S
Peso molecular:	217.29g / mol
Punto de fusión:	103-104 °C
Constante de disociación ácida:	pKa ₁ = 3.7; pKa ₂ = 9.8
Coefficiente de partición:	log K _D = 0.34
Designado como:	1-(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil-L-prolina.

Descripción: Polvo cristalino blanco y grisáceo que puede tener un olor ligeramente sulfuroso.

Soluble en: Agua (160mg/ml), metanol, etanol, diclorometano y cloroformo.

Origen y Química

Los inhibidores del sistema renina - angiotensina (captopril, derivado del aminoácido L-prolina) tienen la propiedad de inhibir la enzima convertidora de la angiotensina I en angiotensina II. Es el antihipertensivo más conveniente, potente y activo por vía oral. [6]

Farmacodinamia

Los efectos beneficiosos del captopril en la hipertensión y la insuficiencia cardíaca parecen resultar fundamentalmente de la supresión del sistema renina-angiotensina- aldosterona, produciendo una reducción de las concentraciones séricas de angiotensina II y aldosterona. La reducción de angiotensina II produce una disminución de la secreción de aldosterona, y, por ello, se pueden producir pequeños incrementos de potasio sérico, junto con pérdidas de sodio y fluidos.

Las reducciones de presión sanguínea son habitualmente máximas a los 60-90 minutos de la administración oral de una dosis única de captopril. La duración del efecto es dosis-dependiente. Los efectos de reducción de la presión sanguínea de captopril y de los diuréticos tiazídicos son aditivos.

Farmacocinética: El captopril se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal alcanzándose el pico de niveles plasmáticos aproximadamente en una hora. La absorción mínima es del 75% por término medio. La presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal reduce la absorción en un 30-40%: por tanto, captopril debe administrarse una hora antes de la ingesta.

Aproximadamente el 25-30% del fármaco circula unido a las proteínas plasmáticas. La vida media aparente de eliminación sanguínea es probablemente inferior a 3 horas.

Más del 95% de la dosis absorbida se elimina por orina; del 40 al 50% como fármaco inalterado y el resto como metabolitos (dímeros de captopril por formación de puentes disulfuro y captopril y cisteína conjugados mediante una unión disulfuro). La insuficiencia renal puede originar acumulación del fármaco. Los estudios en animales demuestran que no atraviesa la barrera hematoencefálica en cantidades significativas.

Toxicidad: No hubo evidencia de efectos carcinogénicos en estudios realizados en rata y ratón, de 2 años de duración, en los que se administraron dosis de 50 a 1.350 mg/kg/día de captopril. Los estudios de toxicidad crónica oral se realizaron en rata, ratón, perro y mono.

Los efectos tóxicos relevantes y relacionados con el fármaco incluyen: alteración de la hematopoyesis, toxicidad renal, erosión/ulceración gástrica y alteraciones de los vasos sanguíneos retinianos. En estudios realizados en rata y hámster preñados no se observaron efectos teratogénicos de captopril. Las dosis utilizadas fueron de hasta 150 veces en hámster y 625 veces en rata la máxima recomendada en humanos.

Indicaciones terapéuticas y plan de administración:

Debe emplearse en los casos de hipertensión moderada o grave resistente a otros medicamentos.

La dosis inicial es de 25 mg, 3 veces por día, antes de las comidas; al cabo de una o dos semanas se puede aumentar la dosis a 50mg, 3 veces por día, e incrementarlos con intervalos de una a dos semanas hasta conseguir el resultado deseado; el máximo es de 450mg diarios.

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar y validar un método analítico que permita determinar Hidroclorotiazida y Captopril como principios activos en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar las condiciones electroforéticas óptimas para la separación de hidroclorotiazida y captopril.
- Verificar que los cambios propuestos cumplan con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizada.
- Evaluar los parámetros estadísticos de desempeño: reproducibilidad, especificidad, adecuabilidad, precisión, exactitud y linealidad, tanto del sistema como del método.
- Concluir acerca del desempeño del método desarrollado utilizando los criterios de aceptación establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB`s.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES Y EQUIPO

Equipo

- ❖ Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MQD (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), equipado con un detector UV-VIS de arreglo de diodos. Un capilar de sílice fundida de longitud efectiva de 20 cm y 50 µm de diámetro interno. La detección se realizó a 214 nm.
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Agitador magnético
- ❖ pH-metro
- ❖ Sistema Agua Milli-Q Plus (Millipore, USA).

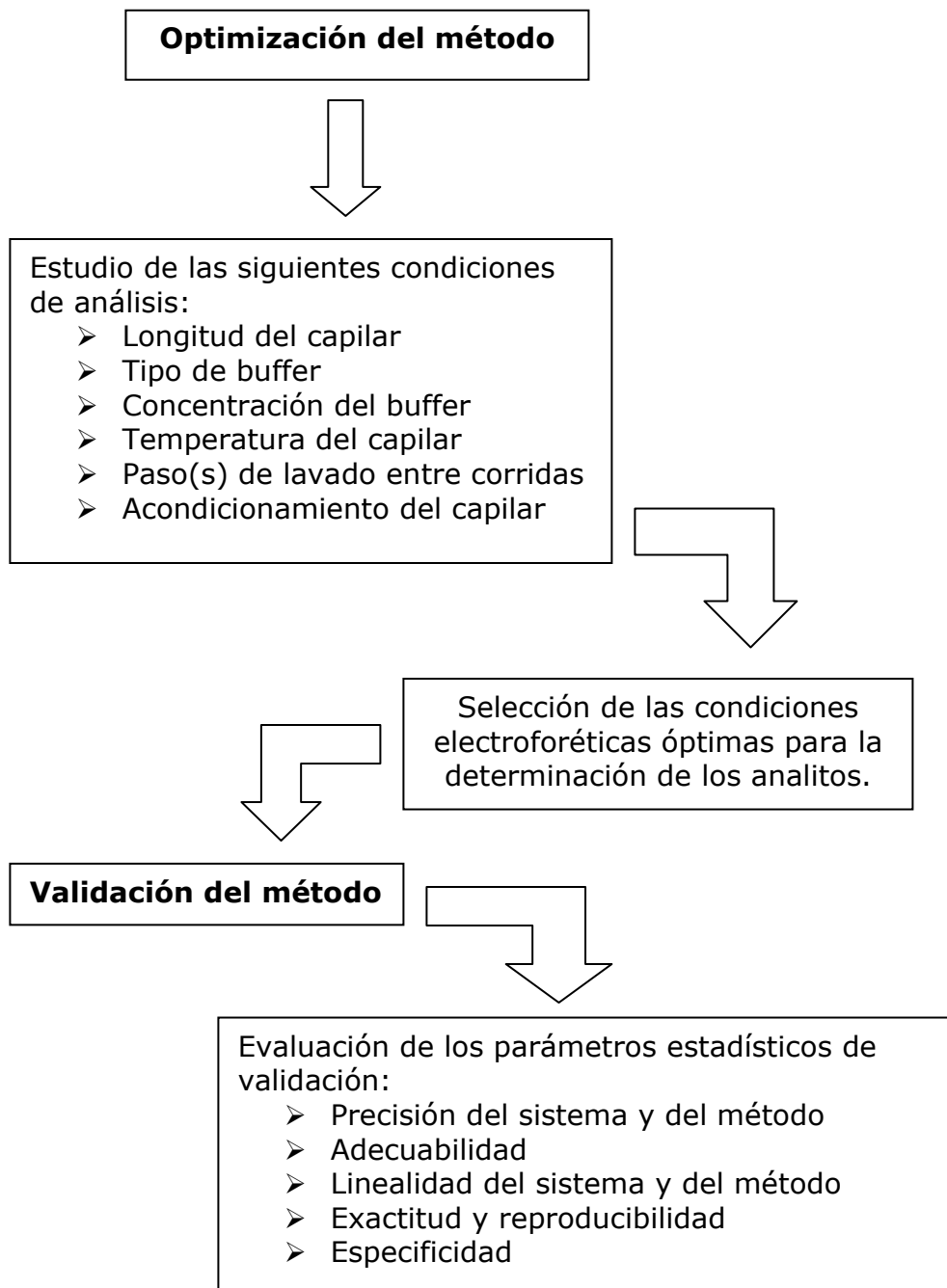
Materiales

- ❖ Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL
- ❖ 1 matraz volumétrico de 100 mL
- ❖ 1 matraz volumétrico de 50 mL
- ❖ 6 matraz volumétricos de 25 mL
- ❖ 2 matraz volumétricos de 10 mL
- ❖ 3 vasos de precipitados de 50 mL
- ❖ 2 pipetas volumétricas de 1 mL
- ❖ 5 pipetas volumétricas de los sig volúmenes: 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL y 10 mL.
- ❖ 1 espátula
- ❖ 1 piseta
- ❖ 1 mortero

4.2 REACTIVOS

- ❖ Ácido Bórico Granular, J.T. Baker
- ❖ Hidróxido de Sodio, J.T. Baker
- ❖ Metanol, Grado HPLC, J.T. Baker
- ❖ Ácido salicílico, Aldrich
- ❖ Estándares primarios de Captopril e Hidroclorotiazida
- ❖ Agua desionizada

4.3 PLAN DE TRABAJO



4.4 PROCEDIMIENTOS

4.4.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Preparación del buffer de boratos 50 mM pH=8.5, 100 mL.

Pesar la cantidad necesaria de Ácido Bórico reactivo analítico, para obtener una solución 50 mM. Disolver con aproximadamente 70 mL de agua y ajustar el pH a 8.5 con NaOH 0.1 M y finalmente aforar a 100 mL con agua destilada.

Preparación de los Estándares

Preparar 50 mL de una solución mezcla que contenga 500 ppm de Captopril y 250 ppm de HCT. Para la preparación de la HCT, solubilizar primero con metanol (3 mL) posteriormente agregar el agua. **Solución Estándar.**

Preparación de la Solución Problema

Pesar 3 o 5 tabletas de Capozide (o un medicamento equivalente), obtener el peso promedio, triturar y moler perfectamente.

Pesar lo equivalente en polvo de las tabletas a 50 mg de Captopril, disolver en agua, mezclar, filtrar y aforar a 100 mL (**Sol A**).

Preparación de la curva de calibración y de la muestra

Se preparan los siguientes sistemas (Tabla 2) a partir de las soluciones elaboradas.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración.

SISTEMAS	1	2	3	4	5	6	prob
<i>Sol. Estándar (mL)</i>	1	2	3	4	5	6	0
<i>Solución A (mL)</i>	0	0	0	0	0	0	4
<i>Aforo (mL)</i>	25	25	25	25	25	25	25

4.4.2 Obtención de los electroferogramas.

Colocar un capilar con las siguientes especificaciones: Capilar de sílice fundida de longitud de 20 cm de largo, 10 cm al detector, 50 μm diámetro.

Encender el equipo y la computadora.

Entrar al programa:

1. KARAT y al equipo MDQ1_DAD o bien,
2. PACE System MDQ, Instrument, según sea el caso.

Lavar el capilar: Abrir el archivo *Lavado.met*, e iniciar el proceso de lavado, el cual consiste en:

- Lavar con NaOH 0.1 M por 5 min. a 20 psi
- Lavar con agua desionizada por 5 min, a 20 psi.
- Equilibrar el capilar lavando con buffer de corrida (Boratos pH= 8.5) por 5 min.
- o bien, hacer el lavado directamente desde la ventana de control directo.

Medición de las soluciones

Abrir el archivo *Captopril.met* y corrobore que tiene la siguiente programación:

- Lavado con Buffer de corrida por 1 minuto a 20 psi
- Inyección de la muestra con presión por 0.5 seg a 0.5 psi
- Separación de la muestra por 1 minuto a 30 kV.
- Longitud de onda: 214 nm
- Temperatura del cartucho 25 °C

Se mide cada uno de los sistemas preparados, iniciando con el sistema 1 de la curva de calibración, hasta el término de todos los sistemas.

4.4.3 PLAN PARA LA VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA (PARÁMETROS ANALÍTICOS) [5]

A) ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

Propósito: Verificar que el sistema de medición opera con base a criterios preestablecidos para asegurar la confiabilidad del método analítico. Permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente independientemente de las condiciones ambientales.

Metodología

- Un analista debe inyectar por sextuplicado la solución de adecuabilidad y reportar la respuesta del analito (área total del pico para cada inyección). Se inyectó la concentración que representa el 100% de la muestra procesada para la medición, el sistema 3: 60 ppm Captopril y 30 ppm HCT.
- Calcular para la respuesta analítica, la media, desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV Tm) para los tiempos de migración y el coeficiente de variación para las áreas de los picos (CV total).

Criterio de aceptación

- El coeficiente de variación CV Tm para las 6 inyecciones no debe ser mayor del 2%.

B) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Propósito: Evaluar la capacidad del sistema para asegurar que los resultados obtenidos por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro del intervalo definido.

Metodología

- Un analista debe preparar por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia por diluciones o por pesadas independientes. La concentración central será la concentración que represente el 100% en la

muestra procesada para su medición. Los niveles de concentración serán 50, 75, 100, 125 y 150%.

- Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición.
- Reportar el área total del pico contra la concentración.
- Trazar las gráficas correspondientes. Incluir la ecuación, línea de ajuste y r^2 .
- Calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

Criterio de aceptación

- El coeficiente de determinación de la relación respuesta analítica contra concentración debe ser mayor o igual a 0,98.
- El intervalo de confianza para la pendiente, $IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero.

C) LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Propósito: Establecer la capacidad de la metodología de mantener su exactitud a diferentes cantidades adicionadas del analito y analizar si el método aplicado expresa la concordancia entre el valor obtenido y el valor conocido del analito en las muestras.

Metodología

- Determinar la recuperación de los principios activos , a tres niveles de concentración, 50%, 100% y 150%. Realizar el análisis por triplicado a cada nivel de concentración.
- Los diferentes niveles de concentración se preparan a partir de una solución stock del estándar de referencia y deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones.

- Con base en los resultados obtenidos en la linealidad del sistema reportar el porcentaje de recobro de cada muestra y la relación concentración adicionada de analito contra concentración recuperada de cada muestra.

-Reportar la relación cantidad adicionada contra cantidad recuperada. Trazar la gráfica cantidad adicionada (x) contra cantidad recuperada (y). Incluir la ecuación, línea de ajuste y el valor de r^2 . Utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados, calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($C/V_{y/x}$).

- Calcular el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración o muestra, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación

- Cantidad adicionada contra cantidad recuperada: El coeficiente de determinación, r_2 no debe ser menor de 0,98.
- El coeficiente de variación de la regresión $CV_{y/x}$ debe ser menor o igual al 2%.
- El ($IC(\beta_1)$) debe incluir a la unidad.
- El ($IC(\beta_0)$) debe incluir el cero.
- Del porcentaje de recobro: El promedio aritmético del porcentaje de recobro debe estar incluido en el intervalo 98-102%.
- El coeficiente de variación del porcentaje de recobro debe ser menor al 2%.

D) ESPECIFICIDAD

Propósito: Demostrar que mediante el método analítico empleado es posible valorar al analito en presencia de otros componente como, impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz.

Metodología

- La muestra debe someterse a condiciones que generen inestabilidad química (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación. El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito.
- Aplicar el método de análisis a la muestra resultante y a la muestra en condiciones naturales. Se analizará por triplicado una muestra del producto con una concentración correspondiente al 100%.
- Comparar los resultados de las muestras en condiciones naturales y las muestras sometida a degradación.

Criterio de aceptación

Los productos de degradación no deben interferir en la valoración de la muestra.

E) PRECISIÓN INTER-DÍA /ANALISTA

Propósito: Verificar el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos al analizar las mismas muestras por dos analistas en días diferentes.

Metodología

- Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y equipos.
- Documentar los resultados obtenidos por los 2 diferentes analistas, en los 2 días.
- Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).
- Calcular el coeficiente de variación intra-analista, para cada analista en los dos días y el coeficiente de variación total de los dos analistas.

Criterios de aceptación

El coeficiente de variación intra-analista y el coeficiente de variación total (CV) no deben exceder el 2%.

F) TOLERANCIA A EQUIPOS

Propósito: Verificar el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos al analizar, un analista las mismas muestras, en dos equipos diferentes.

Metodología

- Un analista debe preparar por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia por diluciones o por pesadas independientes. La concentración central será la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Los niveles de concentración serán 50, 75, 100, 125 y 150%. Utilizando los mismos reactivos para analizarla en diferentes equipos.
- Analizar los resultados obtenidos durante el análisis en cada equipo.
- Calcular y reportar, el promedio aritmético, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación total (CV) para las réplicas, realizadas en los dos equipos.

Criterios de aceptación

- El método debe cumplir con los criterios de adecuabilidad del sistema, conforme al procedimiento.
- El coeficiente de variación total para las réplicas realizadas en los dos equipos debe ser menor o igual al 2%.

G) LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Propósito: Demostrar que mediante el método empleado es posible determinar con precisión y exactitud aceptable, la concentración mínima del analito, bajo las condiciones de operación establecidas.

Metodología

- Con base en los resultados para la linealidad del sistema, calcular el límite de cuantificación con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión o bien de la desviación estándar de la ordenada al origen.
- Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) y la desviación estándar de regresión (Sy/x).
- Calcular el límite de cuantificación (LC) con la siguiente ecuación:

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

Donde: S es la desviación estándar de regresión.

b_1 , es la pendiente de la línea de calibración.

Criterios de aceptación

- El coeficiente de correlación r^2 , no debe ser menor de 0,98.
- El intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero.
- El límite de cuantificación debe ser menor a la especificación del contenido/valoración de la prueba de impurezas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

5.1.1 ELECTROLITO SOPORTE

Tipo de Buffer

Con el fin de conseguir un electrolito óptimo para obtener una adecuada forma y reproducibilidad de los picos, se llevo a cabo la variación de diferentes características del mismo, como son el pH y la concentración. Dado que el pH es el parámetro primordial en el desarrollo del método, la selección de su valor se realiza tomando en cuenta que debe ser aquel que permita tener a los compuestos ionizados en el análisis, con lo cual se favorezca su migración en el sistema.

Se utilizó como electrolito soporte ácido bórico 50 mM al que se modificó el pH con NaOH 1 M para obtener estudiar un rango de pH cercano a 8.5.

Boratos

Se preparó un buffer de Boratos 50mM a partir de ácido bórico ajustando el pH con NaOH 0.1 M a pH 8,0, 9 y 9,5. Para el análisis se aplicó 30kV en un capilar de 40cm de longitud total.

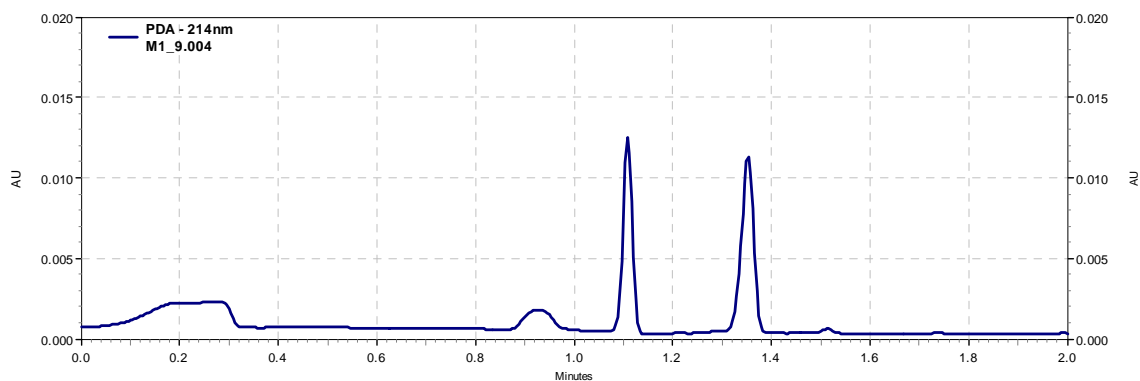
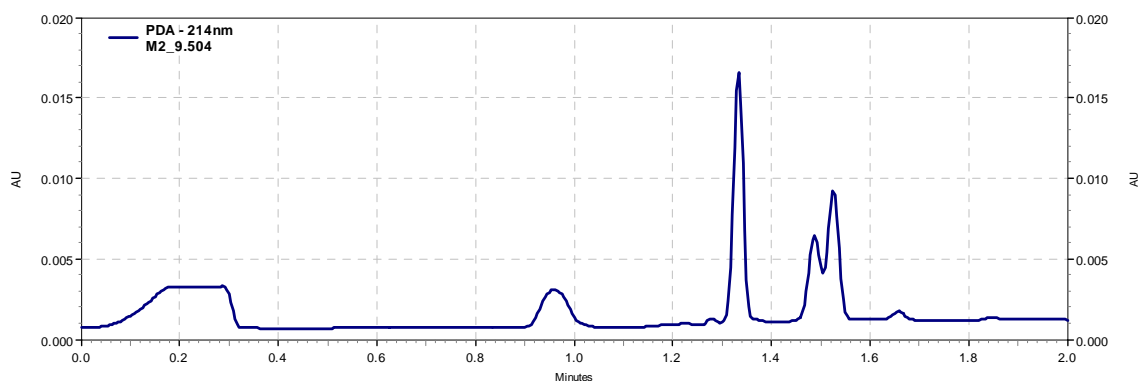


Figura 6. Buffer BO' 50mM a diferentes valores de pH.

En los electroferogramas (Figura 6) se observa que con el buffer pH de 9.5 el pico correspondiente al captopril no presenta una buena forma, si no que por el contrario, dicho pico se muestra dividido. El buffer pH 9.0 permite una buena separación de los picos ya que presentan una mejor forma y línea base, así que el mejor pH para el sistema tendría que ser de 8.0 a 9.0; con lo que se observa que mientras esté el pH en dicho intervalo, los picos en los electroferogramas muestran buena señal y forma.

5.1.2 Temperatura del capilar

Otro aspecto importante es la temperatura a la cual se realiza el análisis y por ello se estudia su efecto cuando ésta se varía; todos los análisis anteriores se realizaron a 25° C.

Un estudio previo a 20° C [6] demostró que dicha temperatura puede beneficiar el análisis porque retrasa la degradación del captopril, pero retarda el tiempo de análisis. Con 30 y 35°C la muestra migra con mayor velocidad pero aumenta la velocidad de degradación del captopril. Es importante destacar que en este caso, el modificar la temperatura no ayuda en resolución ni en la forma de los picos, solo afecta el tiempo de migración.

5.1.3 Longitud del capilar

Hay dos longitudes a tomar en cuenta, la longitud al detector (l_d) y la longitud total (L). Ambas son importantes para la separación y resolución de los picos. Las separaciones previas a esta tesis, se realizaron a 30 kV, con un capilar de longitud efectiva de 40 cm (Figura 7). No obstante durante el desarrollo de esta tesis, el capilar tuvo que cambiarse debido al surgimiento de algunos problemas y a fin de disminuir el tiempo de análisis se decidió usar uno más corto.

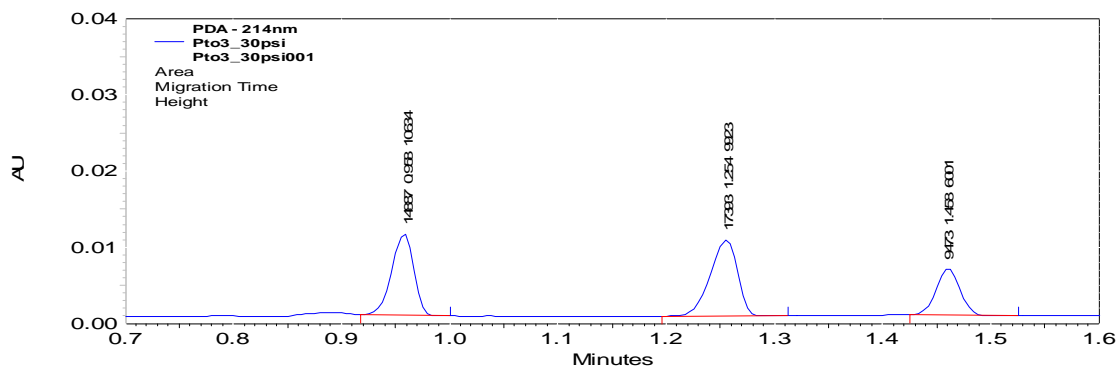


Figura 7. Separación obtenida con un capilar de 40 cm de longitud total.

El emplear un capilar de 30cm de longitud total, significó un tiempo de análisis más corto, sin comprometer la resolución entre picos (Figura 8). Por lo tanto, los ensayos siguientes se realizaron con un capilar de 20 cm de longitud efectiva, sin variar el diámetro interno del mismo.

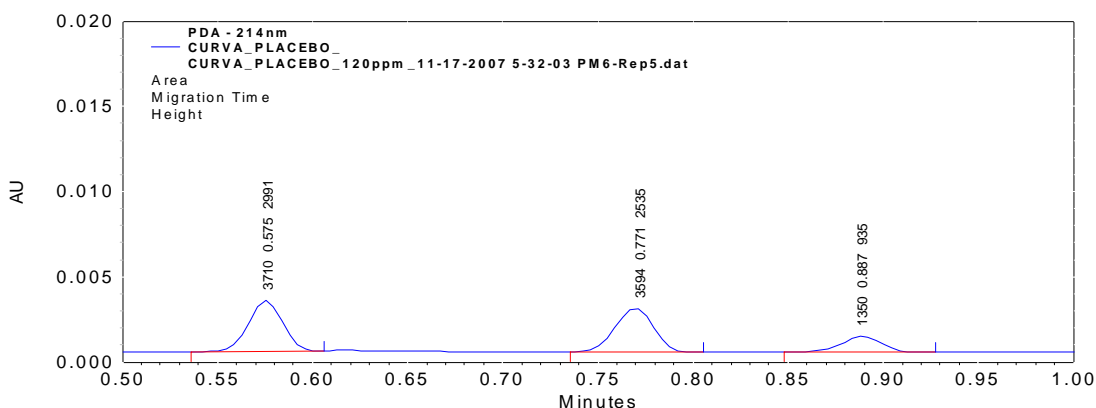


Figura 8. Separación obtenida con un capilar de 30 cm de longitud total.

5.1.4 Lavado entre corridas

Para seleccionar el tiempo de lavado adecuado, se realizaron una serie de lavados variando el tiempo y la presión, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos para distintas condiciones de lavado del capilar entre corridas.

TIPO DE LAVADO	AREA HCT	C.V. (%)	AREA CAPTO	C.V. (%)
Lavado a 30 psi x 1.0 min	14104	3.1	17384	1.28
Lavado a 20 psi x 1.5 min	13788	0.25	17345	0.34
Lavado a 20 psi x 2.0 min	13746	3.75	17270	3.28

Se realizaron inyecciones por quintuplicado, monitoreando tiempo de migración y áreas de los picos de interés. De estos datos se obtuvo el C.V. En la tabla 3, se observa que el lavado más óptimo corresponde al de 20 psi por 1.5 minutos, presentando el C.V. más bajo para los 2 picos, por lo cual fue seleccionado.

5.1.5 Acondicionamiento del Capilar

Lavado Rutinario del Capilar a 20psi y temperatura de 25° C.

- ❖ Lavar 5 minutos con agua desionizada
- ❖ Lavar 5 minutos con NaOH 0.1M
- ❖ Lavar 5 minutos con agua desionizada
- ❖ Lavar 5 minutos con el buffer de separación

Tomando como base la información presentada previamente se establecen como los siguientes parámetros como los óptimos:

- Temperatura de 25 ° C.
- Inyección de 5seg y una presión de 5psi.
- Aplicación de 30kV para la separación, en polaridad normal.
- Capilar: DI 50µm y l_d promedio de 19 cm.
- Buffer a partir de ácido bórico, 50mM a pH 8.5

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.2.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA:

La evaluación de la adecuabilidad del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales [17].

SISTEMA	HCT		CAPTOPRIL	
	Tm (MIN)	AREA	Tm (MIN)	AREA
1	0.583	2740	0.783	2395
2	0.579	2725	0.779	2451
3	0.579	2662	0.775	2359
4	0.579	2728	0.775	2390
5	0.579	2680	0.775	2361
6	0.579	2763	0.771	2426
PROMEDIO	0.5797	2716.33	0.7763	2397
Desv. Est.	0.002	38.00	0.004	36.19
C.V. (%)	0.28	1.40	0.53	1.51
CRITERIO	El C.V. No debe ser mayor de 2%			
RESULTADO	CUMPLE		CUMPLE	

*Resultados de 6 inyecciones del sistema 6, estándar de referencia.

*Tabla 4. Resultados de Adecuabilidad para el Sistema**

Los resultados de la Tabla 4, permiten verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente lo que asegura una buena operación del sistema y por lo tanto el desarrollo de la validación de una manera más óptima.

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, la resolución, R, se determina por la siguiente fórmula:

$$R = \left(\frac{Tm_2 - Tm_1}{0.5(W_1 + W_2)} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

El factor de resolución (R) es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema [18].

Una medida de la eficiencia se puede conocer calculando el número de platos teóricos (N) con la siguiente formula:

$$N = 16 \left(\frac{Tm}{W} \right)^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

T_m = Tiempo de migración de la sustancia.

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades de tiempo que T_m .

El valor de N es dependiente de la sustancia que esta siendo analizada y de las condiciones de operación.

La resolución entre los picos de HCT y CAP, y los números de platos teóricos se reportan en la tabla 5.

***Tabla 5.** Resolución y número de platos teóricos para la prueba de adecuabilidad del sistema 6 estándar de referencia.*

Parámetro	HCT	CAP
N	2150.5	2678.7
R	3.58	

Se aprecia que los picos tienen una muy buena resolución entre ellos indicando una excelente separación en la mezcla y el número de platos teóricos nos indica que existe una buena eficiencia en el proceso de separación [19].

5.2.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se realizó una curva de calibración considerando un intervalo de concentraciones entre 33% y 200% en relación a la cantidad de analito en las formulaciones farmacéuticas. Se preparó una curva de calibración de 6 niveles de concentración, en un rango de 10 – 60 ppm para la **HCT** y de 20 – 120 ppm para el **CAPTO** empleando estándar de referencia. Se prepararon por triplicado a partir de una solución concentrada. Los resultados respecto a la HCT se muestran en la tabla 6.

Como se aprecia en la Tabla 6, los tiempos de migración de la HCT son constantes, lo que indica que las áreas obtenidas del estándar son debidas únicamente a la concentración de los analitos de interés. En algunas metodologías analíticas se maneja que la variación en los tiempos de migración no deben de exceder 0.1 min entre ellos para que se considere valido y correspondiente al analito de interés [20,21].

Tabla 6. Resultados de las áreas en función de la concentración para la HCT.

		HCT	
NIVEL (%)	Conc (ppm)	Área	Tm
33.33	20	1521	0.567
		1478	0.567
		1467	0.567
66.67	40	2775	0.563
		2553	0.563
		2622	0.558
100	60	3614	0.563
		3526	0.563
		3641	0.558
133.33	80	4901	0.563

		5024	0.563
		5095	0.563
166.67	100	6207	0.588
		5975	0.588
		5787	0.588
200	120	7432	0.575
		7442	0.588
		6995	0.571
		PROMEDIO	0.5698
		Desv. Est.	0.011
		C.V. (%)	1.89

Al graficar el área en función de la concentración del analito, se aprecia un comportamiento lineal (Fig 9).

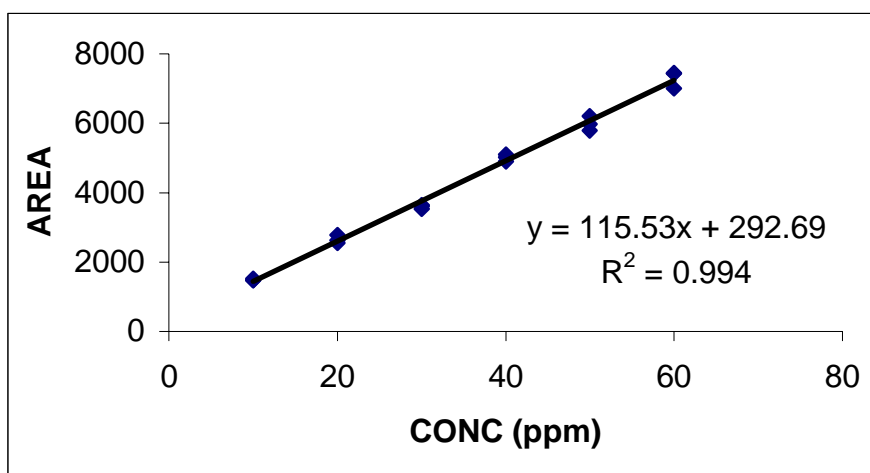


Figura 9. Curva de calibración correspondiente a HCT en un intervalo de concentraciones de 20 a 120 ppm

La linealidad del sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado [16]. Se evalúa en base al coeficiente de determinación (R^2), pendiente (m) e intercepto (b), los cuales se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros estadísticos

ESTADÍSTICO		RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CUMPLE
Pendiente	(b_1)	115.53	No aplica	No aplica

<i>Ordenada al origen</i>	<i>(b0)</i>	292.69	No aplica	No aplica
<i>Coefficiente de determinación</i>	<i>(r²)</i>	0.99	r ² ≥ 0,98	Cumple
<i>Intervalo de confianza para la pendiente (ICB₁)</i>	<i>Límite inferior de confianza ICB₁</i>	110.77	No debe incluir el cero	Cumple
	<i>Límite superior de confianza ICB₁</i>	120.29		

Una forma adicional de demostrar que la respuesta es debida a la concentración del analito, es a través de un análisis de varianza (Tabla 8)

Tabla 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA HCT

	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>VALOR CRÍTICO DE F</i>
REGRESIÓN	1	70077898.67	70077898.67	2648.14	3.33E-19
RESIDUOS	16	423409.61	26463.10		
TOTAL	17	70501308.28			

En la tabla 8 aparecen los resultados obtenidos del análisis de varianza realizado para determinar si la concentración y la respuesta se encuentran relacionadas linealmente (H_A). Se observa que la F calculada es mayor que la F crítica, lo cual indica que estadísticamente si existe una relación lineal entre las dos variables [2].

Hipótesis:

H_0 = X y Y no están relacionadas linealmente.

H_A = X y Y están relacionadas linealmente.

Los resultados más importantes en la linealidad del sistema son el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente, así que

analizándolos se deduce que el sistema es lineal, pues el valor del coeficiente de determinación es mayor a 0.98, dicho valor indica el porcentaje de la variación de la concentración con respecto al área, es decir nos indica la intensidad de la variación entre estas dos variables. El resultado del intervalo de confianza no incluye al cero lo que nos indica que los resultados de evaluación obtenidos para la linealidad, cumplen con lo especificado dentro de la guía de validación de el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. [26].

Los resultados respecto al CAPTOPRIL se muestran en la tabla 9.

Como se observa, en la tabla 9, los tiempos de migración del CAPTOPRIL son constantes, lo que indica que las áreas obtenidas del estándar son debidas únicamente a la concentración de los analitos de interés.

Tabla 9. *Resultados relacionados con la curva de calibración para el CAPTOPRIL.*

CAPTOPRIL			
NIVEL (%)	Conc (ppm)	ÁREA	Tm
33.33	10	1003	0.742
		973	0.742
		999	0.742
66.67	20	2083	0.742
		2018	0.738
		2003	0.738
100	30	2972	0.742
		2919	0.742
		2936	0.738
133.33	40	4137	0.742
		4273	0.742
		4229	0.742
166.67	50	5676	0.742
		5556	0.742
		5273	0.742
200	60	7002	0.779
		7163	0.779
		6610	0.762
PROMEDIO			0.746
Desv. Est.			0.013
C.V. (%)			1.72

Al graficar el área en función de la concentración del analito, se aprecia un comportamiento lineal (Fig 10).

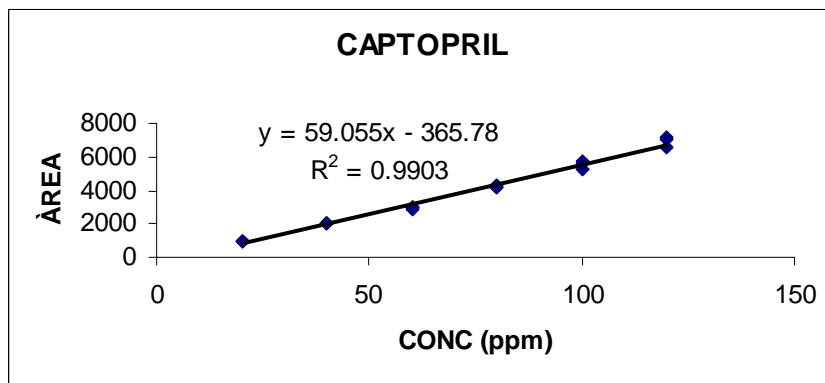


Figura 10. Curva de calibración correspondiente al CAPTOPRIL.

Para la relación concentración CAPTOPRIL contra respuesta analítica se calcularon los datos visualizados en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados Estadísticos para CAPTOPRIL

ESTADÍGRAFO		RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CUMPLE
<i>Pendiente</i>	<i>(b1)</i>	59.05	No aplica	No aplica
<i>Ordenada al origen</i>	<i>(b0)</i>	-365.78	No aplica	No aplica
<i>Coefficiente de determinación</i>	<i>(r²)</i>	0.99	$r^2 \geq 0,98$	Cumple
<i>Intervalo de confianza para la pendiente (ICB1)</i>	<i>Límite inferior de confianza ICB1</i>	55.95	No debe incluir el cero	Cumple
	<i>Límite superior de confianza ICB1</i>	62.16		

Tabla 11. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CAPTOPRIL

	G.L.	S.C.	C.M.	F	VALOR CRÍTICO DE F
REGRESIÓN	1	73236763	73236763	1629.013	1.58E-17
RESIDUOS	16	719324	44957.75		
TOTAL	17	73956087			

En los resultados mostrados en la tabla 11, se observa que la F calculada es mayor que la F crítica, lo cual indica que estadísticamente si existe una relación lineal entre las dos variables.

Hipótesis:

H_0 = X y Y no están relacionadas linealmente.

H_A = X y Y están relacionadas linealmente.

Los resultados demuestran que el sistema es lineal, pues el valor del coeficiente de determinación es mayor a 0.98, además el resultado del intervalo de confianza no incluye al cero lo que nos indica que los resultados de evaluación obtenidos, cumplen con lo especificado dentro de la guía de validación de El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. [16].

5.2.3 ESPECIFICIDAD

Se analizaron muestras preparadas a partir de una disolución de placebo cargado, los resultados obtenidos del análisis de la muestra placebo, la solución de referencia y las diversas muestras de formulaciones farmacéuticas indican que los excipientes no interfieren en la determinación de los principios activos, con estos resultados se demuestra la especificidad del método en el sentido de que no se observó ninguna señal del placebo al someterlo a las mismas condiciones de análisis que los principios activos [Fig. 11].

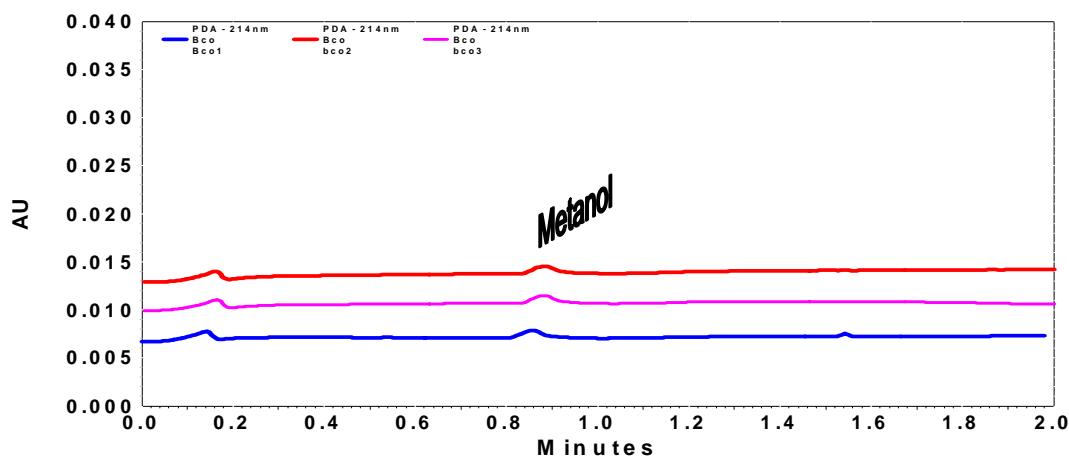


Figura 11. Electroferograma de placebos.

5.2.4 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Para evaluar la exactitud y repetibilidad del método (tabla 12) se preparó un placebo analítico con los componentes incluidos en la formulación. A la cantidad de placebo analítico se le adiciono la cantidad de analito correspondiente al 66%, 100 y 133%, teniendo concentraciones de 20 - 40 ppm para HCT y 40 - 80 ppm para CAPTOPRIL, por sextuplicado, en un día y el mismo analista, bajo las condiciones normales de operación.

Tabla 12. Resultados del % de recuperación de HCT a partir de placebos cargados.

		HCT	
Nivel (%)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	% recuperado
66.66	20	20.37	101.86
		20.03	100.13
		20.48	102.4
		20.37	101.86
		20.39	101.95
		20.46	102.31
100	30	29.49	98.29
		29.52	98.41
		29.45	98.17
		29.6	98.65
		29.54	98.47
		29.61	98.71
133.33	40	41.01	102.6
		41.02	102.55
		41.02	102.55
		40.93	102.32
		41.02	102.55
		41.09	102.73
		Promedio	100.92
		Desv est	1.89
		CV (%)	1.87
		IC(μ)	98.46 - 100.95

En la tabla 12 se observa que el promedio aritmético del porcentaje de recobro para HCT se encuentra dentro del intervalo establecido; así mismo el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor al 2% y el

intervalo de confianza del porcentaje incluye el 100%.

Tabla 13.- Resultados del % de recuperación de CAPTOPRIL a partir de placebos cargados.

		CAPTOPRIL	
Nivel (%)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	% recuperado
66.66	40	40.54	101.34
		40.54	101.34
		40.75	101.88
		40.00	100.01
		40.57	101.43
		40.50	101.26
100	60	58.91	98.19
		59.23	98.72
		59.73	99.55
		58.81	98.01
		59.30	98.84
		58.74	97.89
133.33	80	80.06	100.08
		80.77	100.97
		78.64	98.30
		80.24	100.30
		81.52	101.90
		81.38	101.72
		Promedio	100.10
		Desv est	1.45
		CV	1.45
		IC(μ)	98.46 – 100.95

En el caso del CAPTOPRIL, en la tabla 13 se observa que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo establecido y el coeficiente de variación del porcentaje es menor al 2%. El intervalo de confianza del porcentaje de recobro incluye el 100%.

Con los resultados obtenidos, se determinó que el método cumple con los criterios establecidos en la guía de validación [16] por lo que es exacto.

5.2.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Si un químico analítico desarrolla un método nuevo para la determinación de un analito concreto, el método debe ser validado (entre otras pruebas) aplicándolo a un número de muestras que contengan una concentración ya conocida [22]. El interés principal al realizar una comparación entre la cantidad conocida y la recuperada por el método analítico será la identificación de errores sistemáticos, es decir, conocer si el método analítico proporciona resultados significativamente más altos o más bajos que la cantidad conocida. Queda claro que si cada resultado obtenido del método conduce a un resultado idéntico a la cantidad de analito conocida, la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen 0, y una pendiente y un coeficiente de correlación de 1. En la práctica, por supuesto, esto nunca ocurre: incluso estando completamente ausentes los errores sistemáticos, los errores aleatorios aseguran que los resultados del método analítico no darán resultados en exacta concordancia para todas las muestras. [24]

La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de la concentración de placebos cargados en un rango de concentración de 10-60 ppm para HCT y de 20-120 ppm para CAPTOPRIL, preparados por triplicado, en un día y un analista. En la tabla 14 se indican los resultados obtenidos.

En la tabla 14 se observa que el coeficiente de variación del promedio aritmético del porcentaje de recobro es menor al 2 %. Por lo que cumple con este parámetro.

Una vez calculada la cantidad recuperada se construyó un gráfico, para determinar la linealidad de los datos, los resultados obtenidos se muestran en la figura 12.

Tabla 14. Resultados del % recuperado de HCT a partir de placebos cargados.

		HCT			
Nivel (%)	Tiempo(min)	Área	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	% RECOBRO
33	0.563	978	10	10.15	101.47
	0.563	962	10	10.01	100.10
	0.563	964	10	10.03	100.27
66	0.563	2143	20	20.08	100.38
	0.563	2171	20	20.31	101.57
	0.567	2168	20	20.29	101.44
100	0.583	3292	30	29.87	99.56
	0.575	3287	30	29.82	99.42
	0.567	3273	30	29.71	99.02
133	0.567	4489	40	40.07	100.17
	0.567	4404	40	39.34	98.36
	0.567	4422	40	39.50	98.74
166	0.558	5570	50	49.28	98.56
	0.554	5575	50	49.32	98.65
	0.554	5542	50	49.04	98.08
200	0.554	6972	60	61.23	102.05
	0.558	6961	60	61.14	101.89
	0.554	6965	60	61.17	101.95
Promedio	0.56				100.09
Desvest	0.01				1.33
CV (%)	1.32				1.33

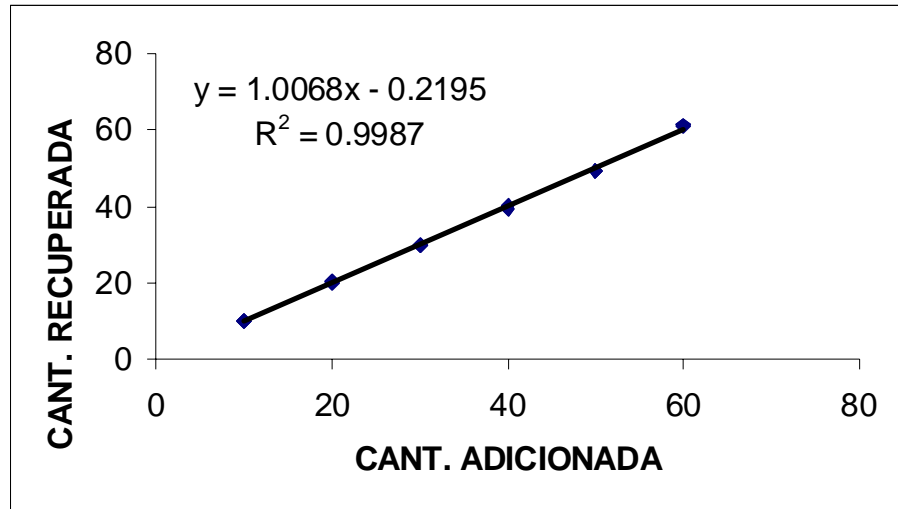


Figura 12. Cantidad adicionada vs. la cantidad recuperada de HCT a partir de la preparación de placebos cargados.

Considerando la concentración medida como variable y , y la concentración adicionada como la variable x , se debe calcular la pendiente y el intercepto de la línea de regresión.

En una situación ideal donde se obtienen exactamente los mismos resultados, la pendiente de la regresión debe ser de 1 y el intercepto debe ser 0. Sin embargo esto nunca ocurre en la práctica, aun si los errores sistemáticos están ausentes, la presencia de errores aleatorios conduce a tener una dispersión de los puntos alrededor de la línea del cuadrado medio y pequeñas desviaciones de la estimación de la pendiente y el intercepto 1 y 0, respectivamente [9].

Una pendiente calculada que es significativamente diferente de 1 indica la presencia de un error sistemático proporcional. Un intercepto calculado que es significativamente diferente de 0 revela la presencia de un error sistemático constante [9]. En la figura 6 se observa que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, cumpliendo así con lo establecido en la guía de Validación [16].

Para determinar la linealidad de los datos, se realizó un análisis de varianza al 95 % de confianza en el cual se observa que el valor de F calculada es mayor

que el valor crítico de F , por lo que los datos se ajustan a un modelo lineal, los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Análisis de varianza para HCT ($\alpha = 0.05$).

	G.L.	S.C.	C.M.	F	VALOR CRÍTICO DE F
REGRESIÓN	1	5321.92	5321.92	12448.35	1.45E-24
RESIDUOS	16	6.84	0.43		
TOTAL	17	5328.76			

Tabla 16. Parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal para HCT

ESTADÍGRAFO		RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CUMPLE
Pendiente	(b1)	1.01	No aplica	No aplica
Ordenada al origen	(b0)	-0.22	No aplica	No aplica
Coeficiente de determinación	(r^2)	0.9987	$r^2 \geq 0,98$	Cumple
Intervalo de confianza para la pendiente (ICB1)	Límite inferior de confianza LICB	0.9877	Debe incluir la unidad	Cumple
	Límite superior de confianza LSCB	1.0260		
Intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICB0)	Límite inferior de confianza LICB	-0.9645	Debe incluir el cero	Cumple
	Límite superior de confianza LSCB	0.5255		
C.V. regresión	$CV_{y/x}$	1.87	$CV_{y/x} \leq 2\%$	Cumple

Tabla 17. Parámetros estadísticos obtenidos para el porcentaje de recobro para HCT

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO	CRITERIO DE	CUMPLE
---	--------------------	---------------

			ACEPTACIÓN	
Promedio del % Recobro	(y)	100.09	Incluido en el intervalo 98 - 102 %	Cumple
Desviación estándar	(S)	1.37	No aplica	No aplica
Coefficiente de variación	(CV)	1.36	CV ≤ 2%	Cumple
t(0,975,n-1)		2.11	No aplica	No aplica
Intervalo de confianza para la media poblacional, IC(μ), del porcentaje de recobro	Límite inferior de confianza LIC(μ)	99.41	Debe incluir el 100%	Cumple
	Límite superior de confianza LSC(μ)	100.77		

En la tabla 16 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal en donde se determinó el intervalo de confianza del porcentaje de recobro incluyendo el 100% para el caso de HCT observándose que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluye dentro del intervalo del 98 al 102% (Tabla 17). El intervalo de confianza de la pendiente incluye la unidad, y el de la ordenada al origen incluye el cero.

Tabla 18. Resultados del porcentaje recuperado de CAPTOPRIL a partir de placebos cargados.

CAPTOPRIL					
Nivel (%)	Tiempo (min)	Área	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	% RECOBRO
20	0.704	1186	20	20.20	101.01
	0.704	1198	20	20.32	101.62
	0.704	1126	20	19.60	98.01
40	0.704	3120	40	39.60	99.00
	0.725	3160	40	40.00	100.00
	0.708	3104	40	39.44	98.60
60	0.708	5062	60	59.08	98.46
	0.708	5185	60	60.31	100.52
	0.713	5071	60	59.17	98.61
80	0.717	7219	80	80.71	100.89
	0.721	7206	80	80.58	100.72
	0.717	7065	80	79.17	98.96
100	0.713	8981	100	98.38	98.38
	0.713	8984	100	98.41	98.41
	0.708	9248	100	101.06	101.06
120	0.717	11392	120	122.56	102.14
	0.725	11320	120	121.84	101.53
	0.725	11006	120	118.69	98.91
Promedio	0.71				99.82
Desvest	0.01				1.32
CV	1.03				1.32

En la tabla 18 se observa que el coeficiente de variación del promedio aritmético del porcentaje de recobro es menor al 2 %. Por lo que inicialmente cumple con este parámetro.

Una vez calculada la cantidad recuperada se construyó un gráfico (Fig 13), para determinar la linealidad de los datos. En el gráfico se muestra la ecuación de la recta en la cual se determino el valor de r^2 , el cual es mayor a 0.98.

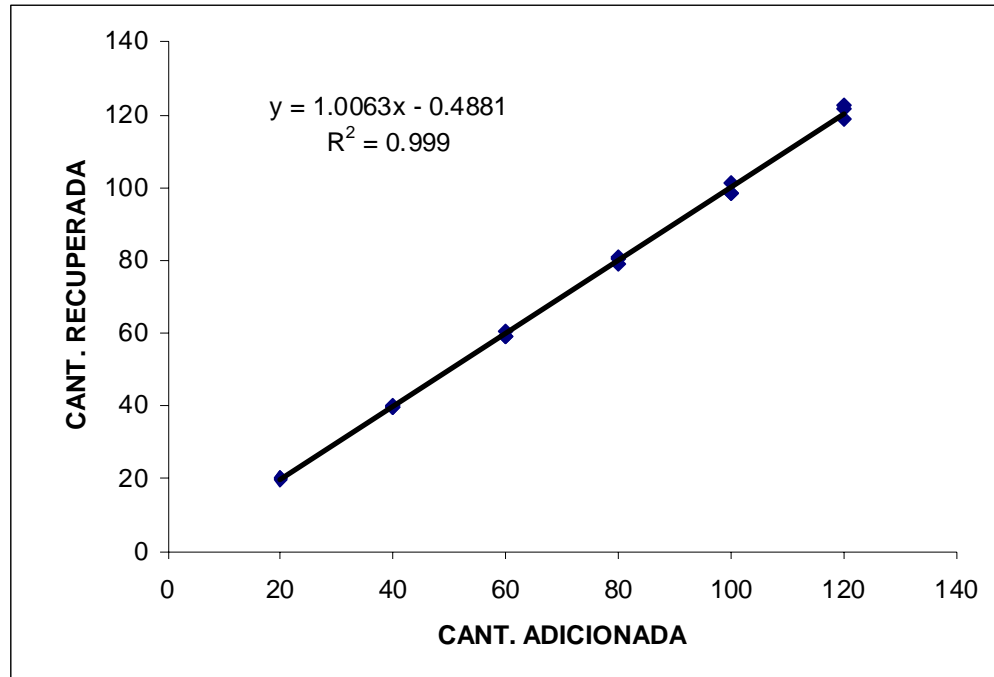


Figura 13. Cantidad adicionada vs. la cantidad recuperada de CAPTOPRIL a partir de la preparación de placebos cargados.

Para evaluar si los datos se ajustan a un modelo lineal, se realizó un análisis de varianza, en el cual se observa en la tabla 19, que el valor de F calculada es mucho mayor que el valor crítico de F; por lo cual se determinó que los datos se ajustan a un modelo lineal, a un 95% de confianza.

Tabla 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA HCT ($\alpha = 0.05$)

	G.L.	S.C.	C.M.	F	VALOR CRÍTICO DE F
REGRESIÓN	1	21264.46	21264.46	16186.16	1.78E-25
RESIDUOS	16	21.02	1.31		
TOTAL	17	21285.48			

Tabla 20. Parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal para CAPTOPRIL

ESTADÍSTICO		RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CUMPLE
Pendiente	(b1)	1.01	No aplica	No aplica
Ordenada al origen	(b0)	-0.49	No aplica	No aplica
Coefficiente de determinación	(r ²)	0.9990	r ² ≥ 0,98	Cumple
Intervalo de confianza para la pendiente (ICB1)	Límite inferior de confianza LICB	0.9896	Debe incluir la unidad	Cumple
	Límite superior de confianza LSCB	1.0230		
Intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICB0)	Límite inferior de confianza LICB	-1.7940	Debe incluir el cero	Cumple
	Límite superior de confianza LSCB	0.8179		
C.V. regresión	CV _{y/x}	1.64	CV _{y/x} ≤ 2%	Cumple

Tabla 21. Resultados del porcentaje de recobro para Captopril

RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CUMPLE
Promedio del % Recobro	(y)	99.82	Incluido entre 98 - 102 % Cumple
Desviación estándar	(S)	1.36	No aplica No aplica
Coefficiente de variación	(CV)	1.36	CV ≤ 2% Cumple
t(0,975,n-1)		2.11	No aplica No aplica
Intervalo de confianza para la media poblacional, IC(m), del porcentaje de recobro	Límite inferior de confianza LIC(m)	99.15	Debe incluir el 100% Cumple
	Límite superior de confianza LSC(m)	100.50	

En la tabla 20 y 21 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal en donde se determinó el intervalo de confianza del porcentaje de recobro incluyendo el 100% para el caso de CAPTOPRIL observándose que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluye dentro del intervalo del 98 al 102%.

El intervalo de confianza de la pendiente incluye la unidad, y el de la ordenada al origen incluye el cero.

Al realizar el análisis de datos, se determinó que el método cumple con los parámetros de linealidad establecidos en la guía de validación [16].

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones óptimas de análisis para la determinación de hidroclorotiazida (HCT) y captopril (CAP) en mezcla por la técnica de electroforesis capilar.
- Las condiciones óptimas son: buffer de ácido bórico 50 mM pH 8.5, inyección de la muestra por 5.0 seg a 0.5 psi de presión, tiempo de separación: 1 minuto a 30kV, detección a 214 nm, temperatura 25°C.
- Bajo las condiciones óptimas de separación, se evaluaron los parámetros estadísticos de desempeño del método a fin de establecer la confiabilidad del mismo.
- El método optimizado que se sometió a validación, resultó adecuado para la determinación de HCT y CAP en formulaciones farmacéuticas, tabletas, demostrando que cumple con los parámetros de desempeño estudiados y por lo tanto la confiabilidad del mismo.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- [1] Lineamientos Básicos para la Validación de los Métodos Analíticos de uso Farmacéutico. Pérez de la Cruz Leticia. Tesis Licenciatura Facultad de Química UNAM, México, 2006
- [2] Ohannesian, L.; Streeter, A.J. Handbook of pharmaceutical analysis. Editorial Marcel Dekker, USA, 202. Vol. 117.
- [3] Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar Piroxicam en una forma farmacéutica de uso tópico (Barra). Cruz Martínez Alejandro. Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México 2001.
- [4] Ross, G. A. Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation. General paper. Accred Qual Assur (1997) 2:275-284.
- [5] Manual de procedimientos LEI : MP 7.6 . Validación de Métodos Analíticos. Diciembre 2004.
- [6] Desarrollo de un método analítico por electroforesis capilar para la separación y cuantificación de hidroclorotiazida y captopril contenidos en un producto farmacéutico. Martha Alejandra Moreno Tapia. Servicio Social - Titulación (Q.), UNAM FESC, 2008.
- [7] Fundamentos de electroforesis capilar. Castillo Rodríguez Miriam. Tesis Licenciatura Q.F.B. FESC-UNAM, México, 2000.
- [8] Adamouics, J. A. Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Chromatographic science series. 2a Edición. Editorial Marcel Dekker, USA, 1997. Vol. 74.
- [9] Fabre, H.; Altria, K. D. Validating CE Methods for Pharmaceutical Analysis. Beckman Coulter.
- [10] US-FDA. International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology; Availability. DHHS, Federal Register Vol. 60, March 1, 1995, p. 11260

- [11] Commission of the European Communities. Analytical Validation (July 1989). Guidelines on the Quality, Safety and Efficacy of Medicinal Products for Human Use, The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, Volume III (addendum July 1990)
- [12] USP. Validation of Compendial Methods <1225>, General Information, The United States Pharmacopeia 23, 2005
- [13] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, octava edición, México, 2004.
- [14] The United States Pharmacopeia (USP), Ed. XXIV, 2000.
- [15] International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: ISO 5725-1, ISO 5725-2, ISO 5725-3, ISO 5725-4, ISO 5725-6, Ginebra, 1994
- [16] Guía de validación de métodos analíticos Alcántara Pineda Alejandro, García Ma. Araceli, et al. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México, 2002
- [17] Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de albendazol, en una presentación farmacéutica. Medina Morales Sandra Rocío Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, 2006.
- [18] Análisis Químico Cuantitativo. 2a Edición, Daniel C. Harris. Editorial Reverté S.A. España, 2001.
- [19] Willard H. H, Merritt, L.L., Dean, J.A. y Frank A. Settle, Métodos instrumentales de análisis, Compañía editorial continental S.A. de C.V. México, 1990.
- [20] Especificaciones y pruebas de rutina. Edición 1 - Enero, 1999. proporcionados por Schering Plough, S.A. de C.V.
- [21] Procedimientos E1.2 Métodos de control del producto terminado. Edición 1 - Enero 1999. proporcionados por Schering Plough, S.A. de C.V.
- [22] US-FDA. Validation of Analytical Procedimientos: Methodology. Extension of: Text on Validation of Analytical Procedimientos, Department of Health and Human Services, FDA, Vol. 61, No. 46, Docket No. 96D-0030, 1996

- [23] Canada, Drugs Directorate Guidelines. Acceptable Methods. Health Protection Branch, Health Canada, 1994
- [24] Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. Validación de los procedimientos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos. Serie de Informes Técnicos No 823 anexo 5, OMS Ginebra, 1992.
- [25] USP. Validation of Compendial Methods <1225>, General Information, The United States Pharmacopeia 23, 1995