



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

REVISIÓN BIBLIO-HEMEROGRÁFICA-ELECTRÓNICA DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAPTOPRIL EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS Y
MUESTRAS SANGUÍNEAS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA
Y ELECTROFORESIS CAPILAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

GABRIELA LÓPEZ DURÁN

ASESORES:

DRA. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR

M. EN C. VÍCTOR HUGO ABREGO REYES



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.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 General.....	12
2.2 Particulares	12
3. METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN	13
4. ANTECEDENTES.....	15
4.1 Hipertensión	15
4.2 Generalidades de los fármacos antihipertensivos.....	20
4.3 Captopril.....	28
4.4 Generalidades del Análisis Químico.....	30
5. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	34
5.1 Generalidades de Electroforesis Capilar.....	35
6. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA.....	44
6.1 Generalidades de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia.....	48
7. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICAR EL CAPTOPRIL EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS.....	55
7.1 Procedimiento según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.....	55
7.2 Procedimiento según la Farmacopea de Estados Unidos.....	56
7.3 Procedimientos no oficiales.....	57
8. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICAR EL CAPTOPRIL EN MUESTRAS SANGUÍNEAS	67

8.1 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia.....	67
8.2 Cuantificación por Electroforesis Capilar.....	75
9. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES BÁSICAS PARA LAS TÉCNICAS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA Y ELECTROFORESIS CAPILAR	77
10. CONCLUSIONES.....	86
11. REFERENCIAS	87

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. GRADOS DE HAS EN FUNCIÓN DE VALORES TENSIONALES EN MAYORES DE 18 AÑOS.	19
TABLA 2. POSIBLES TEORÍAS QUE EXPLICAN EL ORIGEN DE LA HAS PRIMARIA.	19
TABLA 3. CAUSAS MÁS FRECUENTES DE HAS SECUNDARIA.	20
TABLA 4. CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS EN FUNCIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN	21
TABLA 5. CLASIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES DE ECA EN FUNCIÓN DEL LIGANDO QUE SE UNE A Zn^{2+}	26
TABLA 6. PROPIEDADES FÍSICAS QUE PUEDEN UTILIZARSE COMO SEÑALES ANALÍTICAS EN EL ANÁLISIS CUALITATIVO O CUANTITATIVO.	31
TABLA 7. SISTEMAS DE DETECCIÓN EN EC Y RANGOS DE LÍMITES DE DETECCIÓN ALCANZADOS.....	38
TABLA 8. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA Y CONDICIONES DE FASE MÓVIL Y FASE ESTACIONARIA.....	45
TABLA 9. DETECTORES PARA HPLC.	51
TABLA 10. COMPOSICIÓN DEL PLACEBO DE TABLETA PARA ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DEL CAPTOPRIL	58
TABLA 11. NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LAS TRES VARIABLES PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL ESTUDIO	59
TABLA 12. COMPARACIÓN DEL MÉTODO CON EL REPORTADO POR LA USP PARA LA CUANTIFICACIÓN EN PRODUCTOS COMERCIALES	60
TABLA 13. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA PARA LA CUANTIFICACIÓN POR EC.	62
TABLA 14. RESULTADOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL CAPTOPRIL	64
TABLA 15. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	65
TABLA 16. MÉTODOS ALTERNOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CAPTOPRIL POR EC.....	66
TABLA 17. COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CAPTOPRIL EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS POR HPLC	79
TABLA 18. DETERMINACIÓN DEL CAPTOPRIL POR EC (MÉTODOS DESARROLLADOS EN LA FES CUAUTITLÁN).....	80
TABLA 19. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CAPTOPRIL EN MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HPLC.	83
CONTINUACIÓN DE LA TABLA 19. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CAPTOPRIL EN MUESTRAS SANGUÍNEAS POR HPLC.....	84

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN UNA ARTERIA	15
FIGURA 2. SISTEMAS QUE REGULAN LA PRESIÓN ARTERIAL EN EL ORGANISMO	16
FIGURA 3. ESQUEMA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	17
FIGURA 4. PRINCIPALES PUNTOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS.	22
FIGURA 5. MECANISMO DE ACCIÓN ANTIHIPERTENSIVO DE LOS INHIBIDORES DE ECA	25
FIGURA 6. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E INHIBIDORES DE ECA.....	27
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CAPTOPRIL	28
FIGURA 8. MECANISMO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA RESPUESTA ANALÍTICA	31
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DE UN EQUIPO DE ELECTROFORESIS CONVENCIONAL	35
FIGURA 10. PARTES PRINCIPALES DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR	36
FIGURA 11. ESQUEMATIZACIÓN DE LOS TIPOS DE INYECCIÓN DE MUESTRA EN EC.	37
FIGURA 12. SEPARACIÓN DEL ANALITO EN FUNCIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.....	40
FIGURA 13. DISTRIBUCIÓN DE LAS CARGAS EN LA INTERFAZ DEL CAPILAR DE SÍLICE Y EL FEO RESULTANTE	41
FIGURA 14. POLARIZACIÓN DE LOS GRUPOS SILANOL ANTE EL PASO DE UNA CORRIENTE ELÉCTRICA	42
FIGURA 15. IDENTIFICACIÓN DEL TIPO DE TÉCNICA CROMATOGRÁFICA EN FUNCIÓN DE LA POLARIDAD Y PESO MOLECULAR DEL ANALITO	45
FIGURA 16. ESQUEMATIZACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN EN C. DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO DE PARTÍCULA ..	46
FIGURA 17. PROCESO DE SEPARACIÓN EN CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	47
FIGURA 18. PROCESO DE SEPARACIÓN EN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	48
FIGURA 19. ESQUEMA BÁSICO DEL EQUIPO DE HPLC	49
FIGURA 20. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (CROMATOGRAMA) DE LOS DATOS OBTENIDOS EN UN ANÁLISIS POR HPLC	51
FIGURA 21. CROMATOGRAMA QUE IDENTIFICA ALGUNOS PARÁMETROS DE RETENCIÓN T_R Y T_0	52
FIGURA 22. CROMATOGRAMA QUE MUESTRA LOS FACTORES QUE MODIFICAN LA EFICIENCIA DE UNA COLUMNA CROMATOGRÁFICA.	53
FIGURA 23. ECUACIÓN DE RESOLUCIÓN EN FUNCIÓN DE LOS TRES FACTORES QUE INFLUYEN EN SU VALOR	54
FIGURA 24. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CAPTOPRIL.....	62
FIGURA 25. ESQUEMATIZACIÓN DEL MÉTODO DE PRE CONCENTRACIÓN EN LÍNEA	63
FIGURA 26. CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CAPTOPRIL POR LVSS.....	65
FIGURA 27. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CAPTOPRIL	65
FIGURA 28. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CAPTOPRIL EN PLASMA	70
FIGURA 29. ESTRUCTURA QUÍMICA DE 2-CAPTOPRIL-2'ACETONAFTONA.	71
FIGURA 30. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CAPTOPRIL EN PLASMA.....	72
FIGURA 31. CROMATOGRAMA DEL (A) CAPTOPRIL LIBRE EN PLASMA; (B) PICO BLANCO CON EL CAPTOPRIL (250 NG/ML) Y 625 NG/ML DE ESTÁNDAR INTERNO; (C) MUESTRA DE PLASMA TOMADO 2 H DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE 50 MG CON 625 NG/ML DE ESTÁNDAR INTERNO.	73
FIGURA 32. LOCALIZACIÓN DE LA VENA MARGINAL AURICULAR DEL CONEJO.....	74

FIGURA 33. ESQUEMA GENERAL DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN UV PARA TIOLES.	81
FIGURA 34. ESQUEMATIZACIÓN DEL SISTEMA ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIOLES EN PLASMA POR HPLC	82

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

r_s	Área de pico del Captopril de la solución problema
% RSD	Porcentaje de recuperación
°C	Grados Celsius
μ_{ap}	Movilidad aparente
μ_e	Movilidad electroforética
μ_{FEO}	Movilidad del flujo electroosmótico
μL	microlitros
μm	micrómetros
ABD-F	4-fluoro-7-sulfamolibbenzofurazano
A_m	Área de la muestra
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
A_{ref}	Área de referencia
ATC	Ácido tricloroacético
ATPasa	Enzima hidrolítica de Adenosin trifosfato
C	Cantidad del Captopril en la preparación de referencia
CV	Coeficiente de variación
Ca^{2+}	Ion calcio
C_{capto}	Concentración del Captopril
C_s	Concentración del estándar de disulfuro del Captopril en la solución estándar.
C_u	Concentración del Captopril en la solución problema.
D	Factor de dilución de la muestra
DE	Desviación estándar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
E	Campo eléctrico
ϵ	Constante dieléctrica
EC	Electroforesis capilar
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECEA	Enfermedades crónicas esenciales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drugs Administration
F_E	Fuerza eléctrica
FEO	Flujo electroosmótico
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
F_F	Fuerza friccional
GC	Gasto cardíaco
GMPC	Guanosín Monofosfato cíclico
η	Viscosidad de la solución
H	Altura de plato teórico
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia

SHR	Rata Hipertensa Espontánea
IECA	Inhibidor de Enzima Convertidora de Angiotensina
IR	Infrarrojo
ISO	International Organization for Standardization
K'	Factor de capacidad
K ⁺	Potasio
Kg	Kilogramos
KHP	Biftalato ácido de potasio
kv	Kilovolts
L	Largo de la columna
LVSS	Large Volume Sample Stacking
M	Concentración Molar
MAO	Monoamino Oxidasa
m-BBr	Meta monobromobimato
mg/mL	miligramos por mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mm	Milímetros
mmHg	milímetros de mercurio
N	Número de platos teóricos
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Sodio
NAC	N-acetil-L-cisteína
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
NPM	N-(1-Pirenil) maleimida
PA	Presión Arterial
p-BPB	P-bromofenacilo
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Menos logaritmo de la constante de acidez
ppm	partes por millón
Psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada (del inglés pounds per square inch)
PVA	Polivinilalcohol
Q	Carga iónica
R	Radio
r ²	Coefficiente de determinación
R _s	Resolución
r _u	Área de pico del estándar de disulfuro de Captopril de la solución estándar
SA	Ácido succínico
Si-O ⁻	Grupo silanol
SNC	Sistema nervioso central
t ₀	Tiempo muerto
TBP	Fosfato de tributilo
TLC	Cromatografía en capa fina

T_m	Tiempo de migración
t_R	Tiempo de retención
t_R'	Tiempo de retención corregido
Ua	Unidad astronómica
USP	United States Pharmacopeia
UV-VIS	Ultravioleta-visible
V	Velocidad iónica
V_R	Volumen de retención
VS	Volumen sanguíneo
$W_{1/2}$ o $W_{0.5}$	Ancho de la mitad de la altura de pico
W_b	Ancho de base
ξ	Potencial Z
Zn^{2+}	Zinc
α	Factor de selectividad

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de las Enfermedades Crónicas Esenciales (ECEA) son la primer causa mundial de mortalidad en el adulto; la Hipertensión Arterial es la ECEA de mayor prevalencia, tan sólo en el año 2000 se informó que más de 15 millones de mexicanos entre los 20 y 69 años padecían Hipertensión Arterial Sistémica (HAS)¹ y se estima que sólo aproximadamente el 10% de la población hipertensa en México está realmente en control óptimo².

Desde la década de los 50's del siglo XX se sabía que la HAS intervenía en el aumento de la morbilidad cardiovascular en los países desarrollados. Los estudios realizados en los años 60's y 70's del mismo siglo claramente mostraron la relación entre Hipertensión y las muertes por complicaciones vasculares en el órgano blanco: corazón, cerebro, riñón y vasos sanguíneos.³

El tratamiento de la Hipertensión Arterial con fármacos disminuye de forma clara la morbilidad y mortalidad por causas cardiovasculares⁵. Actualmente existen en el mercado infinidad de fármacos destinados a tratar la Hipertensión y aparecen otros nuevos continuamente, así como nuevas formas de administración para optimizar la efectividad de los antihipertensivos.

Un fármaco antihipertensivo no es simplemente un agente hipotensor, tiene que ser capaz de modificar el curso natural del estado hipertensivo y prevenir las complicaciones de la Hipertensión así como una reducción del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias periféricas².

El dipéptido D-3-mercaptometilpropionil-L-prolina conocido comercialmente como Captopril fue de los primeros fármacos del grupo de los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en ser administrados por vía oral en el tratamiento de la Hipertensión Arterial.⁴

El objetivo de la administración de un fármaco o medicamento es la obtención de un efecto terapéutico sobre el paciente. Para que pueda ejercer este efecto el fármaco debe alcanzar concentraciones adecuadas en el lugar donde se encuentran los receptores con los que interactúa.¹³

La Química Analítica juega un papel importante en el estudio y desarrollo de principios activos no sólo antihipertensivos sino de cualquier fármaco en general. El desarrollo de metodologías analíticas que permitan la cuantificación de estos activos es muy importante en la actualidad, ya que la determinación de la cantidad de una sustancia es fundamental en la industria y en muchos campos de la ciencia como lo es la farmacología.^{40,47}

Esta revisión biblio-hemerográfica-electrónica tiene como propósito recopilar metodologías para la cuantificación del Captopril en muestras biológicas sanguíneas con el objetivo de ser un

antecedente para posteriores investigaciones en nuevas vías de administración y formas farmacéuticas de este principio activo, así como su posible aplicación para nuevos compuestos con propiedades fisicoquímicas similares como: estructura, polaridad, pka's, absorción de la luz, grado de ionización, estabilidad, etc.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Realizar la investigación de las diferentes metodologías de cuantificación para el Captopril en muestras farmacéuticas y sanguíneas mediante la recopilación de la información Bibliográfica, Hemerográfica y Electrónica para contar con una base de datos referido a las técnicas de determinación de este principio activo.

2.2 Particulares

- Revisar los conceptos generales de presión e Hipertensión Arterial así como los tipos de tratamiento farmacológico para este padecimiento haciendo énfasis en los fármacos inhibidores de la ECA mediante su desarrollo teórico con el propósito de comprender la importancia del desarrollo de metodologías que permitan la mejora de estos fármacos
- Describir las características fisicoquímicas y farmacológicas del Captopril como base en la investigación de metodologías de cuantificación
- Comprender la importancia del desarrollo de un método analítico mediante el conocimiento de los tipos y características que debe presentar así como el fundamento de las técnicas de electroforesis y cromatografía para entender los principios por los cuales se lleva a cabo la separación y cuantificación de un analito
- Revisar aspectos teóricos de las técnica de cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis capilar así como el funcionamiento general de los equipos
- Informar metodologías de cromatografía de líquidos de alta eficacia para la determinación del Captopril en formas farmacéuticas
- Recopilar la información de metodologías por Electroforesis Capilar usando detección uv-vis para la determinación del Captopril en formas farmacéuticas
- Revisar metodologías por cromatografía de líquidos de alta eficacia usando detección uv-vis y fluorescencia para la determinación del Captopril en muestras sanguíneas
- Recopilar la información de las metodologías por electroforesis capilar usando detección uv-vis y fluorescencia para la cuantificación de aminotioles en muestras sanguíneas con el propósito de ser utilizadas como base teórica en el desarrollo de una metodología específica para la cuantificación del Captopril por esta técnica en muestras sanguíneas

3. METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN

La investigación es la herramienta básica para conocer lo que se encuentra a nuestro alrededor y cualquiera que sea el caso tiene como objetivo buscar la solución a algún problema junto con la concepción de nuevos conocimientos.⁷⁶

Investigar es un procedimiento reflexivo, sistemático, controlado y crítico mientras que un método se describe como un proceso lógico y riguroso mediante el cual se puede lograr la adquisición, organización y exposición de conocimientos ya sean teóricos o experimentales.⁷⁵

La presente investigación Biblio-Hemerográfica-Electrónica se realizó a partir de la siguiente metodología:

a) Definir el tema de investigación

b) Establecer los conocimientos generales previos para poder abordar el tema central de la investigación

Antes de iniciar la investigación del tema central se realizó la recopilación de información que indicara la importancia del desarrollo de metodologías para la cuantificación del Captopril.

Esta recopilación consistió en revisar conceptos como hipertensión, su etiología y su posible tratamiento, el modo de acción de los fármacos antihipertensivos con especial atención en el grupo de fármacos al que pertenece el Captopril, así como las características fisicoquímicas y farmacológicas de este principio activo.

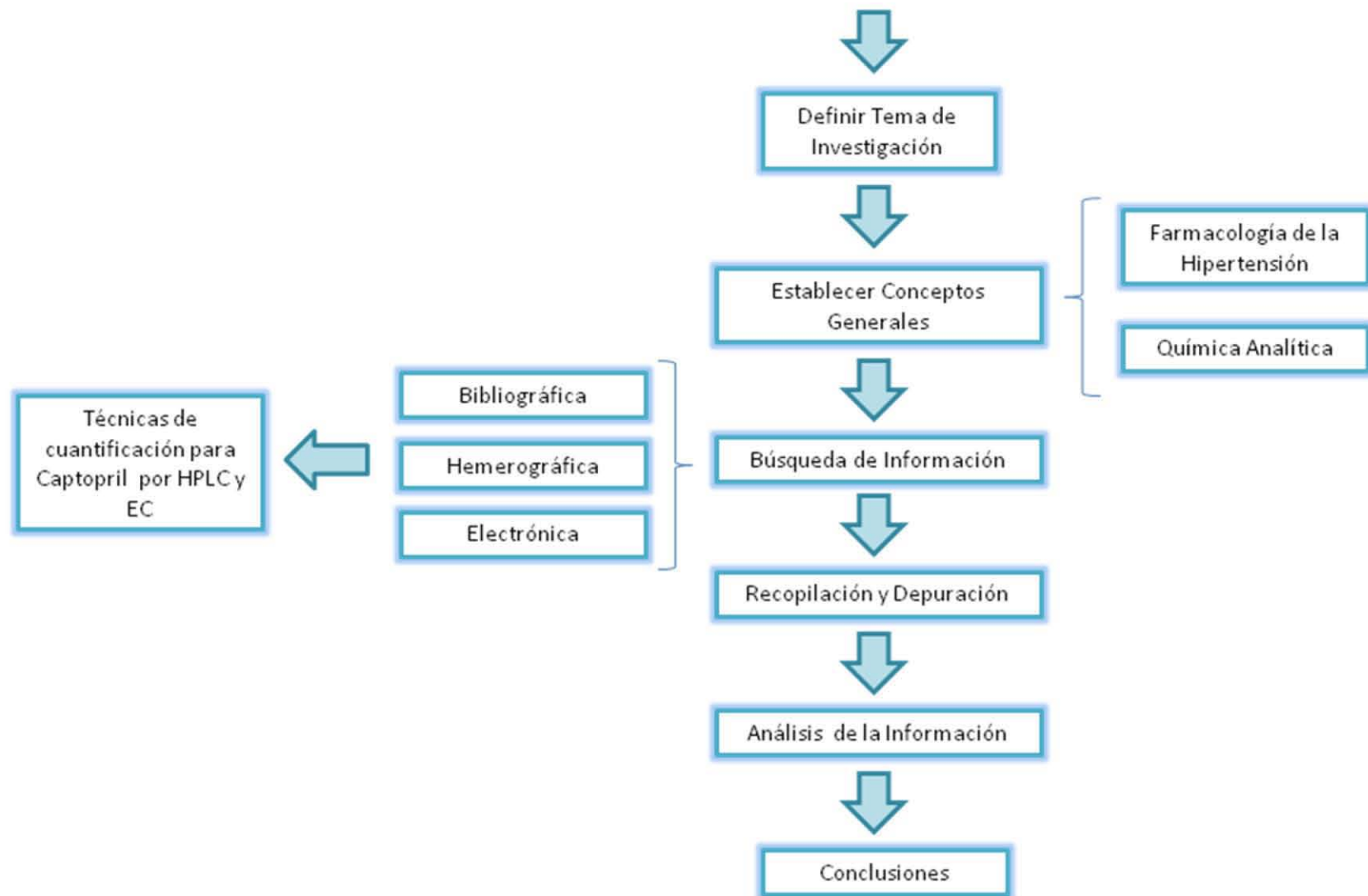
Comprender que es un método analítico, los tipos de métodos analíticos y la importancia del desarrollo y validación de estos métodos. Los fundamentos de cromatografía y electroforesis capilar fueron descritos para comprender las técnicas y procedimientos aplicados a la determinación del Captopril.

c) Investigación hemerográfica-electrónica del tema central

La búsqueda de las técnicas de cuantificación fue enfocada a técnicas por Cromatografía de líquidos de alta eficacia y técnicas por electroforesis capilar, la primera por ser la técnica de primera elección en este tipo de cuantificaciones y la segunda por ser una técnica novedosa en métodos de cuantificación.

Al final de esta investigación y recopilación de información se realizó un análisis para determinar que técnica tiene más beneficios para la determinación del Captopril así como conocer los principios básicos que deben ser tomados en cuenta para el desarrollo de una metodología de cuantificación para cualquiera de estas dos técnicas.

Metodología de Investigación



4. ANTECEDENTES

4.1 Hipertensión

La presión Arterial (PA) se refiere a la fuerza hidrostática de la sangre sobre las paredes Arteriales que resulta de la función de bombeo del corazón, volumen sanguíneo, resistencia de las arterias al flujo, y diámetro del lecho Arterial⁵ (Fig. 1). La PA cambia continuamente dependiendo de la actividad, la temperatura, la dieta, los medicamentos que se administren y del estado físico y emocional; los valores normales de presión Arterial varían entre 90/60 y 120/80 mm Hg⁶.

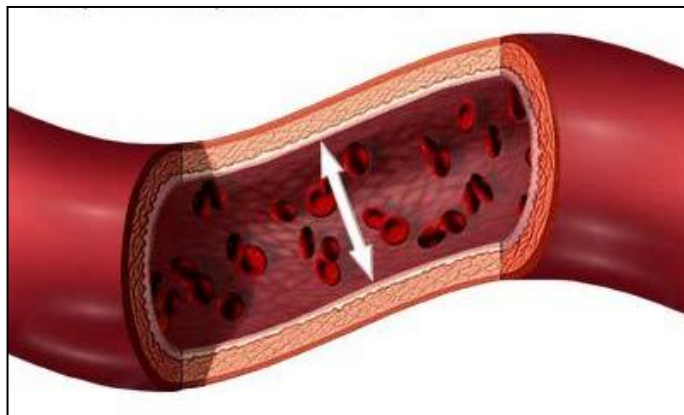


Figura 1. Representación de la Presión Arterial en una arteria (Tomado de www.compendiodenfermeria.com)⁹¹

La medición de la PA consta de dos parámetros:

- Presión sistólica: es la presión máxima que se alcanza en la sístole (cuando el corazón se contrae). Esta depende fundamentalmente del débito sistólico, la volemia y la distensibilidad de la aorta.⁶
- Presión diastólica: es la mínima presión de sangre contra las arterias y ocurre durante la diástole (entre latidos cardíacos). Depende fundamentalmente de la resistencia vascular periférica.⁶

Son múltiples los mecanismos fisiológicos conocidos que intervienen en el control de la PA (Fig. 2) y que al mantener una estrecha interrelación garantizan la homeostasis del organismo,^{7, 8} estos sistemas de control son:

- Sistema de regulación inmediata
- Sistema de regulación de acción intermedia
- Mecanismos a largo plazo

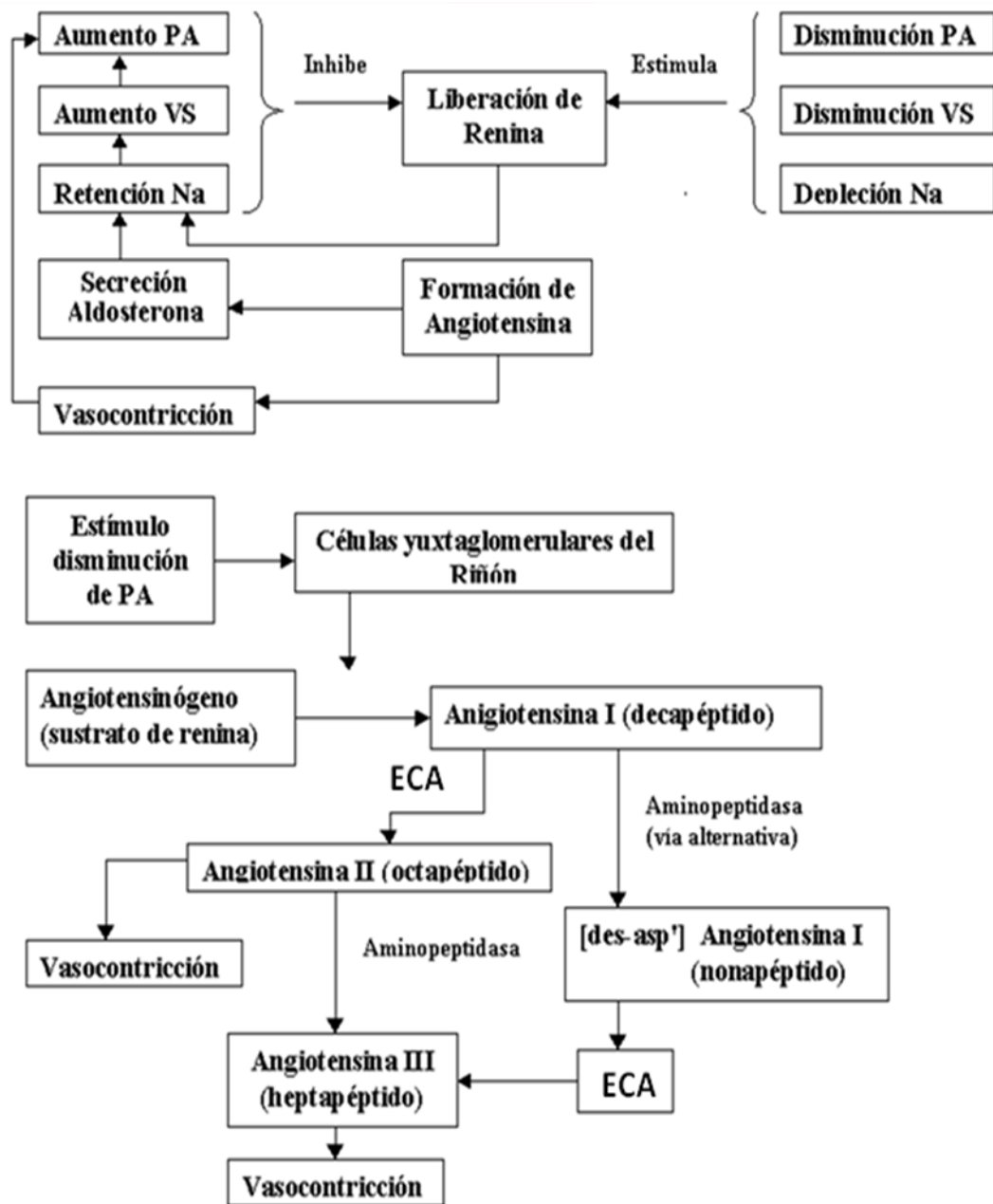


Figura 2. Sistemas que regulan la presión Arterial en el organismo (Tomado de *Fisiopatología de la Hipertensión Arterial*)¹⁵

El sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Fig. 3) es un elemento importante de los mecanismos que regulan la hemodinámica, el equilibrio de agua y los electrolitos. Los factores que activan el sistema son: la disminución del volumen sanguíneo, la presión de perfusión renal y la concentración de sodio en plasma.⁹

Cuando disminuye la presión Arterial se libera Renina (una enzima renal). La Renina a su vez activa la Angiotensina, una hormona que contrae las paredes musculares de las arterias pequeñas (arteriolas) y, en consecuencia, aumenta la presión Arterial¹⁰ (Fig. 3).

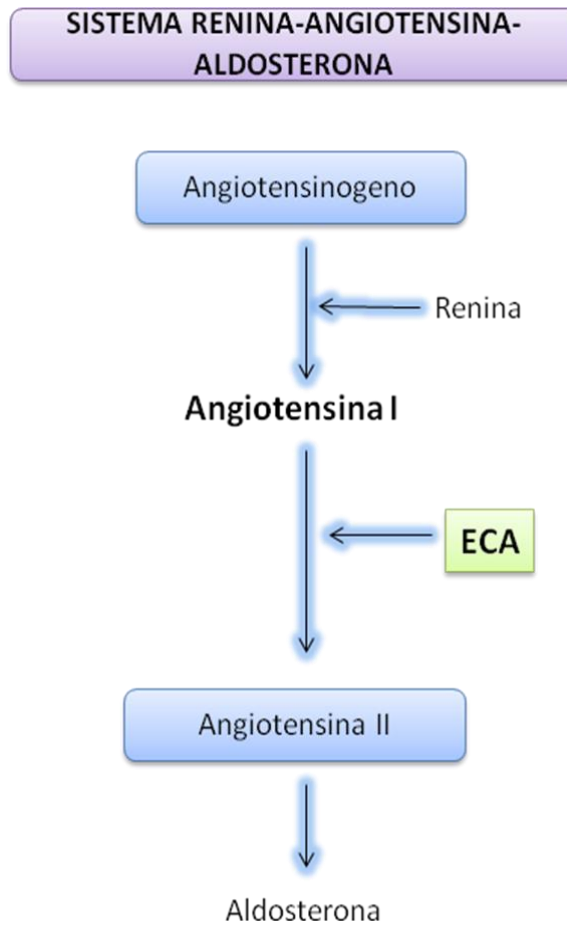


Figura 3. Esquema del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Tomado de Rev. Costarric. Cardiología)¹²

La Angiotensina también estimula la secreción de la hormona Aldosterona de la glándula suprarrenal que provoca la retención de sodio en los riñones y la eliminación de potasio. Como el sodio retiene agua, se expande el volumen de sangre y aumenta la presión Arterial.¹⁰ La Renina es segregada desde el aparato yuxtaglomerular renal en respuesta a la hipoperfusión glomerular o a una reducción en la ingesta de sal, también es segregada en respuesta al estímulo del sistema nervioso central.

La Renina es responsable de la conversión del sustrato de la Renina (angiotensinogeno) a Angiotensina I, una sustancia fisiológicamente inactiva, que es rápidamente convertida a Angiotensina II por la enzima convertidora de Angiotensina (ECA) ¹¹.

Este sistema tiene importancia en la regulación de la presión Arterial tanto a corto como largo plazo, cambios moderados en las concentraciones plasmáticas de Angiotensina II incrementan de manera aguda la presión Arterial. La Angiotensina II incrementa de manera directa la contractilidad cardíaca por medio de la abertura de los canales de Ca^{2+} y de manera indirecta la frecuencia cardíaca mediante el aumento del tono simpático, neurotransmisión noradrenérgica aumentada y la liberación de catecolaminas suprarrenales, así la Angiotensina II puede incrementar o disminuir la contractilidad, la frecuencia y gasto cardíaco, dependiendo del estado fisiológico del individuo. ¹³

La vasopresina (hormona antidiurética) también es esencial para mantener el equilibrio hídrico, su síntesis y liberación depende de la interacción de estímulos osmóticos, hipovolémicos, hormonales y no osmóticos. ¹⁴ Actúa en la porción final del túbulo distal y en los tubos colectores renales provocando un aumento de la reabsorción de agua lo que tiene como consecuencia:

- Disminución de la osmolaridad plasmática
- Aumento del volumen sanguíneo y por consecuencia aumento del gasto cardíaco (GC)

Cuando las células del hipotálamo detectan un aumento de la osmolaridad del líquido cefalorraquídeo secretan vasopresina que promueve la reabsorción de agua por parte del riñón y a su vez es un potente vasoconstrictor, este sistema es el causante de que la sal aumente la presión sanguínea, debido a que aumenta la osmolaridad del líquido cefalorraquídeo. ¹³

En términos médicos, la Hipertensión se refiere a un cuadro de presión Arterial elevada, independientemente de la causa la HAS es una enfermedad crónica, controlable de etiología multifactorial, que se caracteriza por un aumento sostenido en las cifras de la presión Arterial sistólica por arriba de 140 mm Hg y/o de la presión Arterial diastólica igual o mayor a 90 mm Hg. ¹⁶

La HAS se puede clasificar de tres maneras distintas:

- Por el nivel de la lectura de la PA. En la tabla 1 se muestra la clasificación de la HAS en función del valor de la presión arterial que va desde normal a muy grave.
- Por la importancia de las lesiones orgánicas¹⁸:

Fase I. No se aprecian signos objetivos de alteración orgánica

Fase II. Aparece por lo menos uno de los siguientes signos de afección orgánica:

- La hipertrofia ventricular izquierda

- Estrechez focal y generalizada de las arterias retinianas
- Proteinuria y ligero aumento de la concentración de creatinina en el plasma o uno de ellos

Fase III. Aparecen síntomas y signos de lesión de algunos órganos a causa de la HAS en particular:

- Corazón: Insuficiencia ventricular izquierda
- Encéfalo: Hemorragia cerebral o del tallo encefálico, encefalopatía hipertensiva
- Fondo de ojo: Hemorragia y exudados retinianos con o sin edema papilar

Tabla 1. Grados de HAS en función de valores tensionales en mayores de 18 años.¹⁷

	Presión diastólica (mmHg)	Presión Sistólica (mmHg)
Normal	80	120
Pre hipertensión	85-89	130-139
Hipertensión		
Estadío I (leve)	90-99	140-159
Estadío II (moderada)	100-102	160-179
Estadío III (grave)	110-112	180-209
Estadío IV (muy grave)	≥ 120	≥210

- Por la etiología:

Hipertensión Arterial Primaria: Es llamada también idiopática o esencial, a diferencia de la HAS secundaria, no se conoce causa orgánica evidente. La etiopatogenia no se conoce aún pero los distintos estudios indican que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la Hipertensión primaria.¹⁹ En la tabla 2 se exponen posibles teorías que explican el origen de la HAS primaria.

Tabla 2. Posibles teorías que explican el origen de la HAS primaria.²⁰

FACTORES	Genéticos
	Alimentarios
	Ambientales
	Psicosociales
TEORIAS	Neurovisceral de Miasnikov
	Iones de sodio-potasio y la ATPasa
	Desbalance en la relación GMPc – AMPc
SISTEMAS	Renina-Angiotensina-Aldosterona
Metabolismo de los glúcidos Sedentarismo Tabaquismo	

Hipertensión Arterial Secundaria: Se refiere a la Hipertensión de causa conocida.⁷ En la tabla 3 se muestran las principales causas para desarrollar HAS secundaria.

Tabla 3. Causas más frecuentes de HAS secundaria.⁸

CASO	TIPO
Renales	Nefritis crónica. Enfermedad poliquística. Enfermedad del colágeno vascular. Nefropatía diabética. Hidronefrosis. Glomerulonefritis aguda. Cualquier lesión que obstruya las arterias renales. Estenosis renal. Infarto renal. Trasplante renal. Tumores secretores de Renina.
Endocrinas	Feocromocitoma. Aldosteronismo primario. Producción excesiva de: DOC y 18OH-DOC y otros mineralocorticoides. Hiperplasia suprarrenal congénita. Síndrome de Cushing por tumoración suprarrenal o por tumores hipofisarios. Tumores cromafines extrasuprarrenales. Hiperparatiroidismo. Acromegalia.
Trastornos neurológicos.	Hipertensión intra-craneana. Cuadriplejía. Envenenamiento por plomo. Síndrome de Guillain-Barré.
Fármacos y sustancias químicas	Ciclosporina. Anticonceptivos orales. Glucocorticoides. Mineralocorticoides. Simpaticomiméticos. Tiramina e inhibidores de la MAO.
HAS por embarazo.	

4.2 Generalidades de los fármacos antihipertensivos

Los fármacos antihipertensivos son utilizados con el fin de disminuir la presión Arterial elevada en pacientes hipertensos, en la actualidad existe una gran variedad de principios activos con esta actividad farmacológica.⁵ Un fármaco antihipertensivo no es solamente un agente hipotensor, tiene que ser capaz de modificar el curso natural del estado hipertensivo y prevenir las complicaciones de la hipertensión. Los distintos fármacos antihipertensivos tienen que dar lugar a una reducción del gasto cardíaco, una disminución de la resistencia periférica o ambos efectos de forma simultánea.⁷

Existen cinco grandes grupo de fármacos antihipertensivos:¹³

1. Diuréticos
2. Bloqueantes β -adrenérgicos
3. Antagonistas de calcio
4. Bloqueantes α -adrenérgicos periféricos
5. Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina

En general actúan disminuyendo el gasto cardíaco y/o las resistencias vasculares periféricas por mecanismos de acción no siempre suficientemente conocidos y generalmente de naturaleza multifactorial, en la Figura 4 se ejemplifican los principales puntos de acción de algunos fármacos antihipertensivos. Estos fármacos también pueden clasificarse en función de su sitio o mecanismo de acción como se observa en la tabla 4; los fármacos reducen la resistencia periférica al actuar sobre el músculo liso para generar la relajación de los vasos sanguíneos o al actuar en la actividad de los sistemas que producen constricción de los mismos. ²²

Tabla 4. Clasificación de los fármacos antihipertensivos en función de su mecanismo de acción ²²

Tipo	Ejemplo
DIURÉTICOS	
Tiazidas y fármacos relacionados	Hidroclorotiazidas, Clortalidona
Diuréticos de asa	Furosemida, Bumetanida
Diuréticos ahorradores de K ⁺	Amilorida, Espironolactona
SIMPATICOLÍTICOS	
Fármacos de acción central	Metildopa, clonidina
Bloqueadores ganglionares	Trimetafán
Bloqueadores de neuronas adrenérgicas	Guanetidina
Antagonistas β- adrenérgicos	Propranolol, Metoprolol
Antagonistas α- adrenérgicos	Prazosín, Fenoxibenzamina
Antagonistas adrenérgicos mixtos	Labetalol
VASODILATADORES	
Arteriales	Hidralazina, Diazóxido
Arteriales y venosos	Nitroprusiato
Bloqueadores de los canales de Ca ²⁺	Verapamil, Diltiazem
Inhibidores de la ECA	<u>Captopril</u> , Enalapril
Antagonistas de los receptores de Angiotensina II	Losartan

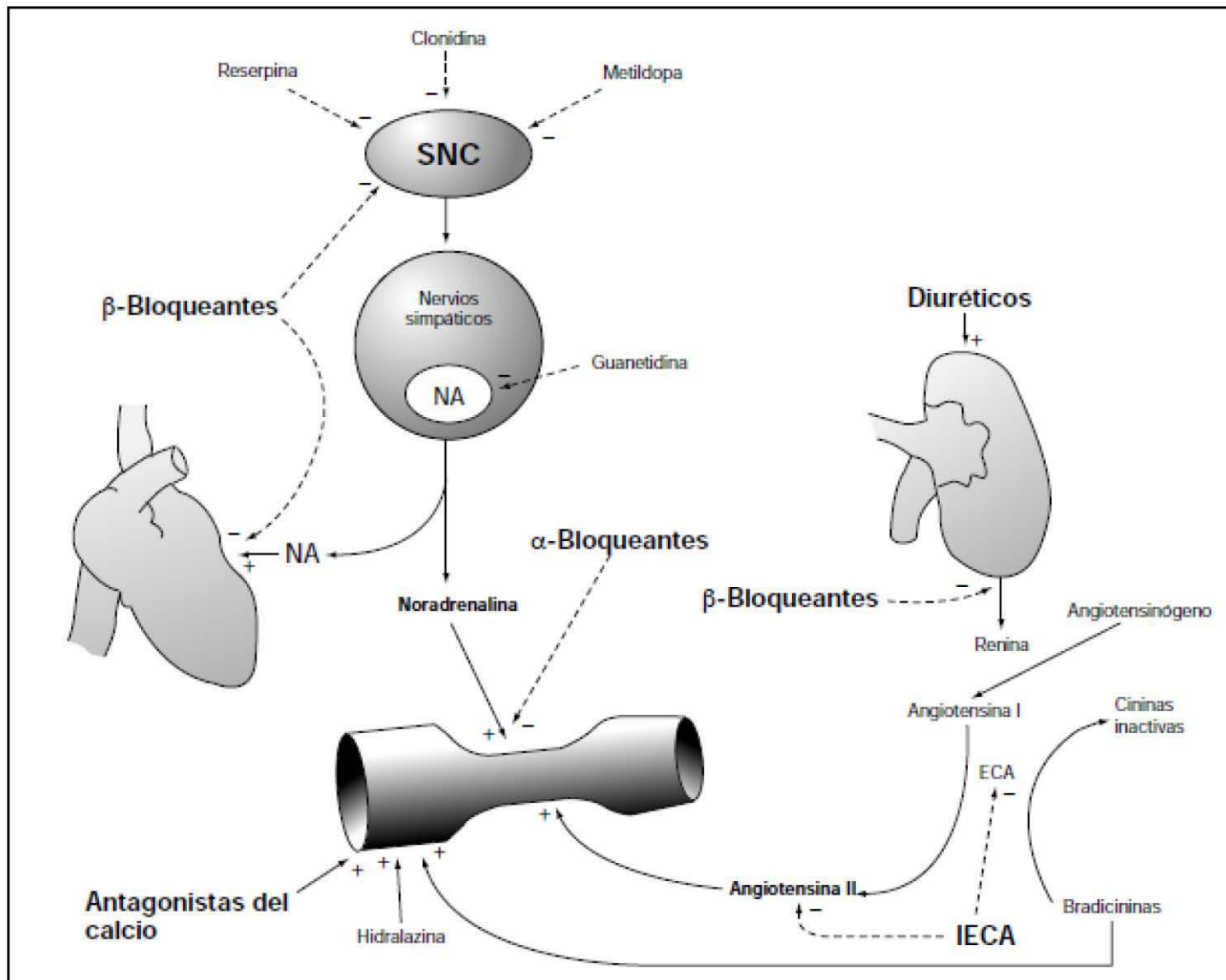


Figura 4. Principales puntos de acción de los fármacos antihipertensivos.²² (Tomado de Farmacología Humana de Flórez)

- Diuréticos

Los diuréticos producen una pérdida de Na^+ y agua del organismo actuando directamente sobre el riñón. Actúan incrementando la pérdida de sal y agua provocando la disminución del volumen plasmático a corto plazo.²²

Los diuréticos tiazidas inhiben la reabsorción de cloruros y de sodio a nivel del túbulo distal aumentando su excreción y la del agua mientras que los de asa provocan igual efecto en la rama ascendente del asa de Henle eliminando además potasio. Su acción antihipertensiva se divide en 2 fases:²⁴

Fase I: disminuyen la volemia

Fase II: generan vasodilatación

Los diuréticos ahorradores de potasio son de actividad antihipertensiva moderada; se utilizan ampliamente como medicación combinada con las tiazidas y análogos en el tratamiento de la hipertensión.

Actúan sobre el túbulo distal inhibiendo en forma competitiva a la Aldosterona provocando eliminación de sodio y agua e impide la excreción de potasio y magnesio. Se cree que su acción antihipertensiva se produce por el bloqueo del efecto de la Aldosterona sobre el músculo liso vascular.²³

Entre los efectos indeseables más comúnmente descritos para ambos fármacos destaca la sensación de cansancio, cefaleas, trastornos gastrointestinales, hipercalcemia, esto último especialmente en pacientes renales.

- Bloqueantes β -adrenérgicos

Los β -bloqueantes disminuyen la fuerza contráctil del miocardio, así como la frecuencia cardíaca, por lo que inicialmente reducen el gasto cardíaco²⁵. Otro aspecto importante en el uso de este tipo de fármacos es el decremento de la secreción de Renina y por lo tanto también la disminución de Angiotensina II²⁴. Los mecanismos de acción por los que se lleva a cabo esta disminución son:

- Inhibición de la secreción de Renina
- Efectos en el gasto cardíaco
- Efectos en el sistema nervioso central²⁵
- Restauración de la sensibilidad de relajación vascular²⁷

- Antagonistas de Calcio

Estos fármacos son usados en el tratamiento de la Hipertensión debido a que este padecimiento es el resultado del incremento de la resistencia vascular periférica y ya que la contracción del músculo liso vascular depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre.¹³

Todos los bloqueadores de canales de Ca^{2+} disminuyen la presión Arterial al relajar el músculo liso arteriolar y aminorar la resistencia vascular periférica con lo que los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} desencadenan una descarga simpática.²²

- Bloqueantes α -adrenérgicos periféricos

Los fármacos bloqueantes α_1 selectivos producen disminución de la resistencia periférica y de la presión Arterial por su efecto vasodilatador secundario al bloqueo de estos receptores, son sustancias de gran heterogeneidad estructural que muestran afinidad estereoquímica por los α -adrenoceptores e inhiben tanto la actividad simpática endógena en su manifestación α -adrenérgica.^{22, 13}

El uso crónico de este tipo de fármacos produce tolerancia por retención de agua y sodio, por lo que debe adicionarse un diurético para mantener su actividad antihipertensiva.⁹²

Estos bloqueantes potencian la liberación de noradrenalina en la circulación sanguínea periférica, aumentando la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción.²⁴ Este incremento refleja del tono simpático también activa el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, produciéndose retención de sodio y agua. Los antagonistas de los α -adrenoreceptores producen, de manera específica, el fenómeno denominado inversión de la respuesta a la adrenalina ya que al bloquear la actividad α_1 se mantiene la actividad β_2 vasodilatadora.¹³

- Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina

La enzima convertidora de Angiotensina es una carboxipeptidasa poco específica de 1278 aminoácidos, que cataliza la conversión de Angiotensina I a Angiotensina II²⁸ (Figura 5 y 6). Los inhibidores de ECA son aminoácidos modificados y oligopéptidos que pueden absorberse por vía oral y se obtienen por síntesis en el laboratorio⁷⁶. Este tipo de fármacos ejercen una potente acción hipotensora por disminución de las resistencias periféricas totales que se produce en los territorios Arterial y venoso dando como resultado la acción combinada sobre los sistemas Renina-Angiotensina²⁴.

Los inhibidores de la ECA presentan los siguientes mecanismos de acción:

- Mecanismo de acción molecular por inhibición de la actividad de la ECA
- Mecanismo de acción celular de reducir la síntesis de Angiotensina II y el metabolismo de algunas cininas vasodilatadoras

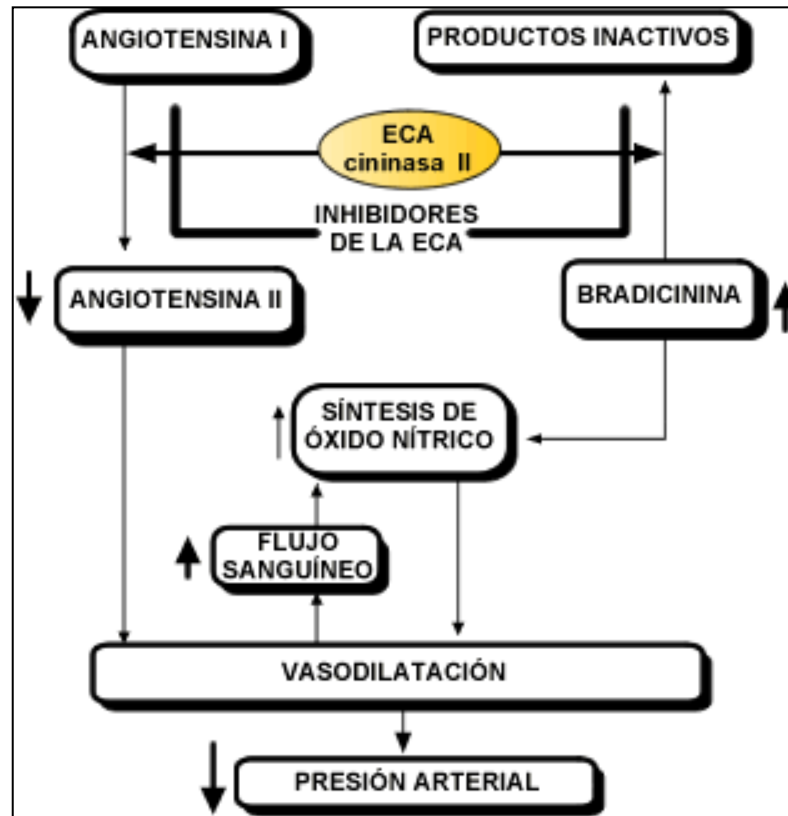


Figura 5. Mecanismo de acción antihipertensivo de los inhibidores de ECA (Tomado de www.recodec.com)²⁸

Al bloquear competitivamente la enzima de conversión, reducen los niveles plasmáticos y tisulares de Angiotensina II y Aldosterona. Como consecuencia, producen una acción vasodilatadora arteriovenosa y disminuyen los niveles plasmáticos de noradrenalina y vasopresina.²⁹

La inhibición se realiza mediante la unión de un grupo químico, característico en cada caso, con el átomo de Zn^{2+} de la convertasa, formándose un complejo de inhibición que posteriormente se disocia.²⁹ La inhibición de la convertasa provoca una disminución de los niveles plasmáticos de Angiotensina II y Aldosterona y, por ende, una supresión de las acciones vasculares e hidroelectrolíticas de la Angiotensina II y la Aldosterona, respectivamente.³⁰

La enzima de conversión (cininasa II) degrada la bradicidina a productos inactivos favoreciendo la liberación de prostaglandinas con lo que se activa una acción vasodilatadora. La inhibición enzimática hace que queden disponibles más cininas, por tanto, los inhibidores de ECA actúan a través de un doble mecanismo: reduciendo los agentes represores y aumentando los vasodilatadores (Fig. 5).³¹ En la Tabla 5 se menciona la clasificación y ejemplos del grupo de fármacos que pertenecen al los inhibidores de la ECA en función del ligando que se une a Zn^{2+} .

Tabla 5. Clasificación de los inhibidores de ECA en función del ligando que se une a Zn^{2+} .³²

Fármacos que contienen el grupo sulfhidrilo
Alacepril Captopril Zofenopril
Fármacos que contienen el grupo carboxilo
Benazepril. Cilazapril. Enalapril. Lisinopril. Perindopril. Quinapril. Ramipril.
Fármacos que contienen el grupo Fosfínico
Fosinopril.

Ese tipo de fármacos están indicados en el tratamiento de la Hipertensión Arterial esencial y en general en todos aquellos procesos hipertensivos que cursen con niveles elevados de Renina.³⁴

Los fármacos IECA presentan un nivel moderado de toxicidad, con efectos secundarios poco frecuentes, pero generalmente leves y transitorios. No producen efectos adversos específicos, sino que la mayor parte de éstos derivan de las acciones cardiovasculares del fármaco, especialmente de tipo vasodilatador.³²

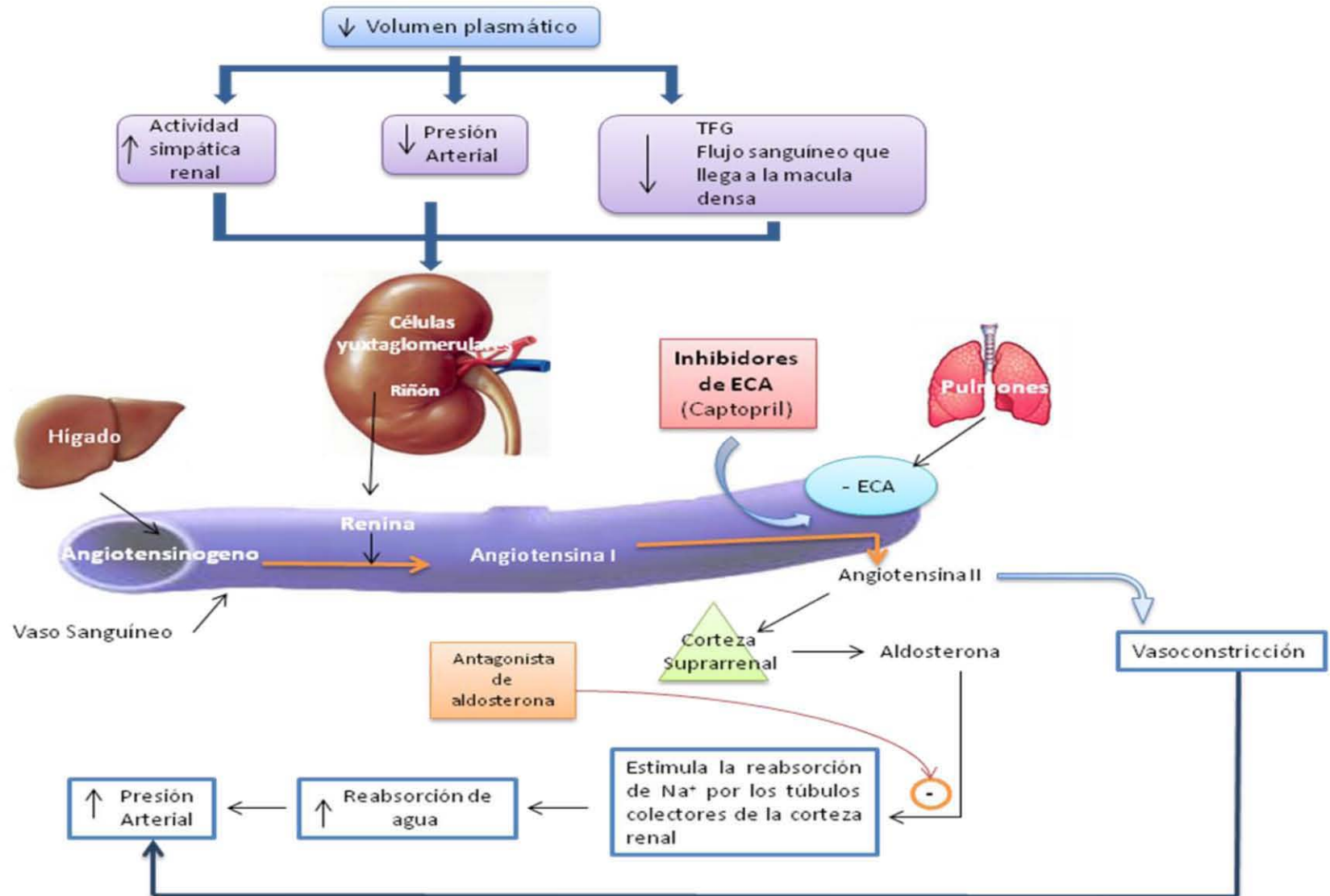


Figura 6. Sistema Renina-Angiotensina e inhibidores de ECA (Tomado de lo esencial en farmacología Curso Crash.)³³

4.3 Captopril

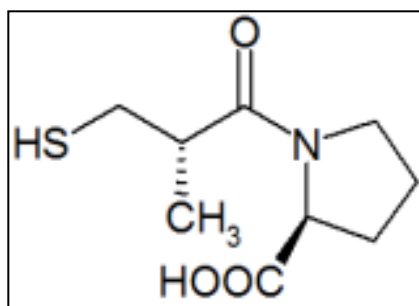


Figura 7. Estructura química del Captopril (Tomado de *The Merck Index*.)³⁵

El Captopril fue desarrollado en 1975 por tres investigadores estadounidenses (Miguel Ondetti, Bernard Rubin y David Cushman) en conjunto con la compañía Squibb (ahora Bristol-Myers Squibb) cuya patente fue conseguida en septiembre de 1977 y es hasta 1981 que el Captopril fue aprobado por la FDA como un fármaco seguro.⁸⁰ Fue la primera molécula sintetizada por variación estructural a partir de la molécula original de Angiotensina I y del receptor de la ECA, lo que permitió iniciar los estudios de variación estructural en otras moléculas con sus receptores correspondientes.⁸¹ En la figura 7 se muestra la estructura química del Captopril.

El Captopril es un fármaco utilizado en el tratamiento de la Hipertensión y la insuficiencia cardíaca, pertenece al grupo de los inhibidores de la ECA, que se unen al grupo activo de la enzima a través de su grupo sulfhidrido, disminuyendo los niveles de Angiotensina II y Aldosterona, incrementando las concentraciones de bradicidina. El componente principal de esta acción hipotensora es el bloqueo de la conversión del decapeptido Angiotensina I al octapeptido Angiotensina II.¹³

Propiedades Fisicoquímicas³⁵

- Formula condensada: C₉H₁₅NO₃S
- Nombre químico: 1-2(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil-L-prolina
- Peso molecular: 217.29g/mol
- Punto de fusión: 103-104°C
- Constante de disociación (pka): 3.7, 9.8
- Descripción: polvo blanco cristalino, olor ligeramente sulfuroso
- Solubilidad: agua (160 mg/mL a 25°C), metanol, etanol, diclorometano y cloroformo

Farmacocinética

○ Absorción

El Captopril se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal alcanzándose el pico máximo de niveles plasmáticos aproximadamente en una hora. La absorción mínima es del 75% y en presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal se reduce la absorción en un 30-40% por lo que debe administrarse una hora antes de la ingesta.³⁶

○ Distribución

Aproximadamente del 25 al 30% del fármaco circula unido a proteínas plasmáticas con una vida media de 3 horas y aumenta en presencia de insuficiencia renal hasta 3.5 a 32 horas. Después de una dosis única su efecto máximo es de 60-90 minutos. La duración de su acción varía de 6-12 horas y es directamente proporcional a la dosis administrada. Estudios en animales demuestran que el Captopril no atraviesa barrera hematoencefálica en cantidades significativas.³⁶

○ Eliminación

Más del 95% de la dosis absorbida se elimina por orina, hasta un 50% como fármaco inalterado y el resto en dímeros del Captopril, formados por puentes disulfuro.³⁶

○ Toxicidad

Estudios realizados con el Captopril en animales durante la organogénesis no han mostrado ningún efecto teratogénico, no obstante, el Captopril ha producido toxicidad fetal en algunas especies, incluyendo mortalidad fetal durante los últimos meses de gestación, retraso del crecimiento y mortalidad postnatal en ratas. Los datos preclínicos no muestran riesgos especiales para los seres humanos según los estudios convencionales sobre farmacología de seguridad, toxicidad de dosis repetidas, genotoxicidad y potencial carcinogénico.³⁶ Los efectos tóxicos relevantes y relacionados con el fármaco incluyen:

- Alteración de la hematopoyesis
- Toxicidad renal
- Erosión y/o ulceración gástrica

○ Aplicaciones Terapéuticas

Los usos principales del Captopril se basan en su efecto vasodilatador e inhibición de la actividad de la función renal. Estas ventajas se consideran lo más claramente posible en las siguientes condiciones:^{37, 38}

- Hipertensión Arterial
- Insuficiencia cardíaca congestiva

- Infarto de miocardio
- Nefropatía diabética

4.4 Generalidades del Análisis Químico

Con base en las características fisicoquímicas y farmacológicas del Captopril como fármaco antihipertensivo es esencial el desarrollo de métodos analíticos para su análisis cualitativo y cuantitativo en diferentes muestras ya sean biológicas (muestras para estudios de bioequivalencia o diagnóstico clínico) o en medicamentos.

La ciencia que se encarga del diseño de métodos analíticos es la Química Analítica, que comprende la separación, identificación y determinación de las cantidades relativas de los componentes que forman una muestra de materia.⁴⁷ El proceso analítico debe proyectarse en toda su extensión, deben ser diseñados todos los pasos que integran el estudio para la obtención de resultados confiables como:⁸²

- Toma, almacenamiento y conservación de la muestra
- Tratamiento de la muestra para el posterior análisis
- Determinación del analito
- Evolución y presentación de resultados
- Informe final

Los métodos analíticos se pueden clasificar de forma general en dos:⁸³

1. Métodos analíticos clásicos. Este tipo de métodos se basan en reacciones químicas y pueden ser por análisis volumétricos o análisis gravimétricos

2. Métodos analíticos instrumentales. Son métodos modernos de separación, cuantificación e identificación de especies químicas y se basan en características fisicoquímicas del analito

Para obtener información del analito es necesario proveerle un estímulo, generalmente en forma de energía electromagnética, eléctrica, mecánica o nuclear, en la tabla 6 se muestran algunos ejemplos de estímulos por los cuales un analito puede ser cuantificado.⁸⁴ Aparte de la forma de energía se debe contar con cuatro componentes fundamentales como son (Figura 8):

- Generador de señales
- Transductor de entrada o detector
- Procesador de señales
- Transductor de salida o dispositivo de lectura



Figura 8. Mecanismo para la obtención de una respuesta analítica (Tomado de www.pucpr.edu)⁸⁴

Tabla 6. Propiedades físicas que pueden utilizarse como señales analíticas en el análisis cualitativo o cuantitativo.⁸⁴

Señal	Métodos Instrumentales
Emisión de Radiación	Espectroscopia de emisión (rayos X, de electrones Auger), fluorescencia, fosforescencia y luminiscencia.
Adsorción de radiación	Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV-VIS, IR), espectroscopia foto acústica, resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico.
Dispersión de la radiación	Turbidimetría, nefelometría, espectroscopia de Raman.
Refracción de la radiación	Polarimetría, dispersión rotatoria óptica
Potencial eléctrico	Potenciometría
Carga eléctrica	Coulombimetría
Corriente eléctrica	Polarografía, amperometría
Razón carga masa	Espectrometría de masas
Velocidad de reacción	Métodos cinéticos
Propiedades térmicas	Conductividad térmica, análisis térmico diferencial, métodos de entalpia
Radioactividad	Métodos de activación y dilución isotópica

Es esencial definir con claridad la naturaleza del problema analítico ya que de este análisis se podrá elegir con claridad cuál es el método analítico más indicado para realizar la determinación cualitativa y/o cuantitativa.⁸⁴ Con este fin se deben realizar los cuestionamientos siguientes:

- ¿Qué exactitud y precisión se requieren?
- ¿De cuanta muestra se dispone?

- ¿Cuál es el intervalo de concentración del analito?
- ¿Qué componentes de la muestra interferirán?
- ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la matriz de la muestra?
- ¿Cuántas muestras deben analizarse?

La definición del problema es la primera etapa, en ella se plantea el tipo de análisis que se necesita y la escala de trabajo. Tras ello, debe realizarse la elección del método analítico, aspecto clave para una resolución adecuada del problema. Otras características a tener en cuenta en la elección del método son: ⁸⁷

- Velocidad
- Facilidad y comodidad
- Habilidad del operador
- Coste y disponibilidad de equipo
- Costo por muestra

Una vez elegido el método, se procede a su ejecución. Posteriormente, se pasa a valorar los resultados obtenidos para establecer si el problema ha sido resuelto de forma satisfactoria. Si no es así, se deberá reiniciar el proceso analítico y replantear el problema. Dentro de la elección adecuada del método analítico y por medio de la literatura científica, es posible la elección de alguno de los siguientes métodos: ⁸⁵

- Métodos oficiales de análisis. Son establecidos por regulaciones de naturaleza estatutaria
- Métodos Normalizados de Análisis o Estándar: Son aquellos métodos que han sido estudiados por diferentes organizaciones y utilizan estudios inter-laboratorios para validarlos (ISO)
- Métodos recomendados: Son los métodos que resultan de la investigación y se encuentran en literatura científica

Calidad en el desarrollo de Métodos Analíticos

Los parámetros de calidad son las características numéricas del instrumento y permiten al químico reducir el nivel de elección del método; es por eso que al realizar el diseño de un método analítico es importante, también, realizar un proceso de validación. ⁸⁶ El termino validación de refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. ⁸⁵

Los criterios que se deben tomar en cuenta para realizar una validación de un método analítico son:

Parámetros de validación del sistema:⁸⁸

- 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
- Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto.

Parámetros de validación del método ⁸⁸

- Linealidad
- Precisión. Se evalúa por medio de dos sub parámetros:
 - a. Repetibilidad: se refiere a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones
 - b. Reproducibilidad: se refiere al 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.
- Exactitud: Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia
- Estabilidad de la muestra: Se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento de muestreo hasta su análisis
- Selectividad: Capacidad del método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra

5. ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis Capilar (EC) se ha convertido en una de las técnicas analíticas más avanzadas para la separación y análisis cuali-cuantitativo en sustancias de importancia farmacéutica ya que es una técnica complementaria a las ya establecidas como la cromatografía.⁶²

A continuación se describirán los conceptos teóricos básicos y los principios de la EC con el propósito de generar el suficiente conocimiento para entender las operaciones básicas de los instrumentos de EC y los principios por los que se lleva a cabo la cuantificación de los analitos en dicha técnica.

- Definición de Electroforesis

El termino electroforesis se ha definido como el movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas, sustancias neutras o migración pasiva por atracción o repulsión en un campo eléctrico³⁷. En otras palabras un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) se colocan en una disolución conteniendo iones y al aplicar voltaje a los electrodos, los iones de diferentes cargas se mueven a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta.

Dependiendo de la presencia o ausencia de soporte o medio de estabilización se pueden identificar dos técnicas electroforéticas:³⁸

a) Métodos con soporte (medio de estabilización). Se refiere a un medio como papel, gel o un material empaquetado donde la muestra es colocada físicamente y existe una disolución que cubre por completo el soporte. Las partes básicas de sistemas son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor (Figura 9).

b) Métodos en solución libre: el analito es introducido en un tubo en forma de U que contiene una solución amortiguadora, no existe un sistema de soporte y al aplicar el campo eléctrico las especies migran en función de una relación carga-masa

La técnica electroforética en solución en medios libres sin elementos soportes fue desarrollada por Tiselius en 1937. Su estudio se basó en el análisis de mezclas de proteínas en un tubo aplicando un campo eléctrico de corriente continua por lo que gano en premio Nobel de Química.⁸⁹

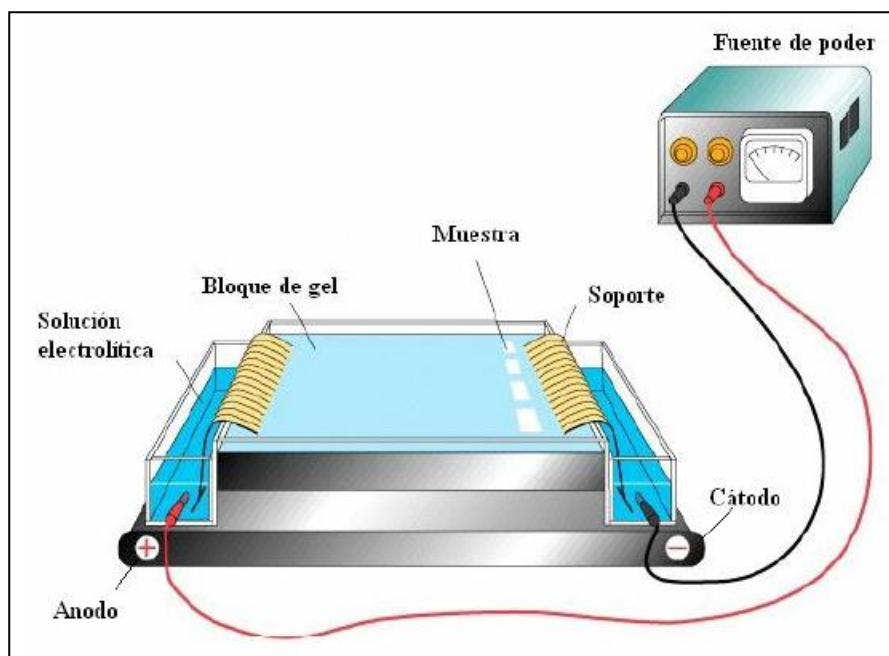


Figura 9. Representación de un equipo de electroforesis convencional (Tomado de *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis*)³⁹

5.1 Generalidades de Electroforesis Capilar

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o cargadas inició en 1967 por Hjerten y fue hasta 1979 que se usaron capilares de 200 μm de diámetro interno recubiertos por teflón. El uso de capilares de sílica fundida con diámetros de 75 μm fue promovida por Jorgenson con lo que logró elevar el potencial analítico de la técnica.⁸⁹

La EC requiere una instrumentación simple: una fuente de alto voltaje, un capilar de sílica fundida cuyos extremos se encuentran sumergidos, junto con dos electrodos, en dos viales que contienen una disolución amortiguadora, un detector y un sistema procesador de datos. La fuente de voltaje normalmente es capaz de proporcionar hasta 30 kV, es una fuente continua conectada a dos electrodos de platino.⁹⁰ En la Figura 10 se muestran las partes básicas del equipo de EC.

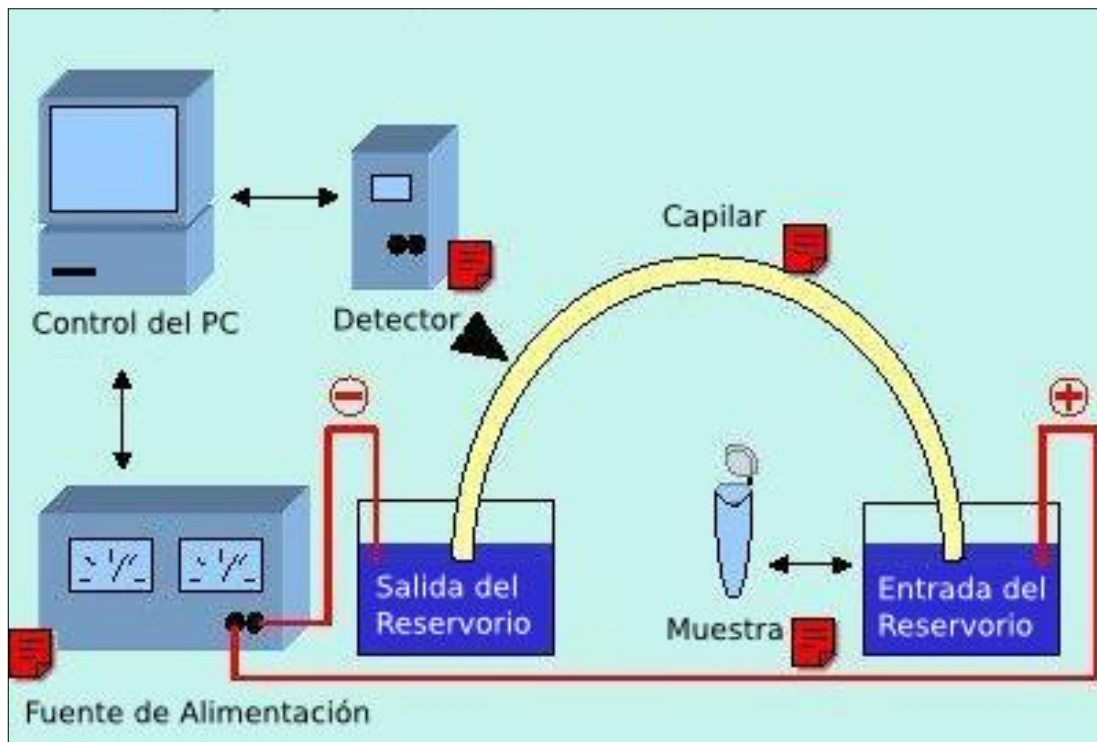


Figura 10. Partes principales del equipo de electroforesis capilar (Tomada de Análisis Fundamentos de Electroforesis Capilar)⁴⁰

El capilar y los viales (reservorios) se llenan con un electrolito con capacidad amortiguadora; la muestra se introduce dentro de este sistema que al someterlo a un campo eléctrico las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente (dependiendo de la carga).³⁹

El capilar es de sílice fundida de diámetro interno entre 10 y 100 μm , recubierto con poliamidas para brindar mayor flexibilidad y disminuir su fragilidad además de una ventana sobre el capilar que permite el paso de la luz UV dando como resultado una visualización on-line.⁴¹

Idealmente los capilares deben dispersar el calor, ser químicamente y eléctricamente inertes, transparentes al UV-visible ya que esto facilita la detección on-line; flexibles, robustos y económicos. Algunos capilares se derivatizan con polímeros como el polivinilalcohol (PVA), este recubrimiento reduce la adsorción de compuestos catiónicos además que suprime al flujo electroosmótico con lo que se mejora la reproducibilidad de los tiempos de migración.⁴⁷

Otra parte importante para conservar la eficacia teórica que proporciona la EC es el sistema de inyección, ya que de esta depende el ancho de la zona de respuesta; existen diferentes sistemas de inyección para EC que se basan en aplicar un gradiente de voltaje (inyección electrocinética) o un gradiente de presión (inyección hidrodinámica) entre los extremos del

capilar en ambos casos la inyección suele ser de orden de nanolitros, en la figura 11 se ejemplifican los diferentes tipos de inyección.⁴³

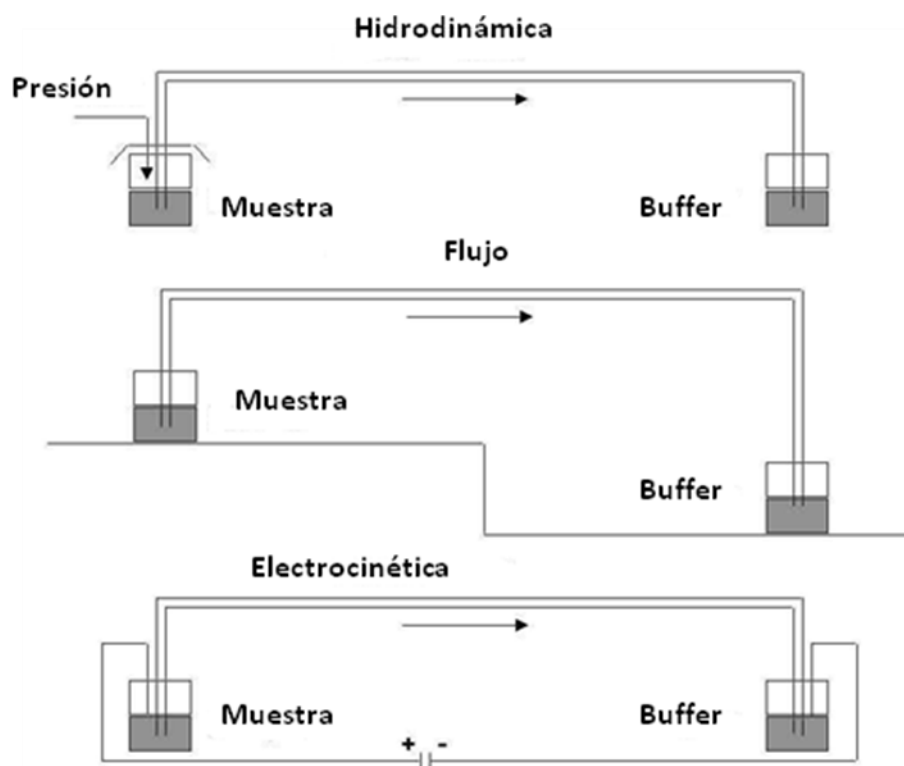


Figura 11. Esquematización de los tipos de inyección de muestra en EC. (Tomado de www.cultek.com)⁴¹

Los sistemas de detección para EC generalmente realizan una detección directa sobre el capilar donde el capilar actúa como celda de detección. El tipo de detector a utilizar depende del analito a determinar así como del nivel de sensibilidad que tenga en la tabla 7 describen algunos sistemas de detección para EC.

Tabla 7. *Sistemas de detección en EC y rangos de límites de detección alcanzados*⁴³

SISTEMA DE DETECCIÓN	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
Técnicas Ópticas	
- Absorción UV-visible	
Directa	10^{-5} a 10^{-7}
Indirecta	10^{-4} a 10^{-6}
Con paso óptico aumentado	10^{-7}
- Fluorescencia	
Directa	10^{-7} a 10^{-9}
Indirecta	10^{-6} a 10^{-8}
Inducida por láser directa	10^{-10} a 10^{-13}
Inducida por láser indirecta	10^{-5} a 10^{-7}
- Fosforescencia	10^{-6} a 10^{-8}
- Quimioluminiscencia	10^{-5} a 10^{-11}
- Infrarojo (IR)	10^{-7} a 10^{-9}
- Resonancia magnética nuclear	10^{-9} a 10^{-11}
- Dispersión Raman	10^{-3} a 10^{-7}
- Termo óptico	10^{-7} a 10^{-8}
- Índice de refracción	10^{-5} a 10^{-7}
Técnicas Electroquímicas	
- Conductimetría	10^{-7} a 10^{-8}
- Potenciometría	10^{-7} a 10^{-8}
- Amperometría	10^{-7} a 10^{-8}
Otras Técnicas	
- Espectrometría de masas	10^{-7} a 10^{-9}
- Radiométricos	10^{-10} a 10^{-11}

Fundamento de Electroforesis Capilar

La separación por electroforesis está basada en la diferencia de velocidad de los solutos en un campo eléctrico, donde la velocidad de un ion está dada por la siguiente ecuación: ³⁹

$$V = \mu_e E \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde V se refiere a la velocidad iónica, μ_e movilidad electroforética y E es el campo eléctrico.

El campo eléctrico está dado en volts/cm y depende del capilar usado y de la fuerza del potencial aplicado a través de este. La movilidad electroforética depende de la especie iónica.

Las moléculas son separadas por las fuerzas del campo eléctrico aplicado; las muestras separadas son monitoreadas por el detector y son introducidas en el capilar por electroforesis o por electrocinética.⁴⁰

Existe una relación entre el voltaje aplicado y la longitud de capilar, la movilidad de un ión es una constante que puede ser determinada por el coeficiente de fricción a través de un medio elegido (Ec. 2).³⁹

$$(\mu_e) \times (\text{fuerza eléctrica } F_E / \text{fuerza friccional } F_F) \dots\dots (\text{Ec. 2})$$

La fuerza eléctrica está representada por la ecuación 3 donde q se refiere a la carga iónica.³⁹

$$F_E = qE \dots\dots(\text{Ec.3})$$

Donde para un ión esférico la fuerza friccional está determinada por la ecuación 4³⁹

$$F_F = 6\pi\eta rV \dots\dots(\text{Ec.4})$$

Dónde:

η = viscosidad de la solución

r = radio

v = velocidad iónica

La clave de la separación es la elección del sistema amortiguador y del pH del mismo; ya que estas condicionan el grado de ionización y por lo tanto la movilidad relativa de los analitos en el capilar. El amortiguador elegido debe tener una buena capacidad amortiguadora al pH de trabajo así como una baja absorptividad a la longitud de onda de detección y una baja movilidad electroforética para minimizar el paso de corriente.⁴³

Movilidad Electroforética

Este término se refiere a la constante de proporcionalidad entre la velocidad del ión y la fuerza del campo eléctrico, es directamente proporcional a la carga del ión pero a la vez es inversa a al coeficiente de fricción.⁴⁰

La movilidad electroforética (Fig. 12) de una molécula es mayor cuanto mayor sea su carga y disminuye según aumenta su tamaño, ya que mayor es la fricción de la molécula con el medio y menor es su carga por unidad de superficie, así moléculas del mismo tamaño y carga, pero de diferente forma, pueden tener una movilidad electroforética diferente y ser, por tanto, separables mediante una técnica electroforética.⁴¹

Otro tipo de movilidad en electroforesis capilar es la movilidad aparente (μ_{ap}) y se refiere a la suma de la movilidad electroforética (μ_e) más la movilidad electroosmótica (μ_{FEO}) del medio de disolución (Ec. 5).

$$\mu_{ap} = \mu_e + \mu_{FEO} \dots \text{(Ec. 5)}$$

Bajo condiciones normales de separación siempre se cumple que: ⁸⁹

Movilidad total de cationes $> \mu_{FEO}$
 Movilidad total de aniones $< \mu_{FEO}$
 Movilidad total de elementos neutros $= \mu_{FEO}$

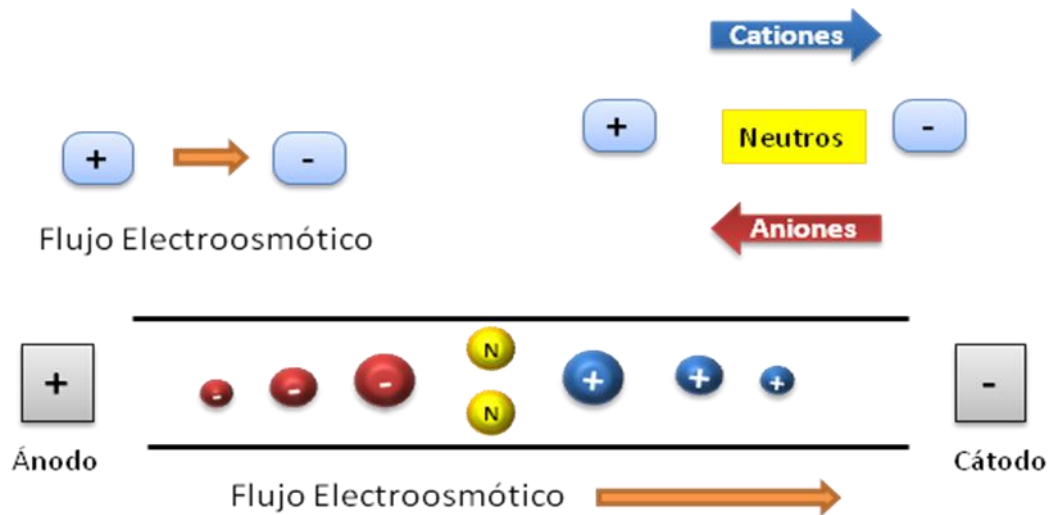


Figura 12. Separación del analito en función de la movilidad electroforética (Tomada de Análisis Químico Cuantitativo Daniel C. Harris)⁴⁰

Las principales características de la movilidad electroforética son: ⁹⁰

- Es específica para cada soluto
- Depende de la relación carga-masa
- Los cationes migran hacia el cátodo, los aniones al ánodo y los compuestos neutros no se ven afectados por el campo eléctrico

Flujo Electroosmótico

Además de las moléculas de soluto cargadas, también en el medio hay una solución amortiguadora que se desplaza a través del capilar bajo la influencia de un campo eléctrico; lo que se conoce como flujo electroosmótico (FEO).

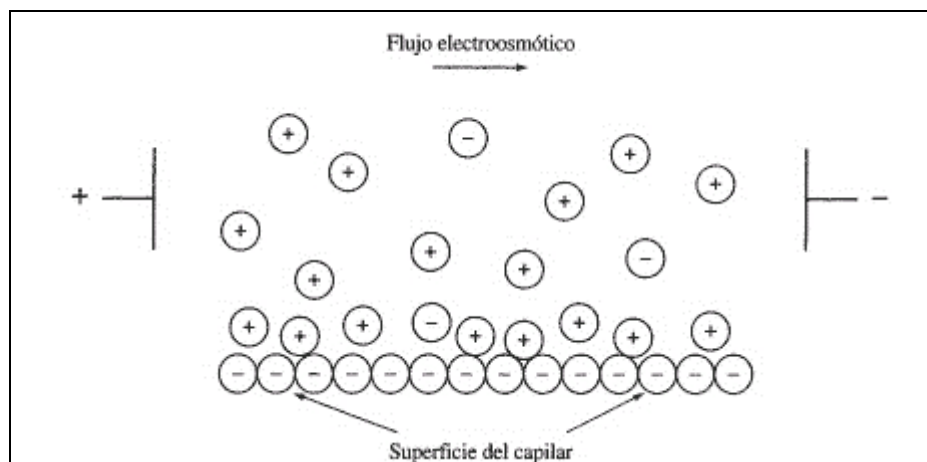


Figura 13. Distribución de las cargas en la interfaz del capilar de sílice y el FEO resultante (Tomado de A. G Ewing, Anal. Chem) ⁴²

El FEO es formado debido a la pared interior del capilar de sílice fundida que está integrado por grupos silanol con carga negativa (Si-O^-) cuando el pH está por encima de 2). Una capa inmóvil fuertemente adsorbida de cationes adyacentes a la superficie negativa neutraliza parcialmente la carga del capilar y el resto de la carga negativa se neutraliza por el exceso de cationes solvatados en movimiento que se encuentran en la pared difusa de la doble capa de la disolución próxima a la pared como se muestra en la figura 13. ⁴⁰

En un campo eléctrico los cationes son atraídos por el cátodo mientras que los aniones por el ánodo, el exceso de cationes en la pared difusa de la doble capa constituye un momento neto en dirección al cátodo, lo que da inicio a un fenómeno conocido como electroósmosis, que es impulsado por los cationes solvatados cercanos a las paredes del capilar creando un tipo de de FEO de toda la disolución al cátodo como se ejemplifica en la figura 14. ⁴¹

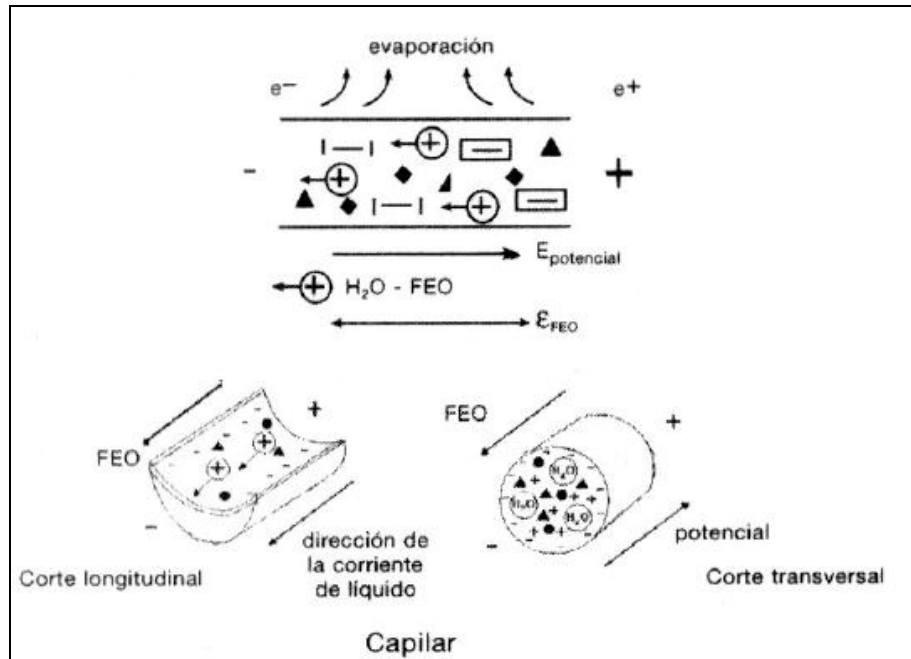


Figura 14. Polarización de los grupos silanol ante el paso de una corriente eléctrica (Tomado de *Electroforesis capilar. Acta bioquímica clínica latinoamericana*)⁸⁹

Una característica del FEO es que presenta un perfil de distribución plana, ya que no sólo se desvía pocos nanómetros de la pared del capilar con lo que se proporciona la misma velocidad a todos los solutos, sea cual sea la posición en el capilar. La magnitud del FEO puede ser expresada en términos de la movilidad y la velocidad de forma matemática por medio de las ecuaciones 6 y 7.³⁷

$$V_{\text{FEO}} = (\varepsilon \xi / \eta) E \dots\dots (\text{Ec.6})$$

ó

$$\mu_{\text{FEO}} = (\varepsilon \xi / \eta) \dots\dots (\text{Ec. 7})$$

Dónde:

V_{FEO} = Velocidad del FEO

μ_{FEO} = Movilidad FEO

ε = constante dieléctrica del medio

ξ = potencial Z

También es necesario el conocimiento de las propiedades ácido-base de los analitos, ya que un analito con algún grupo básico estará protonado a pH bajos y migrará antes del FEO, mientras que un analito con algún grupo ácido se comportará como un anión y migrará después del FEO, es necesario conocer el pka del analito para predecir su comportamiento electroforético y proponer el sistema amortiguador más adecuado.⁹⁰

El FEO puede ser afectado por las siguientes condiciones: ⁹⁰

- Voltaje aplicado: su aumento provoca el aumento del FEO, este aumento puede ser indiscriminado y es conocido como Efecto Joule
- pH de la solución amortiguadora: afecta a la ionización del capilar y del analito por lo tanto también produce un cambio en la movilidad
- Concentración de la solución amortiguadora: a temperatura constante, el aumento de concentración de la solución amortiguadora produce una disminución del FEO
- Modificación de la pared del capilar: en este sistema se puede disminuir, eliminar o invertir el FEO

Ventajas de la Electroforesis Capilar

Una de las características más destacables de la EC es su gran versatilidad para realizar varios análisis; esta versatilidad se fundamenta en los diversos modos de operación que la técnica ofrece que en su gran mayoría son de fácil uso.

En el área biomédica (análisis de proteínas, péptidos, DNA, monitoreo de fármacos) así como en el área biofarmacéutica (control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterapéuticos) la EC está en crecimiento constante debido a la simplicidad operacional ya que sólo se requieren pequeños volúmenes de muestra. ⁸⁹

Otra de las principales ventajas es que requiere una instrumentación relativamente simple como:

- Una fuente de alto voltaje
- Un capilar de sílice fundida
- Dos electros de platino
- Viales con solución amortiguadora
- Un detector
- Sistema de adquisición de datos

6. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA

A través del tiempo las técnicas analíticas relacionadas con la cuantificación e identificación de sustancias han evolucionado de manera importante, este es el caso de la cromatografía de líquidos que comenzó con pequeños cilindros empaquetados con silicato con tamaño de partícula muy grande hasta llegar a la cromatografía de líquidos de alta eficacia.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) es una herramienta muy útil en el momento de demostrar la presencia de un analito para su cuantificación, utilizando cantidades muy pequeñas y realizando el análisis en tiempos muy cortos.

- Definición de Cromatografía

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial al ser arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria.⁴⁴ Es considerado un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil.

Para cromatografía líquida la fase móvil es un líquido o un gas mientras que la fase estacionaria es normalmente un líquido viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las subpartículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. El fluido que entra a la columna se llama eluyente y el que sale por el extremo de la columna se le nombra eluato.⁴⁰

Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre sí y con respecto a la fase móvil. La migración o retención de los analitos pueden tener su origen en dos fenómenos de interacción que se dan entre las dos fases:⁴⁶

1. Adsorción. Que es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial

2. Absorción. Que es la retención de una especie química por parte de una masa, y debido a la tendencia que esta tiene a formar mezcla con la primera, absorción pura, o a reaccionar químicamente con la misma, absorción con reacción química, considerando ambas como un fenómeno másico y no superficial

Como la separación en cromatografía está basada en la interacción de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, de esta misma forma se clasifican los métodos cromatográficos, que dependen del tipo de soporte y de las propiedades de la fase móvil y estacionaria como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Tipos de cromatografía y condiciones de fase móvil y fase estacionaria⁴⁷

Tipo	Fase móvil	Fase estacionaria
Papel	Líquido	Sólido
Capa fina	Líquido	Sólido
Fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o Líquido (menos polar)
Fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o Líquido (polar)
Intercambio iónico	Líquido	Sólido
Exclusión	Líquido	Sólido
Fluidos supercríticos	Fluido supercrítico	Sólido
Gases	Gas	Sólido o Líquido

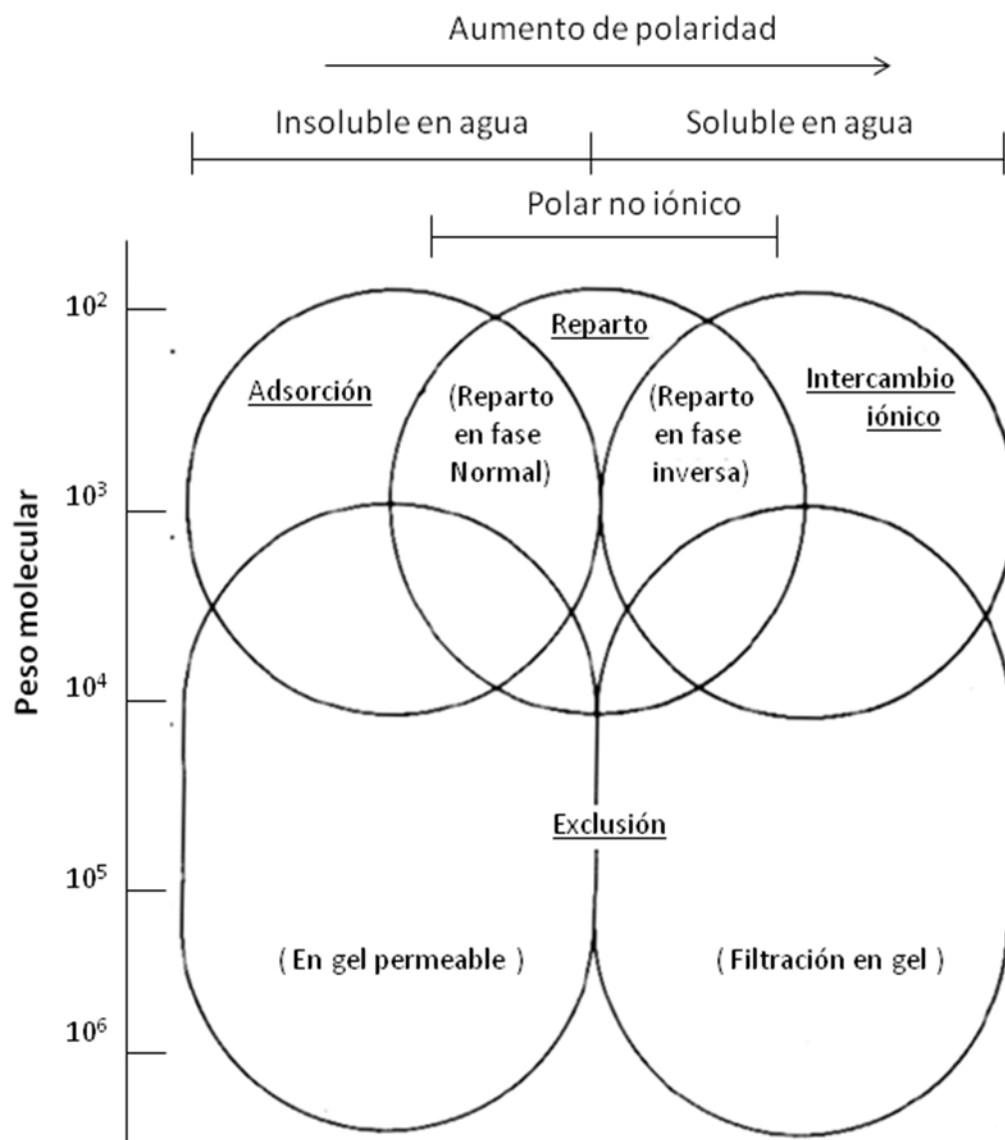


Figura 15. Identificación del tipo de técnica cromatográfica en función de la polaridad y peso molecular del analito (Tomado de http://gc.discussing.info/gs/b_theory)⁵¹

Técnicas de Separación en Cromatografía Líquida

La cromatografía puede clasificarse de acuerdo al tipo de equilibrio involucrado, mismo que es gobernado por el tipo de fase estacionaria utilizada. Así la cromatografía puede ser de adsorción, intercambio iónico, exclusión y afinidad (Fig. 15).⁵¹

- Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un sólido en el que los componentes de la muestra son adsorbidos. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-sólido) o un gas (cromatografía gas-sólido); los componentes se distribuyen entre dos fases a través de la combinación de los procesos de adsorción y desorción. Permite separar los distintos componentes de una disolución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. La cromatografía de adsorción es adecuada para compuestos no polares, que tengan masas moleculares inferiores a 5000 ua.⁴⁸

- Cromatografía de exclusión por tamaño

En la cromatografía de exclusión (Fig. 16) puede separarse moléculas solvatadas de acuerdo a su tamaño y habilidad a penetrar en la fase estacionaria. La separación se lleva a cabo por diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes tamaños o magnitudes. La cromatografía de exclusión por tamaño se usa extensivamente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros orgánicos sintéticos.⁴⁹

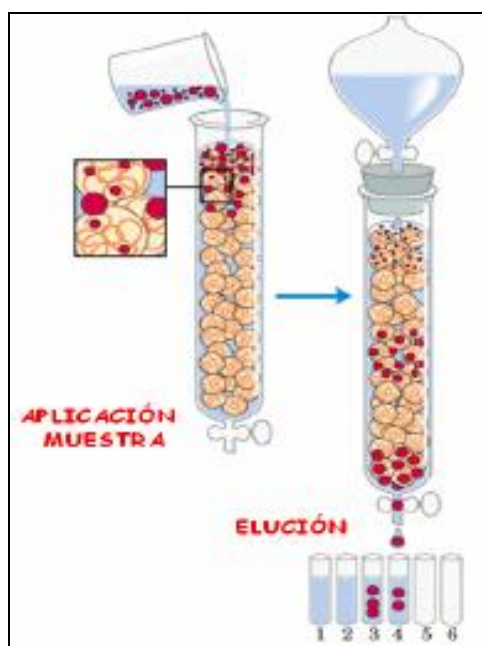


Figura 16. Esquematización del proceso de separación en C. de exclusión por tamaño de partícula (Tomado de <http://ocw.usal.es>)⁴

- Cromatografía de intercambio iónico

Se utiliza para separar y determinar especies iónicas, en función de la carga de las moléculas. La fase estacionaria consiste en una resina de intercambio iónico. Los procesos de intercambio iónico se basan en intercambios entre iones presentes en una disolución y los iones del mismo signo de la superficie de la resina (Fig. 17). Los intercambiadores pueden ser ácidos o básicos, fuertes o débiles.⁵¹

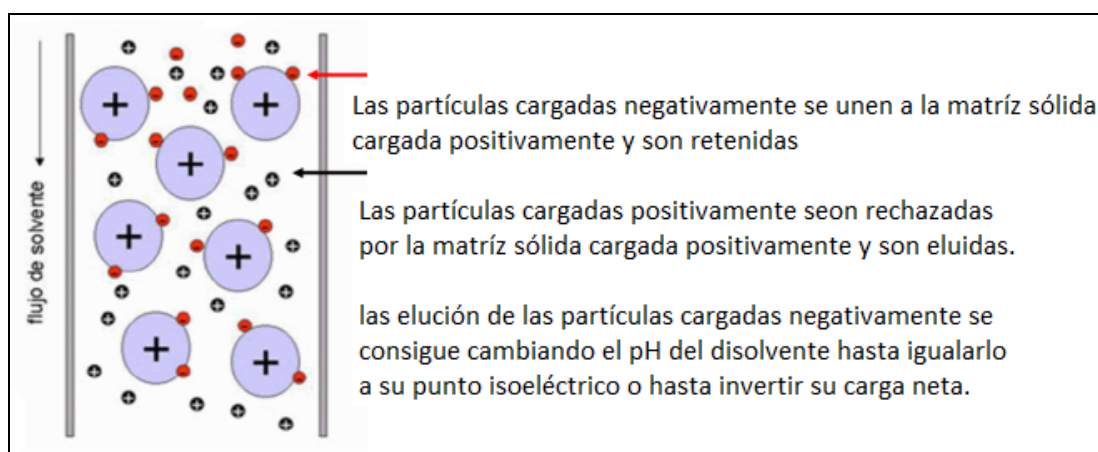


Figura 17. Proceso de separación en Cromatografía de intercambio iónico (Tomado de *Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech*)⁵¹

La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH. Las diferencias en propiedades de carga de compuestos biológicos son a menudo considerables, y tomando en cuenta que la cromatografía de intercambio iónico es capaz de separar especies con propiedades poco diferentes.⁴⁸

- Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria. Las interacciones entre las moléculas del ligando y blanco pueden ser el resultado de interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y/o puentes de hidrógeno (Fig. 18).⁵⁰

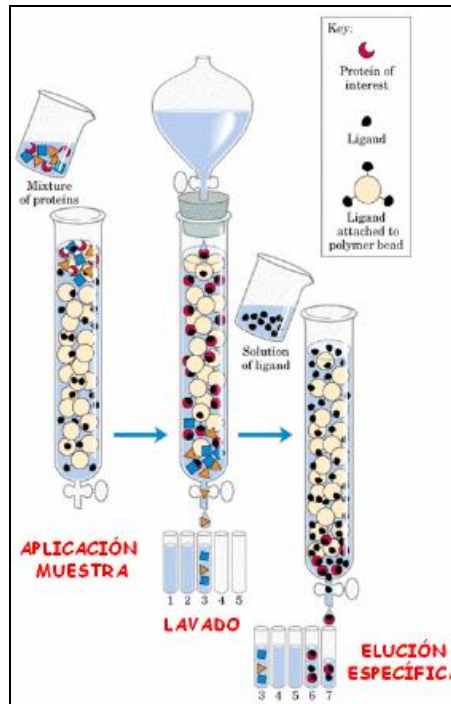


Figura 18. Proceso de separación en cromatografía de afinidad (Tomado de <http://ocw.usal.es>)⁴⁹

6.1 Generalidades de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

HPLC se ha desarrollado en los últimos años como una de las principales técnicas dentro de la industria farmacéutica, esto es porque representa una herramienta útil dentro de la industria debido a la capacidad para analizar prácticamente la mayoría de las muestras farmacéuticas y al mejoramiento en la tecnología de las columnas cromatográficas. Esta técnica es rápida, exacta, precisa y confiable.⁵⁰

El análisis cromatográfico involucra la introducción, separación y detección de los analitos en las mezclas, la separación se basa en sus propiedades fisicoquímicas e interacciones químicas con la fase móvil y estacionaria.

Algunas de sus aplicaciones por las cuales esta técnica es de primera elección son:⁵³

- Gran sensibilidad
- Determinaciones cuantitativas exactas
- Determinación de compuestos no volátiles (alto peso molecular, iones metálicos) o termolábiles
- Para análisis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleídos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos

En la figura 19 se ejemplifican las partes esenciales que integran al equipo de HPLC como son:⁴⁷

- Reservorio de fase móvil: recipientes inertes, generalmente de vidrio con dispositivos que eliminan los gases disueltos y partículas que pudieran estar presentes en la fase móvil
- Sistema de bombeo: este sistema es necesario para aplicar y regular la presión y velocidad de flujo de la fase móvil. Este sistema de bombeo debe generar presiones por encima de 6000 psi, debe estar libre de pulsaciones y ser resistente a la corrosión así como alcanzar flujos de 0.1 a 10 mL/min.⁵³ entre las bombas más usadas se encuentran:

Bombas recíprocas

Bombas de desplazamiento

Bombas neumáticas

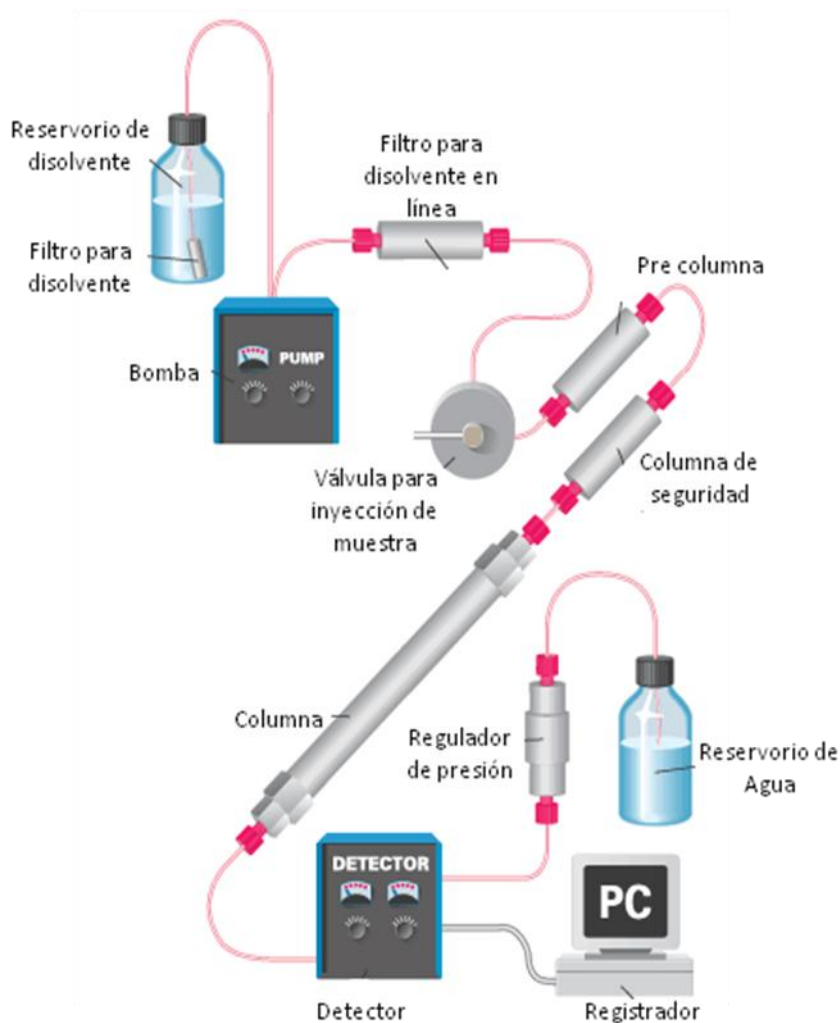


Figura 19. Esquema básico del equipo de HPLC (Tomado de www.textoscientificos.com)⁴⁶

- Sistemas de inyección: se refiere a válvulas que permiten regular la aplicación de la muestra en volúmenes de 5 a 500 μL . El inyector más empleado es una válvula de 6 puertas con bucles de volumen conocido y una palanca con dos posiciones (llenado e inyección)
- Columna: las columnas analíticas contienen a las partículas de la fase estacionaria; son de acero inoxidable y resisten presiones de hasta 10000 psi, de 10 a 30 cm de longitud con diámetro interno de 4 a 10 mm y un tamaño de partícula de 1 a 10 μm . La mayoría de los equipos de HPLC tienen acoplada una pre-columna que es adicionado para eliminar la materia en suspensión o contaminantes de los disolventes, otra función es saturar la fase móvil con fase estacionaria para minimizar pérdidas en la columna; la composición del relleno es similar a la de la columna analítica sólo que el tamaño de partícula es un poco mayor para minimizar la caída de la presión.⁵³ Existen diferentes tipos de rellenos para las columnas analíticas, estos pueden ser de tipo:

Pelicular (bolas de vidrio o polímero, no porosas y esféricas)

Partículas porosas (micropartículas de sílice)

No sólo la separación depende del tipo de columna, también es importante el tipo de elución que puede ser de dos tipos: ⁵⁰

- a. Elución isocrática. Cuando la composición del eluyente es constante, es decir, es sólo un tipo de fase móvil
- b. Elución en gradiente. Cuando la composición del eluyente está en cambio continuo con el objetivo de aumentar la fuerza de la fase móvil. Hay un cambio de fase móvil a determinados intervalos de tiempo dentro del estudio cromatográfico

Aunque no se debe olvidar que cuando más semejante es el disolvente en polaridad respecto a la fase estacionaria, mejor eluyen los solutos.

Otra parte importante de HPLC son los detectores, que deben estar basados en la medida de una propiedad del efluente (índice de refracción, la constante dieléctrica, densidad) o basados en la medida de una propiedad del soluto (absorbancia en el UV, fluorescencia, o corriente límite) que no es inherente a la fase móvil (Tabla 9). Las principales características de un buen detector son: ⁵⁴

- Sensibilidad adecuada
- Estabilidad y buena reproducibilidad
- Respuesta lineal extendida a varios órdenes de magnitud
- Manejo sencillo
- Tiempo de respuesta corto
- Respuesta selectiva a algunos analitos

El sistema para el tratamiento de datos es indispensable en un HPLC ya que a partir de este sistema se registran los cambios en alguna propiedad en función del tiempo, la representación gráfica de estos registros se le conoce como Cromatograma (Fig. 20) donde aparece una serie de picos simétricos sobre los ejes de los tiempos para la identificación cuantitativa (área de pico) y cualitativa (posición en el eje del tiempo) de los componentes de una muestra.

Tabla 9. Detectores para HPLC.⁵⁴

Tipo	Analito	Disolvente	Comentarios
Índice de refracción	Compuestos con índice de refracción diferente a la fase móvil	No pueden realizarse gradientes	Universal pero de baja sensibilidad
UV- Vis	Cualquiera con grupos cromóforos	No valido para disolventes que absorban en el UV	Selectivo y útil para numerosas aplicaciones en HPLC
Fluorescencia	Compuestos Fluorescentes	No valido para disolventes que absorban en el UV	Altamente selectivo y sensible, a veces requiere procesos de derivatización
Electroquímico	Compuestos oxidables o reducibles	La fase móvil debe ser conductora	Muy selectivo y de alta sensibilidad.

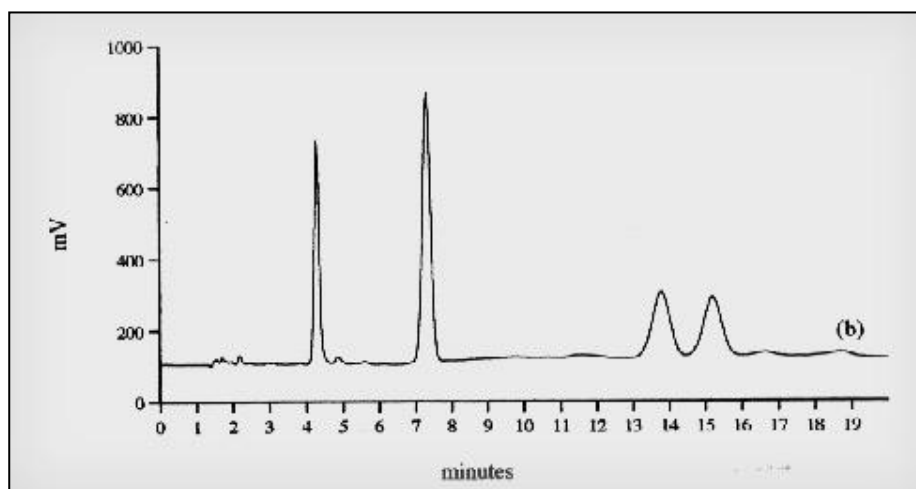


Figura 20. Representación gráfica (Cromatograma) de los datos obtenidos en un análisis por HPLC (Tomado de *Instrumental Methods of Analysis*)⁵⁰

- Parámetros Cromatográficos

A partir de los cromatogramas se pueden obtener parámetros cromatográficos que pueden ser críticos al momento de modificar o mejorar las condiciones para obtener una respuesta analítica más confiable y así garantizar que la cuantificación del analito sea adecuada.

Parámetros de retención: Brindan información acerca de la distribución del analito entre las dos fases (Fig. 21)

- Tiempo de retención (t_R): tiempo transcurrido al momento de eluir el máximo de concentración del analito.^{54, 55}
- Tiempo muerto (t_0): tiempo requerido para que la fase móvil atraviese la columna sin retención.⁵⁴
- Tiempo de retención corregido (t_R'): tiempo registrado desde la aparición del pico máximo de la especie no retenida hasta el máximo del compuesto eluido.⁴⁵
- Volumen de retención (V_R): volumen de la fase móvil gastado al momento de eluir el máximo de concentración del soluto.⁵⁴

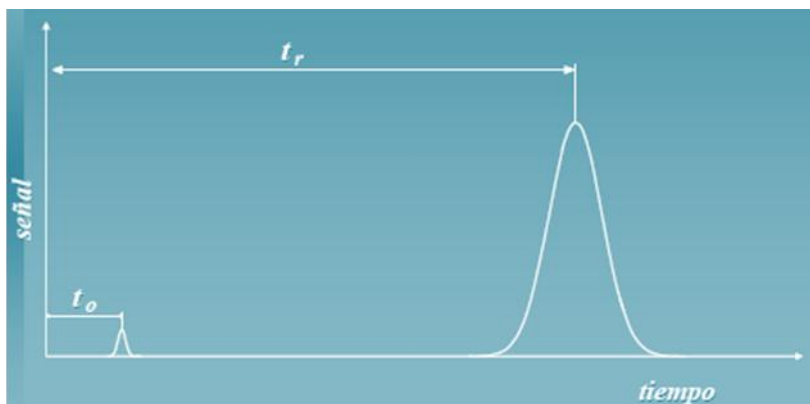


Figura 21. Cromatograma que identifica algunos parámetros de retención t_R y t_0 (Tomado de www.ibt.unam.mx)⁴⁸

- Factor de capacidad (k'): es el cociente de la cantidad de soluto en la fase estacionaria entre la cantidad de fase móvil; indica la mayor o menor retención de un componente por parte de la columna, es un valor constante y característico de cada analito.⁵⁵

Si $k' < 1$ elución muy rápida

Si $k' > 20$ elución muy lenta

Si $1 < k' < 5$ intervalo útil

- Factor de selectividad (α): Medida de la ausencia de interferencia de un método que se mide ante el cociente de selectividad del mismo. Se define para dos componentes e indica la separación que hay entre dos máximos. Para garantizar una buena separación α debe ser mayor a 1. ⁵⁵

Parámetros de eficiencia: Estos se refieren a la teoría del plato cromatográfico propuesta por A. J. P. Martin y R. L. M. Synge en 1941; que consiste en imaginar que en la columna tienen lugar equilibrios sucesivos de reparto en contracorriente por parte del soluto entre las dos fases. La columna se divide en N estratos imaginarios llamados platos teóricos. ⁵⁷

Un plato teórico se puede definir como un medio cuantitativo para evaluar la eficacia de una columna y que consiste en tratar una columna en la que tiene lugar el reparto entre las fases móvil y estacionaria. ⁴⁰

Entre cada plato teórico se define un espacio llamado altura de plato teórico (H) que es también un parámetro de eficiencia de una columna cromatográfica (Fig. 23). Ambos parámetros están relacionados y son inversamente proporcionales, a mayor número de N menor es H (Ec. 8) ⁴⁰

$$H = L / N \dots\dots(\text{Ec.8})$$

Donde L se refiere al largo de la columna cromatográfica.

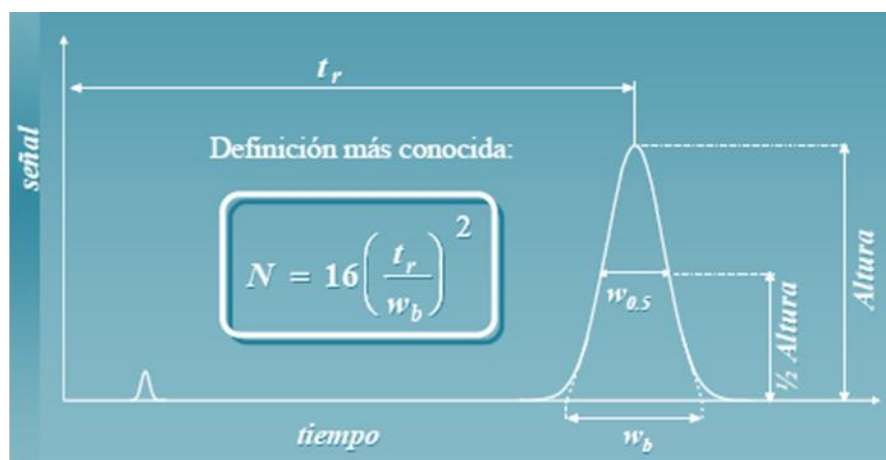


Figura 22. Cromatograma que muestra los factores que modifican la eficiencia de una columna cromatográfica. (Tomado de www.ibt.unam.mx) ⁴⁸

El número de platos teóricos depende a su vez de dos factores: el tiempo de retención y del ancho de la base del pico cromatográfico (w_b). El ancho de base suele ser el intervalo de longitud de frecuencia de un pico. También puede ser definido en función del ancho de la mitad de la altura de pico ($w_{1/2}$ o $w_{0.5}$) que es una medida más reproducible y adecuada para evaluar la eficiencia del sistema. ⁵⁵

En conclusión a estos dos parámetros, a mayor N mayor será la eficiencia de una columna cromatográfica, mientras que a menor altura de pico la eficiencia se verá mejorada.

Otros parámetros Cromatográficos son:

- Resolución (R_s). Este parámetro se refiere al grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos dividida entre el ancho promedio de las bandas. Tres son los factores que influyen en la resolución (Fig. 23).⁴⁷
- Retención: Si los solutos no se retienen no hay separación y al aumentar la retención la separación se ve aumentada. Pero si los solutos se retienen demasiado, sólo se retrasara el análisis sin mejorar la separación⁵⁶

$$R_s = \underbrace{\left[\frac{k'}{1+k'} \right]}_{\text{retención}} \underbrace{\left[\frac{\alpha-1}{a} \right]}_{\text{selectividad}} \underbrace{\left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right]}_{\text{eficiencia}}$$

Figura 23. Ecuación de resolución en función de los tres factores que influyen en su valor (Tomado de www.ibt.unam.mx)⁴⁸

Selectividad: A mayor selectividad mejora la separación. Eficiencia: A mayor número de platos teóricos, mejor es la separación.⁵⁶

Para el análisis cuantitativo es deseable alcanzar la resolución de al menos igual 1.5; la separación de la línea base hace que los sistemas de datos midan el tamaño de cada banda apropiadamente y esto significa una cuantificación fiable. Una resolución pobre puede deberse a que el método utilizado no es apropiado, pues no discrimina entre los solutos o que hay mucha muestra en proporción a la columna cromatográfica.⁵⁶

7. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICAR EL CAPTOPRIL EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, la molécula del Captopril tiene una baja absorción en el espectro UV-Vis debido a que no presenta grupos cromóforos fuertes, es por eso que la mayoría de los métodos reportados en la cuantificación del Captopril se describen técnicas de derivatización que tiene como objetivo introducir en la molécula del Captopril un grupo cromóforo o fluoróforo que le dé a la molécula la capacidad de absorber mejor en el espectro UV.⁵⁷

7.1 Procedimiento según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se presenta la monografía del Captopril (tabletas) la cual indica que el contenido del Captopril debe estar en no menos del 90 % y no más del 110% de lo indicado en el marbete.

La metodología de valoración indicada en esta monografía es una técnica cromatográfica (HPLC) donde la fase móvil es una mezcla de metanol: agua (55:45). Para realizar el análisis se utiliza una sustancia de referencia la cual se prepara de la siguiente forma:⁵⁹

- Solución stock de Estándar del Captopril (2 mg/mL) (Soln. A)

Pesar 20 mg de estándar de referencia de Captopril, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL Disolver y llevar al aforo con fase móvil

- Solución stock de Estándar de disulfuro de Captopril (0.5 mg/mL) (Soln. B)

Pesar 5 mg de estándar de referencia de disulfuro de Captopril
Disolver y a la marca de foro con fase móvil

Tomar 5 mL de la solución A y 1 mL de la solución B en un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con fase móvil.

- Solución problema (muestra)

Para la preparación de la muestra se pesan no menos de 20 tabletas y se obtiene su peso promedio. Después se trituran hasta obtener un polvo fino.

Pesar una cantidad de polvo fino equivalente a 100 mg de Captopril, llevar a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 80 mL de fase móvil, someter a un baño de ultrasonido por 15 min. Llevar a la marca de aforo con ase móvil.

El equipo de cromatografía debe estar acoplado a un detector UV-vis y las lecturas se realizan a 220 nm. Con una columna de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro y un flujo de 1 mL/min.

Para realizar el análisis de bebe de inyectar al sistema cromatográfico alícuotas de 20 μL de la preparación de referencia, ajustar los parámetros de operación e identificar los picos de respuesta para el estándar del Captopril y del disulfuro de Captopril cuyo factor de resolución debe ser mayor a 2.0, mientras que el coeficiente de variación no debe ser mayor del 2.0%.

Una vez ajustados los parámetros de operación se deben inyectar varios volúmenes iguales de muestra (20 μL) así como también volúmenes de la solución de estándares, por separado. Ajustar los parámetros de operación y registrar las áreas de los picos respuesta; El factor de resolución entre los picos del Captopril y disulfuro de Captopril no es menos de 2%. El tiempo de retención relativo del Captopril es de 0.5 y 1.0 para disulfuro de Captopril. La cantidad de $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ en una porción de muestra tomada se calcula según la fórmula siguiente:

$$CD (A_m/A_{ref})$$

Dónde:

C = cantidad de Captopril en la preparación de referencia

D = factor de dilución de la muestra

A_m = área obtenida en el cromatograma con la preparación de la muestra

A_{ref} = área obtenida en el cromatograma con la preparación de referencia

7.2 Procedimiento según la Farmacopea de Estados Unidos

Dentro de las monografías descritas en USP, por sus siglas en ingles, se encuentra la monografía del Captopril donde se describe la técnica utilizada para su cuantificación así como para sus productos de degradación. La cuantificación se realiza en HPLC en fase reversa por medio del uso de un detector fotométrico usando una longitud de onda baja para su lectura (220nm). Esta técnica no es muy recomendable ya que hay altas probabilidades de que existan interferencias en la lectura debido a contaminación por excipientes.⁶⁰

El contenido del Captopril puede ser determinado ya sea en forma de materia prima o en una forma farmacéutica (tabletas). Para la primer forma el Captopril debe estar presente como mínimo en un 97.5% y como máximo 102.0 % en base seca. Para tabletas el contenido del Captopril no debe ser menor al 90% y no mayor a 110% de lo que indica el marbete.

La fase móvil es una mezcla de una solución de tetrahidrofurano en metanol y ácido fosfórico en agua (33:67). La solución de resolución se prepara con estándar de Captopril, un estándar de disulfuro de Captopril y con ácido 3-tioacel-2-metilpropanoico en metanol para obtener una solución stock que contenga 0.1 mg de cada reactivo por mL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La solución estándar se preparó con reactivo estándar de disulfuro de Captopril en metanol de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La solución problema se prepara pesando una cantidad equivalente de 50 mg de Captopril en un matraz volumétrico de 25 mL llevando a la marca de aforo con metanol.

El sistema cromatográfico presenta las siguientes características:

- Equipo: HPLC
- Detector ajustado a 220 nm
- Columna de 3.9 mm de diámetro y 30 cm de longitud
- Flujo de 1 mL/min

El cromatograma de la solución de resolución (inyección 20 μ L) debe mostrar los tiempos de retención relativos siguientes:

- Captopril 0.32
- Ácido 3-tioacil-2-metilpropanoico 0.42
- Disulfuro de Captopril 1.0

Para la cuantificación se usa como factor respuesta las áreas de pico, se inyectan volúmenes iguales de la solución estándar y de la solución problema (20 μ L). El porcentaje de disulfuro de Captopril en proporción de Captopril es calculado a partir de la fórmula siguiente:

$$100 (C_s / C_u)(r_u / r_s)$$

Dónde:

C_s es la concentración del estándar de disulfuro de Captopril (μ g/mL) en la solución estándar.

C_u es la concentración de Captopril (μ g/mL) en la solución problema.

r_u y r_s se refieren al área de pico del estándar de disulfuro de Captopril de la solución estándar y al área de pico de Captopril de la solución problema respectivamente.

7.3 Procedimientos no oficiales

Además de los métodos oficiales citados anteriormente existen métodos adicionales que permiten realizar una determinación más confiable y precisa. Estos métodos usan detectores más especializados así como reactivos y reacciones de derivatización que mejoran la cuantificación de los analitos. Una de estas novedosas técnicas es la que reporta Tahsee Mirza y Henry S.I. Tan en el Journal of pharmaceutical and biomedical analysis⁵⁷; donde la cuantificación del Captopril (tabletas) se realiza en un equipo de HPLC por intercambio iónico, usando una detección fotométrica indirecta.

El método fue plateado como una alternativa al método propuesto en la monografía del Captopril por la USP, ya que se presenta de forma más sencilla y efectiva para la cuantificación de este fármaco.

El equipo utilizado es un HPLC Hitachi modelo 655A-40 autosampler con capacidad de inyección desde 100 µL, este equipo está acoplado a un detector ABI Spectraflow modelo 77 de longitud de onda variable. La columna utilizada fue una columna de intercambio iónico (baja capacidad) Vydac[®] de 46 x 250 mm, con tamaño de partícula de 10 µm. La columna analítica fue utilizada con una temperatura de 45°C.

La fase móvil está formada por una solución amortiguadora de biftalato ácido de potasio 0.1M, metanol y agua (25:150:825), ajustando el pH de la solución a 6.0 con NaOH 0.1 M. esta fase móvil debe pasar por un filtro de membrana de nylon 0.45µm y desgasificada al vacío antes de ser usada. El flujo debe ser ajustado a 1.0 mL/min y los eluyentes deben ser monitoreados a 280 nm.

Como estándar interno se utilizó una solución stock de ácido succínico (SA) de 1.8 mg/mL en agua. La solución stock de estándar del Captopril también fue preparada en agua a una concentración de 5 mg/mL. Se preparó un placebo que contenía la matriz de la tableta (excipientes) de acuerdo a la Tabla 10.

Tabla 10. Composición del placebo de tableta para estudios de recuperación del Captopril⁵⁷

Componente	%	g
Celulosa microcristalina NF (avicel pH 102)	35.0	7.0
Lactosa monohidratada NF	27.5	5
Ácido esteárico	0.025	0.05
Amarillo No. 10 tipo D y C	0.01	0.02
Almidón pre-gelatinizado (almidón 1500)	5.0	1.0
Almidón	5.0	1.0

Con la solución stock de Captopril y la solución stock de SA se preparó una solución estándar (50 mL) donde la concentración final de Captopril es de 1.0 mg/mL y de SA de 0.36 mg/mL. La preparación de la muestra depende del tipo de estudio a realizar:

- Para estudios de recuperación

Se tomaron tres volúmenes diferentes de la solución stock de Captopril (7,10 y 13 mL) fueron llevados a un volumen final de 50 mL, cada una de estas disoluciones contenía 190 mg del placebo de matriz de tableta y 10 mL de la solución stock de SA.

- Para productos comerciales

Para este caso se utilizaron dos productos comerciales A y B. Se tomaron muestras de 20 tabletas para cada producto, después de tomar el peso se procedió a triturar y pesar la cantidad necesaria de polvo de tableta para preparar una solución de 1.0 mg /mL de Captopril con 10 mL de la solución stock de SA. Ambas muestras fueron filtradas y sonicadas por 10 minutos.

Para ambos estudios el volumen de inyección en el sistema cromatográfico fue de 25 μ L, tanto de la muestra como para la solución estándar. La cuantificación se realizó comparando las áreas de pico de la muestra con la del estándar (Área de pico Captopril/Área de pico SA).

En la optimización del método se utilizó un sistema factorial donde variaron tres condiciones, debido a que fueron identificadas como variables críticas del sistema (Tabla 11):

- La concentración de la solución de biftalato ácido de potasio (KHP)
- % de la fase orgánica de eluyente
- La temperatura de la columna

Tabla 11. Niveles de concentración de las tres variables para la optimización del estudio ⁵⁷

Nivel		1	0	-1
A	KHP (M)	1	1.8	2.5
B	Metanol (%)	15	20	25
C	Temperatura de la columna (°C)	40	45	50

- Validación del método

La validación se realizó determinando:

- Exactitud

Este parámetro fue determinado por medio del ensayo con la solución de placebo de la matriz del Captopril, conociendo la concentración y el % de recuperación del Captopril.

- Precisión

Este parámetro se evaluó a partir de la Repetibilidad del método analítico (% RSD) por medio del % de recuperación de tres concentraciones diferentes del Captopril por triplicado (n=12). También se calculó la Repetibilidad de la inyección usando como parámetro el área de pico del Captopril.

- Linealidad

La linealidad del método se determinó aplicando una técnica de regresión al rango de áreas de pico de las soluciones de estándar del Captopril contra la concentración de Captopril inyectada. Las respuestas fueron de dos diferentes días en un rango de concentración entre 5 a 50 µg del Captopril inyectado, donde la ecuación que describe al método es la siguiente:

$$\text{Área} = 0.03850 (C_{\text{Capto}}) - 0.02350$$

Donde C_{Capto} se refiere a la cantidad del Captopril en el sistema (µg) y A es el área de pico; con una $r^2 = 0.9990$.

- Especificidad

Este parámetro fue calculado por medio de la cuantificación del Captopril en presencia de sus productos de degradación, precursores, excipientes y otras impurezas conocidas. Se inyectó cada una de estas sustancias (por separado), donde el cromatograma obtenido mostro que el método es específico y estable ya que la resolución entre todos los picos obtenidos fue mayor a 1.5.

- Robustez

Este parámetro fue evaluado calculando la linealidad del método al cambiar condiciones en el sistema por ejemplo el pH del buffer (5.9 y 6.1), el % de la fase orgánica, el flujo de la fase móvil y la temperatura de la columna. Donde se obtuvo que la linealidad del método no fue afectada por pequeños cambios por lo que el método es robusto.

Tabla 12. Comparación del método con el reportado por la USP para la cuantificación en productos comerciales⁵⁷

Concentración declarada del producto (mg)	Producto A		Producto B	
	(mg)			
	Método USP	Método	Método USP	Método
12.5	12.3 +/- 0.1	12.6 +/- 0.2	12.2 +/- 0.03	12.3 +/- 0.1
25	23.4 +/- 0.2	23.8 +/- 0.2	24.5 +/- 0.1	24.4 +/- 0.3
50	50.0 +/- 0.1	50.0 +/- 0.5	48.9 +/- 0.2	49.9 +/- 0.4
100	N/A	N/A	99.4 +/- 0.4	99.6 +/- 0.5

Otra técnica de cuantificación del Captopril en formas farmacéuticas es la que reporta Hernández Martínez A. en su tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga⁶¹ donde se aplica la técnica de electroforesis capilar para determinar de forma simultánea Captopril e Hidroclorotiazida.

El equipo de electroforesis capilar utilizado fue un modelo P/ACETM MQD (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) acoplado a un detector uv-vis de arreglo de diodos. Para realizar la optimización del método se realizó el análisis con las condiciones siguiente:

Donde las condiciones finales del método fueron:

- Longitud del capilar

Capilar de sílice fundida de 20 cm de longitud y 50 µm de diámetro interno, colocado a 10 cm de distancia al detector.

- Tipo y concentración de la solución amortiguadora

Solución amortiguadora de boratos 50 mM con un pH de 8.5 que fue preparada partir de ácido bórico reactivo analítico en agua desionizada, ajustando el pH con NaOH 0.1 M.

- Temperatura del capilar de 25 °C
- Pasos del método (lavados y tiempo entre corridas electroforéticas) y acondicionamiento del capilar

El método diseñado en el Software KARAT:

LAVADO

- Lavar el capilar con NaOH 0.1 M por 5 min a 20 psi de presión
- Lavar con agua desionizada por 5 min a 20 psi de presión
- Equilibrar el capilar aplicando un lavado con solución amortiguadora de boratos por 5 min

MEDICIÓN

- Lavado con solución amortiguadora de corrida por 1 min a 20 psi
- Inyección de la muestra con presión por 0.5 seg a 0.5 psi
- Separación de la muestra por 1 min a 30 kv
- Longitud de onda de detección a 214 nm

Otra parte importante de este estudio es el tratamiento de la muestra, que para su adecuada cuantificación se preparó una solución estándar del Captopril (500 ppm) e Hidroclorotiazida (250 ppm).

La solución problema se preparó pesando de 3 a 5 tabletas de una muestra comercial (Capozide), después de obtener el peso promedio por tableta se llevó a triturar y pesar lo equivalente de polvo de tableta a 50 mg del Captopril para preparar una solución de 100 mL.

Para la cuantificación de estos dos principios activos se preparó una curva de calibración directa sin dilución como se indica en la Tabla 13. Para obtener los electroforegramas se mide cada sistema preparado de la curva de calibración iniciando con el de menor concentración.

Tabla 13. Preparación de la curva de calibración del Captopril e Hidroclorotiazida para la cuantificación por EC. ⁶¹

SISTEMAS	1	2	3	4	5	6	PROBLEMA
Solución estándar (mL)	1	2	3	4	5	6	0
Solución problema (mL)	0	0	0	0	0	0	4
Volumen final (mL)	25						

En la curva de calibración (Fig. 25) cada sistema se inyectó por triplicado y los parámetros evaluados en el cromatograma fueron tiempo de migración y área de pico (Tabla 14). El objetivo de este proyecto fue el validar la metodología de cuantificación, que al igual que el método planteado por HPLC se evaluó linealidad, precisión, exactitud, especificidad y adecuabilidad tanto del método como del sistema. La ecuación que describe la curva de calibración para el Captopril es:

$$\text{Área} = 59.055 (C_{\text{capto}}) - 365.78$$

Con una $r^2 = 0.9903$

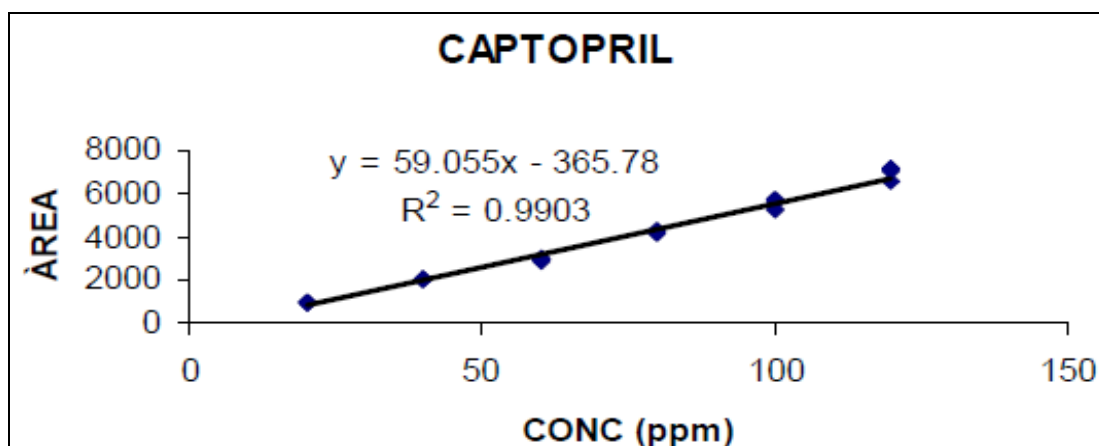


Figura 24. Curva de calibración del Captopril ⁶¹

Al final el método resultó adecuado para la determinación, no sólo del Captopril, también para Hidroclorotiazida en formulaciones farmacéuticas (tabletas) demostrando que cumple con los parámetros de desempeño estudiados con lo que demuestra ser un método confiable para la determinación de estos principios activos.

Una técnica innovadora para la cuantificación de concentraciones pequeñas del Captopril, por medio de una técnica de pre-concentración en línea, fue desarrollada por Sánchez Buenfil Priscila ⁷⁴ considerando que las muestras a cuantificar provenían de una muestra biológica con bajas concentraciones presentes del Captopril por lo cual fue necesario desarrollar un método de pre-concentración para así poder ser detectado para su posterior cuantificación.

Método de Pre-Concentración En Línea

En nombre del método es LVSS (Large Volume Sample Stacking), se refiere a un método de pre-concentración el cual consiste en aplicar una diferencia de voltaje (Fig. 26):

Inyectar de forma normal (de positivo a negativo)

Aplicar después un voltaje reverso (sentido contrario) de negativo a positivo para concentrar al analito

Correr de forma normal (como en el punto uno), obteniéndose una señal mayor debido a la pre concentración

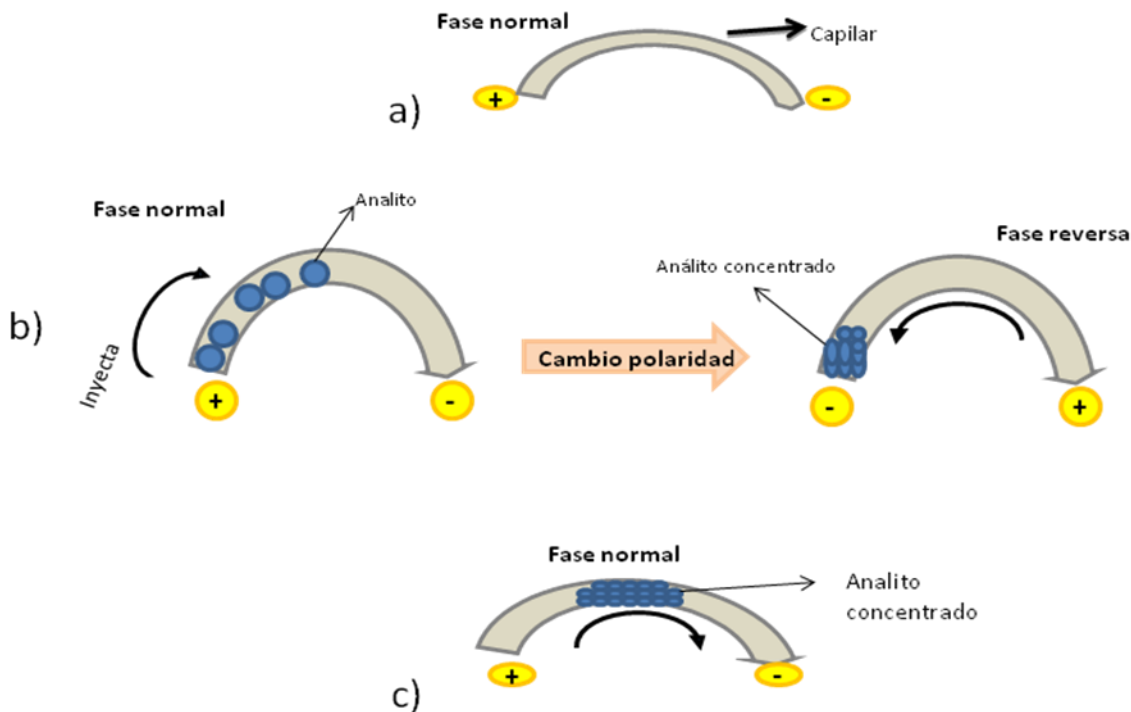


Figura 25. Esquematización del método de pre concentración en línea

Tabla 14. Resultados de la curva de calibración para el Captopril⁶¹

Concentración (ppm)	Área	Tm
	1003	0.724
10	973	0.724
	999	0.724
	2083	0.724
20	2018	0.738
	2003	0.738
	2972	0.724
30	2919	0.724
	2936	0.738
	4137	0.724
40	4273	0.724
	4229	0.724
	5676	0.724
50	5556	0.724
	5273	0.724
	7002	0.779
60	7163	0.779
	6610	0.762
	Promedio	0.746
	Desv. Est.	0.013
	C.V (%)	1.72

Al aplicar un cambio de voltaje se forma una pastilla (concentrado) de moléculas del Captopril, que al momento de pasar por el detector darán una mayor respuesta que si corrieran de forma normal.

Condiciones electroforéticas⁷⁴

- Equipo: Electroforesis Capilar P/ACE MDQ BeckmanCoulter
- Capilar: sílice fundida de 30 cm de longitud
- Inyección: hidrodinámica a 0.5 psi de presión
- Medio: Solución amortiguadora de Boratos 20 mM y pH 8.5.

Soluciones⁷⁴

- Solución de NaOH 0.1N.
- Solución amortiguadora de Boratos 20mM pH=8.5.
- Solución amortiguadora de Boratos 2mM pH=8.5 (solución de aforo para los sistemas del Captopril).
- Solución Stock del Captopril 50 µg/mL.

- Solución de Ácido-3,5-di-nitro-benzoico 100 μ g/mL (estándar interno)

Tabla 15. Preparación de los sistemas para la curva de calibración. ⁷⁴

SISTEMAS	1	2	3	4	5	6	7
Concentración (μ g/mL)	0.4	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	12
Stock Captopril 50 μ g/mL (mL)	0.2	0.6	1.2	1.8	2.4	3	6
Ácido 3,5-dinitro benzoico 100 μ g/mL.	250 μ L						
Vol. Aforo	25 MI						
Soln. amortiguadora de Boratos 2mM	25 MI						

TIME	EVENT	VALUE	DURATION	INTERVAL	OUTLETVIAL	SUMMARY
	Rinse-Pressure	20.0 psi	2.00min	B1:C1	BO:B1	Forward
	Rinse-Pressure	20.0 psi	1.00min	B1:D1	BO:B1	Forward
	Rinse-Pressure	20.0 psi	2.00min	B1:A2	BO:B1	Forward
	Inject-Pressure	0.5 psi	25sec	S1:A1	BO:A2	Override, Forward
	Separate-voltage	20 kv	0.30min	B1:B2	BO:A2	0.17Minramp, reverse polarity
6.00	Separate-voltage	20 kv	6.00min	B1:B2	BO:A2	0.17Minramp, reverse polarity
6.00min	end					

Figura 26. Características del método para la determinación del Captopril por LVSS. ⁷⁴

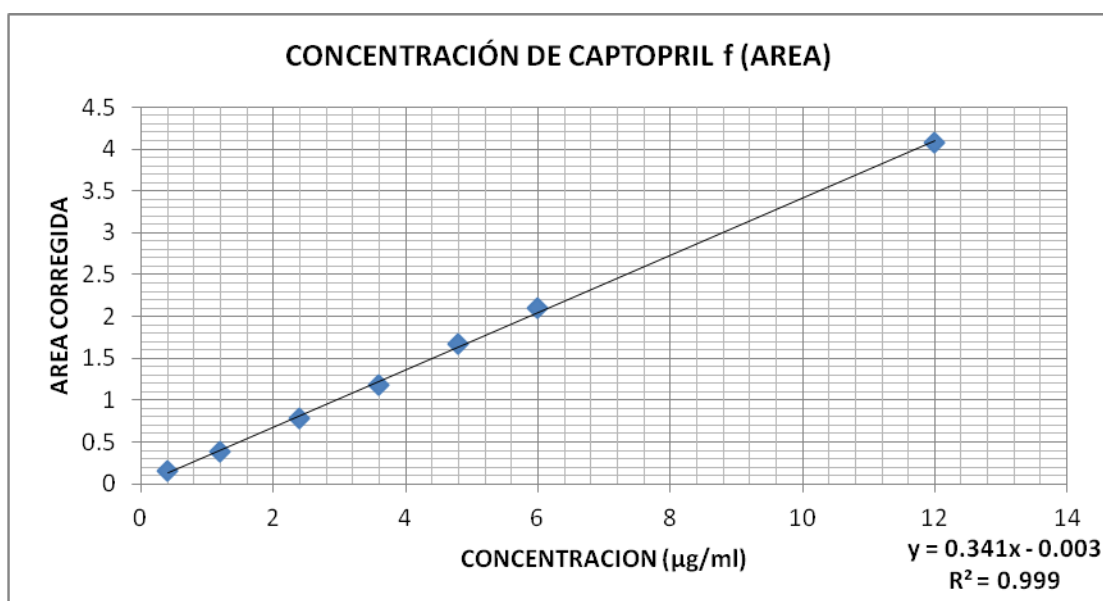


Figura 27. Curva de calibración del Captopril. ⁷⁴

El método anterior permite cuantificar concentraciones muy bajas del analito a partir de 0.4 µg/mL que pudieran estar presentes en sistemas biológicos como muestras sanguíneas así como concentraciones mayores (12 µg/mL) que pudieran presentarse en muestras farmacéuticas. Con el método de pre-concentración en línea (LVSS) por Electroforesis Capilar en zona se obtiene un incremento en la respuesta del 421.78 % más que la que se obtendría por el método convencional. Existen otras dos variantes para la cuantificación del Captopril por EC cuando la matriz es una solución (Tabla 16).

Tabla 16. Métodos alternos para la Cuantificación del Captopril por EC. ⁶²

Características	Método A ⁶³	Método B ⁶⁴
Capilar	Sílice fundida con 57 cm de longitud y 75 µm de diámetro, localizado a 50 cm del detector	Sílice fundida con 57 cm de longitud y 50 µm de diámetro, localizado a 50 cm del detector
Preparación del Capilar	Antes de cada corrida lavar el capilar con una solución de NaOH 100 mM y con solución amortiguadora.	-
Temperatura del capilar	30 °C	-
Soln. Amortiguadora	Sol. amortiguadora de boratos 100 mM pH 8.1 con dodecilsulfato de sodio 50 mM (15:85) en acetona. Sol. amortiguadora de boratos 50 mM pH 8.2 con dodecilsulfato de sodio 100 mM (15:85) en acetona.	Sol. amortiguadora de boratos 50 mM pH 8.0 con taurodeoxicolato de sodio 40 mM y fosfatidilcolina 25 mM.
Inyección	Por presión de 5 a 10 s.	Inyectar una solución del compuesto en la Sol. Amortiguadora por presión a 20 psi por 1 s, inyectar una mezcla de MeOH-Agua (5:95) a 20 psi por 1 s, inyectar una solución de halofantrina en Sol. amortiguadora a 20 psi por 1 s.
Detección	UV a 200 nm	UV a 214 nm
Voltaje	25 kV	-
Modelo del equipo	Beckman P/ACE 5510	Beckman P/ACE 5510

8. METODOLOGÍAS PARA CUANTIFICAR EL CAPTOPRIL EN MUESTRAS SANGUÍNEAS

El desarrollo de metodologías para determinar fármacos en muestras biológicas es de gran importancia para la farmacología ya que a partir de estos métodos se puede realizar la monitorización de fármacos, un ejemplo es la monitorización de los niveles plasmáticos y/o séricos para determinar procesos farmacocinéticos de un nuevo principio activo así como realizar estudios de bioequivalencia con fármacos de referencia. A continuación se describen algunas técnicas para la cuantificación del Captopril en plasma y suero por medio de dos técnicas (EC y HPLC) donde podremos observar diferencias, similitudes ventajas y desventajas de cada una de las técnicas de cuantificación.

8.1 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

HPLC está lejos de ser un método de elección para la determinación del Captopril en sangre, plasma y orina, sin embargo, los niveles de concentración bajo y la sensibilidad relativa del Captopril a la oxidación determina que los métodos de HPLC sigan tres direcciones diferentes:

- a) El uso de detección electroquímica sin el uso de un agente de derivatización
- b) El uso de detección UV o fluorescencia del producto de derivatización del Captopril
- c) El uso de técnicas de pre-concentración como extracción líquido-líquido o el uso de multicolumnas

El Captopril tiene una limitada estabilidad en fluidos biológicos porque el grupo tiol es fácilmente oxidado a un dímero de disulfuro. Es por eso que para medir las concentraciones del Captopril se debe añadir un estabilizador químico a las muestras biológicas para evitar la formación de los disulfuros. El uso de un agente de derivatización aparte de prevenir la oxidación del grupo tiol también aumenta la absorción del Captopril en el espectro UV-Vis.⁶⁵

La mayoría de los métodos a continuación descritos se basan en el método desarrollado en 1981 por Kawahara y col donde la concentración libre del Captopril en sangre es determinada por reacción con p-bromofenacilo (p-BPB) que es utilizado como un agente de derivatización estabilizador del grupo tiol del Captopril.⁶⁶

C. Richer en 1984 retoma este método para realizar la determinación de la farmacocinética del Captopril así como sus efectos biológicos y antihipertensivos en pacientes hipertensos. En el método analítico se basó en la determinación del Captopril a partir de muestras de sangre venosa.

- Condiciones cromatográficas⁶⁷

Equipo: HPLC (Waters)
Columna: C-18 μ Bondapak
Flujo: 1 ml/min

Detector: Waters 480, con lectura a 254 nm.

- Tratamiento de la muestra ⁶⁷

Las muestras de sangre venosa (10 mL) fueron agregadas a un tubo con 30 mg de p-BPB para su posterior agitación (5 min) y reposo a temperatura ambiente por 15 min. El objetivo de este paso fue dar el tiempo necesario para que el Captopril libre fuera atrapado por el agente de derivatización. Pasado este tiempo la muestra fue centrifugada por 5 min a 2500 rpm para obtener como muestra final suero.

El estándar interno (SI) utilizado fue Ácido Tiosalicílico, donde 250 mg de este fueron derivatizados con 500 mg de p-BPB en un volumen de 100 mL de acetona.

Para la determinación del Captopril se adiciono 150 µL de SI a 3 mL de suero para su posterior extracción, donde el residuo final es disuelto en 100 µL de fase móvil (acetonitrilo-agua-ácido acético 55:44.5:0.5), el volumen de inyección en el sistema cromatográfico fue de 20 µL. El intervalo de concentración donde la respuesta tiene un comportamiento lineal y confiable es 20 ng/mL a 2.5 µg/mL.

Otro método para la cuantificación del Captopril con fines farmacocinéticos se desarrolló en 1996 por C. Arroyo y col donde describen un método de cuantificación por medio de HPLC para la determinación del Captopril libre en muestras plasmáticas por medio de una detección de fluorescencia. ⁶⁵

- Condiciones cromatográficas ⁶⁵

Equipo: Waters Milford, MA, USA.

Columna: Nova-Pack C18 con una longitud de 150 mm, diámetro interno de 3.9 mm y tamaño de partícula de 4 µm.

Fase móvil: acetonitrilo - ácido acético pH 2.30 (42:38 v/v)

Flujo: 1.5 mL/min

Detector: Fluorescencia de longitud de onda variable. Longitud de onda mínima de 340 nm y longitud de onda máxima de 389 nm.

- Soluciones estándar ⁶⁵

Stock del Captopril: esta solución fue preparada por día que es requerida en medio acuoso con una concentración de 1 mg/mL.

Estándares plasmáticos: a partir del stock del Captopril se prepararon estándares en medio plasmático libre con concentraciones de 25, 75, 150, 300, y 600 ng/mL

Stock de estándar interno: N-acetil-L-cisteína (NAC) concentración de 12.75 µg/mL en metanol.

Stock agente de derivatización: N-(1-Pirenil) maleimida (NPM) concentración de 1 mg/mL en acetonitrilo.

- Tratamiento de la muestra ⁶⁵

Las muestras de sangre venosa (5 mL) es tomada con un tubo vacutainer heparinizado con 250 μ L de EDTA 0.2 M y ácido ascórbico 0.2 M (50:50). La muestra es centrifugada a 2500 rpm por 10 min a 4 °C.

Después de separar el plasma de las muestras, se toman 150 μ L y se adiciona a un tubo que contiene 600 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0) y 90 μ L del agente de derivatización NPM, también se adicionan 10 μ L de una solución de estándar interno NAC.

La combinación de estos reactivos es cuidadosamente mezclada por algunos segundos después se deja reposar a temperatura ambiente protegida de la luz por 20 minutos para completar el proceso de derivatización. El aducto de Captopril resultante es estabilizado agregando 30 μ L de HCl (11 M) para su posterior lectura se conserva en congelación a – 40 °C.

- Extracción ⁶⁵

Para realizar la extracción se agregó a las muestras tratadas acetato de etilo (1.5 mL) agitando por 5 minutos y llevando a centrifugar por 5 minutos a 3 rpm, la fase orgánica es evaporada por secado bajo una corriente de nitrógeno para después ser reconstituida en 150 μ L de metanol y después inyectar al sistema cromatográfico 2 μ L de muestra reconstituida.

- Variables analíticas ⁶⁵

El método analítico usado para la determinación del Captopril fue una curva de calibración donde cada sistema de la curva fue inyectado por sextuplicado en tres diferentes días con el fin de validar la metodología.

La linealidad de método fue estimada en un rango de concentraciones de 25 a 600 ng/mL con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9915. El límite de detección para el Captopril fue de 10 ng/mL y el límite de cuantificación de 25 ng/mL (Fig. 28).

Concentration added (ng/ml)	Concentration found (mean \pm S.D.) (ng/ml)	C.V. (%)	Accuracy (%)
<i>Intra-assay (n=6)</i>			
25	30.86 \pm 4.72	15.31	23.44
75	69.21 \pm 10.80	15.61	-7.72
150	151.43 \pm 17.70	11.69	0.95
300	303.82 \pm 11.94	3.93	1.27
600	594.17 \pm 48.82	8.18	-0.97
<i>Inter-assay (n=18)</i>			
25	29.05 \pm 5.45	18.76	16.20
75	71.94 \pm 7.89	10.97	-4.08
150	152.93 \pm 13.13	8.59	1.95
300	295.04 \pm 15.38	5.21	-1.69
600	598 \pm 38.44	6.42	-0.18

S.D.=standard deviation, C.V.=coefficient of variation.

Figura 28. Parámetros de validación para la curva de calibración del Captopril en plasma (Tomado de Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications)⁶⁵

Este artículo nos describe un método por HPLC en fase reversa sensitivo, específico, rápido y robusto con detección en fluorescencia para la determinación del Captopril en humanos usando volúmenes pequeños de plasma.

En 1999 M. Ammini y colaboradores propusieron una nueva metodología para la cuantificación del Captopril por HPLC en muestras plasmáticas donde se propone un nuevo agente de derivatización que mejore la absorción en el espectro UV-Vis. El método es una curva de calibración con una respuesta lineal de 12.5 a 500 ng/mL.⁶⁸

Este método está basado en una extracción y derivatización usando un nuevo reactivo de derivatización, 2-bromo-2'-acetonaftona, selectivo y sensitivo para la determinación del Captopril en plasma.

- Condiciones cromatográficas

Equipo: sistema Waters HPLC

Columna: μ Bondapak NH₂ con tamaño de partícula de 10 μ m, longitud de 150 mm y diámetro interno de 3.9 mm.

Detector: Uv-Vis modelo 486. Ajustado a una longitud de onda de 246 nm

Fase móvil: n-hexano-2-propanol-metanol-ácido acético.

Flujo: isocrático de 2 mL/min.

- Estándar interno

El reactivo utilizado como estándar interno para la cuantificación del Captopril es ácido dinitrobenzoico. Se prepara una solución de concentración 625 ng/mL en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con pH de 7.0.

- Aducto 2-captopril-2'-acetonafona (Fig. 29) ⁶⁸

Se adicionan 0.8g del Captopril y 1.3g de 2-bromo-2'-acetonafona y 0.8g de trietilamina en 100 mL de metanol. Después de mezclar se deja reposar a temperatura ambiente por 1 hora para después evaporar por secado a vacío.

El residuo es reconstituido en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 (0.05 M) para después ser lavado dos veces con 20 mL de éter dietílico, ajustando el pH a 2.0 adicionando HCl diluido y extraer con 80 mL de éter dietílico. Al final después de remover el disolvente se obtiene el aducto, confirmando su homogeneidad por medio de una cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en ingles).

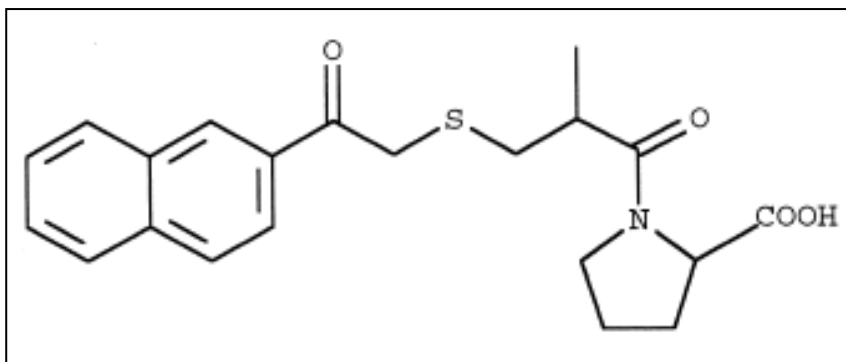


Figura 29. Estructura química de 2-captopril-2'-acetonafona. ⁶⁸ (Tomado de *Pharmaceutical Acta Helvetiae*)

Tratamiento de la muestra ⁶⁸

Obtener 1 mL de plasma usando un tubo de vidrio con 50 μ L de ácido ascórbico 0.1 M y 50 μ L de EDTA 0.1 M. A la muestra de plasma agregar 1 mL de la solución de estándar interno y 100 μ L de una solución de 2-bromo-2'-acetonafona al 0.2% en acetona. Esta última mezcla es agitada por 30 segundos para después dejar en reposo por 30 min a temperatura ambiente.

Después del reposo, la mezcla debe ser lavada dos veces con 7 mL de benceno para después agregar 0.5 mL de ácido perclórico con el objetivo de precipitar las proteínas presentes en la muestra; una vez precipitadas las proteínas plasmáticas el aducto del Captopril es extraído con 7 mL de éter dietílico donde la fase orgánica es evaporada a sequedad a 40 °C bajo una suave corriente de aire. El residuo es reconstituido en 0.5 mL de 2-propanol para después ser inyectado en el sistema cromatográfico (25 μ L).

- Parámetros analíticos⁶⁸

Los picos del Captopril libre en plasma correspondieron a concentraciones de la curva de calibración 0, 12.5, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/mL (Fig. 30 y Fig. 31).

Concentration added (ng/ml)	Concentration measured (mean ± S.E.)	
	Intra-day (n = 5)	Inter-day (n = 5)
500	500.5 ± 9.01(1.80)	505.13 ± 10.41(2.10)
250	262.5 ± 27.66(10.54)	260.13 ± 19.09(7.4)
125	118.5 ± 13.18(11.12)	112.63 ± 8.04(7.13)
50	55.67 ± 3.87(7.00)	53.22 ± 3.90(7.37)
25	25.75 ± 1.98(7.70)	29.30 ± 1.32(3.55)

Values in parentheses are coefficients of variation (%).

Figura 30. Curva de calibración del Captopril en plasma. (Tomado de *Pharmaceutical Acta Helvetiae*)⁶⁸

La curva de calibración fue obtenida a partir de las concentraciones del aducto formado de 2-captopril-2'acetonaftona con un coeficiente de correlación de 0.9980 cuya ecuación que describe la curva es:

$$Y = 0.004 X + 0.012$$

Donde Y se refiere al área de pico del aducto/ área de estándar interno y X es la concentración del Captopril (ng/mL) en plasma. El límite de cuantificación del Captopril para este método es de 10 ng/mL para 1 mL de plasma.

Hasta el momento sólo se han descrito metodologías para la cuantificación del Captopril en muestras de humanos, pero el objetivo de esta recopilación es determinar una técnica para cuantificar el Captopril en muestras de animales experimentales pequeños; con este fin a continuación se describe una metodología desarrollada por Pao-Chu Wu y colaboradores en el 2000 que tuvo como objetivo evaluar la farmacocinética y farmacodinamia del Captopril en geles hidrófilicos transdérmicos en conejos normotensos y ratas hipertensas espontaneas (HRS).⁷⁰

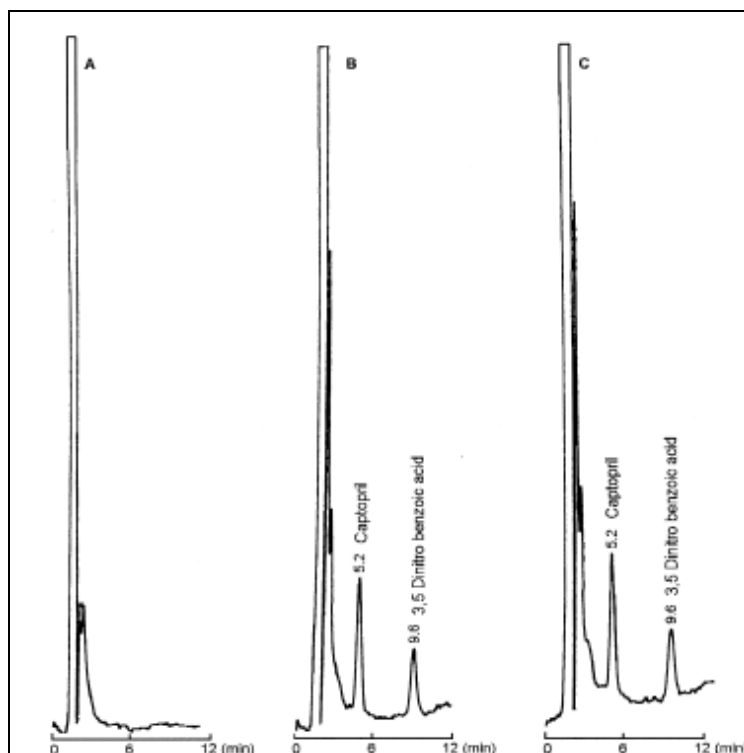


Figura 31. Cromatograma del (A) Captopril libre en plasma; (B) pico blanco con el Captopril (250 ng/mL) y 625 ng/mL de estándar interno; (C) muestra de plasma tomado 2 h después de la administración oral de 50 mg con 625 ng/mL de estándar interno.⁶⁸ (Tomado de *Pharmaceutical Acta Helvetiae*)

De esta investigación es importante destacar las características de los animales experimentales, en este caso el conejo normotenso es el animal experimental empleado para la determinación del Captopril. Los conejos macho empleados pertenecían a la raza de conejos blancos neozelandeses de 10 a 12 semanas de edad con un peso entre 2 y 2.5 Kg.

Estos conejos fueron anestesiados con una dosis de 30 mg/Kg de peso de pentobarbital sódico con una inyección en una vena marginal de la oreja para después colocar un catéter en la arteria femoral (Fig. 32).

- Condiciones cromatográficas⁷⁰

Equipo: HPLC sistema Waters

Columna: LichroCART C18, con 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 4 μ m.

Detector: UV modelo 470, monitoreando la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm

Fase móvil: 40% de acetonitrilo y 0.02% de ácido acético en agua

Flujo: 1 mL/min



Figura 32. Localización de la vena marginal auricular del conejo (Tomado de <http://argos.portalveterinaria.com>)⁶⁹

- Soluciones stock⁷⁰

Estándar interno: p-fenilfenol en una concentración de 1 µg/mL en acetonitrilo.

Agente de derivatización: bromuro de p-bromofenacilo que es preparado en una solución de acetonitrilo con una concentración de 2 mg/mL.

- Tratamiento de la muestra⁷⁰

Se toman muestras sanguíneas de arteria (2 mL) para ser mezcladas en un tubo de vidrio con 0.05 mL de EDTA 0.2M y ácido ascórbico para después centrifugar a 5000 rpm por 7 min a 4°C el plasma obtenido se toma 1 mL para ser agregado a un tubo con tapón de rosca que contiene 0.1 mL del reactivo de derivatización bromuro de p-bromofenacilo y 1 mL de Buffer de fosfatos pH 7.4, se mezcla y se deja en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Al finalizar el tiempo de reposo se agregan 0.2 mL de HCl 2 N con el objetivo de precipitar las proteínas plasmáticas; si la muestra no se usa al momento se puede congelar a -20 °C para su posterior uso.

Después de este tratamiento se agrega 0.1 mL de la solución de estándar interno, se mezcla y se agregan 6 mL de una solución 1:1 de acetato de etilo-benceno que es usada como disolvente de extracción. La muestra se agita fuertemente por 10 min, la fase orgánica es evaporada por sequedad bajo una atmósfera de presión reducida. El residuo es reconstituido en 0.2 mL de acetonitrilo para poder inyectar en el sistema cromatográfico un volumen de 20 µL. El límite de detección para el Captopril es de 50 ng/mL y el rango de concentraciones cuantificables es de 300 a 5000 ng/mL.

8.2 Cuantificación por Electroforesis Capilar

La determinación del Captopril en fluidos biológicos por EC es una técnica que aun no ha sido desarrollada, las metodologías para la cuantificación de este analito están referidas a un grupo general de compuestos (aminotioles). En el Journal of Chromatography B del 2009 Filippo Carlucci y Antonella Tabucchi⁷¹ describen de forma general algunas técnicas para la cuantificación de este tipo de compuestos en muestras biológicas por EC.

Es característico que en plasma menos del 90% de los tioles se encuentran en forma de disulfuros unidos entre un 40 a 50% a proteínas plasmáticas. Estos tioles pueden ser clasificados en dos grupos:^{72,73}

1. Mezcla de disulfuros de alto peso molecular
2. Tioles libres de bajo peso molecular

Al igual que en las metodologías en HPLC para la cuantificación del Captopril en EC también se utilizan reactivos de derivatización para brindar mayor estabilidad a los grupos tioles de las muestras biológicas. Este es el caso de la primer técnica desarrolla para evaluar tioles en plasma desarrollada en 1991 por Jellum y col⁷¹. Donde usaron meta monobromobimato (m-BBr) como agente fluorescente de derivatización.

La determinación de tioles en plasma es una técnica que ha sido utilizada recientemente donde los disulfuros son reducidos con trifenilfosfina, mientras que las proteínas son removidas por precipitación con ácido 5-sulfosalicílico o ácido tricloroacético⁹³. Antes de la separación las fracciones de aminotioles son derivatizados ya sea con m-BBr o con 4-fluoro-7-sulfamolibenzofurazano (ABD-F) para después ser detectados en un rango de longitud de onda entre 230 y 260 nm.⁹⁶

Kange y col⁷¹ describen una técnica para determinar tioles en muestras plasmáticas de humano, donde la muestra de plasma de 0.5 mL se le agrega 50 µL de fosfato de tributilo (TBP) al 10% que es usado como agente reductor del grupo tiol y agente de separación de este grupo con las proteínas plasmáticas.

Para precipitar las proteínas se usó ATC al 10% (5 mL) en una solución con EDTA 1 Mm después de centrifugar el sobrenadante es agregado a un tubo que contiene 0.2 mL de buffer de boratos 0.1 M y pH 8.0 en EDTA 2 mM, se mezcla para después dejar incubar por 5 min a 50 °C con 0.4 mL del reactivo de derivatización (preparado en el medio amortiguado pH 8.0).

Las muestras son pasadas por filtros con tamaño de poro de 0.45 µm para después ser inyectadas en el equipo de EC. El capilar de sílice fundida utilizado tiene una longitud de 27 cm con 50 µm de diámetro interno, se aplicó un voltaje de 15 kv usando como medio amortiguado de fosfatos 50 mM con pH 2.1 y una longitud de onda de 220 nm para la detección del tiol.

En el caso especial de la determinación de aminotioles en plasma la EC se ha combinado con detección por fluorescencia inducida por laser (LIF). Para este tipo de compuestos Rawi Ramautar y col en su artículo capillary electrophoresis in metabolomics ⁹³ describen una metodología para la determinación de aminotioles en muestras plasmáticas donde se propone el uso de un agente reductor como trist-(carboxietil)-fosfina acoplado a 5-bromometil-fluoresceína.

Como sistema de corrida se usa una solución amortiguadora de boratos 60mM con dodecilsulfato de sodio-2-amino-2-metil-1-propanol ajustando el pH a 10. El tiempo de separación es menos a dos minutos, obteniendo resultados bien correlacionados con un método estándar por HPLC. ⁹⁵

Otra metodología descrita para la cuantificación de tioles en sangre humana por EC fue propuesta por A. R. Ivanov ⁹⁹ donde el procedimiento de preparación de la muestra involucra la conversión de disulfuros a tioles libres con trifenilfosfina además de la precipitación de proteínas con ATC y como agente de derivatización se uso monobromobimano (mBrB) dando a esta determinación un alto porcentaje de recobro que facilita las condiciones de detección y cuantificación de los analitos.

- Medio de corrida: solución amortiguadora de fosfatos 80 mM ajustando el pH a 9.0
- Capilar: Capilar de sílice fundida con 65 cm de longitud y 50 µm de diámetro interno
- Acondicionamiento del capilar: Entre cada inyección el capilar fue acondicionado con NaOH 0.2M y con medio de corrida por 5 min cada uno.
- Condiciones de separación: El voltaje aplicado fue en fase normal a 250 volts manteniendo el capilar a una temperatura de 30°C.
- Inyección: hidrodinámica por 5 segundos a 50 mbar de presión.
- Preparación de soluciones: Trifenilfosfina 427.2 mM en una solución de agua –dioxano (80 % v/v) y HCl 2 M. mBrB 8.72 M en una solución de agua-acetonitrilo (9% v/v) con EDTA 2 mM.

Todas las soluciones usadas deben ser filtradas (0.22µm de poro) y desgasificadas a vacío por 10 minutos a 25°C.

9. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES BÁSICAS PARA LAS TÉCNICAS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA Y ELECTROFORESIS CAPILAR

Debido a la importancia del Captopril como fármaco usado en el tratamiento de la Hipertensión es necesario contar con métodos analíticos que permitan su identificación y cuantificación ya sea a nivel industrial o a nivel investigación. Es por esta razón que se han desarrollado algunos métodos que permiten hacer determinaciones analíticas de forma rápida y sencilla. Los métodos propuestos en esta revisión para realizar la cuantificación del Captopril en muestras farmacéuticas fueron:

- I. Procedimiento según la FEUM por medio de una técnica cromatográfica (HPLC) directa, usando un estándar interno de referencia con detección UV-Vis⁵⁸
- II. Procedimiento según USP por medio de una técnica en HPLC en fase reversa con detección UV-Vis usando un estándar interno de referencia para la cuantificación⁶⁰
- III. Determinación del Captopril en tabletas por medio de una técnica en HPCL por intercambio iónico con una detección fotométrica indirecta usando para la cuantificación la comparación del factor respuesta de un estándar y la solución problema del Captopril⁵⁷
- IV. Determinación simultánea del Captopril e Hidrocolotiazida en tabletas usando la técnica de EC por medio de una curva de calibración directa con una detección UV-vis⁶¹
- V. Determinación del Captopril por EC usando un método de pre-concentración en línea para muestras con baja concentración de este principio activo, usando una curva de calibración directa y con una detección UV- vis⁷⁴
- VI. Determinación del Captopril por EC en muestras en solución variando condiciones del medio de corrida (Soln. Amortiguadora)^{63, 64}

Los primeros tres métodos descritos se refieren a técnicas Cromatográficas (HPLC) ya que esta técnica sigue siendo la técnica de primera opción para la cuantificación de cualquier analito en general.

Entre los procedimientos planteados por la FEUM y la USP no hay mucha diferencia con excepción de los reactivos utilizados (estándar interno y la fase móvil).

La metodología III es una variación al método planteado por la USP, es un método más completo en el cual nos muestran por medio de pruebas estadísticas que es un método lineal, preciso y confiable ya que para disminuir las interferencias que puedan provocar los excipientes de la formulación se prepara un sistema placebo así como encaminar la determinación hacia dos tipos de muestras (estudios de recuperación y productos comerciales).

En la Tabla 17 se realiza la comparación de estos métodos cromatográficos donde podemos apreciar que en cuanto a las condiciones del equipo (columna y flujo) son muy similares a excepción del método III ya que la columna es de intercambio iónico. La longitud de onda para los tres métodos se encuentra dentro del espectro Ultravioleta, de igual forma el flujo es el mismo (1 mL/min).

La diferencia entre estos métodos son los reactivos, donde el más sencillo es el reportado por la FEUM, ya que la fase móvil sólo consta de dos especies al igual que los estándares. El método reportado por la USP es menos accesible porque los reactivos resultan menos fáciles de conseguir pero el manejo de los sistemas es más sencillo además que proponen el uso de una solución de resolución con el objetivo de ajustar este parámetro cromatográfico y así obtener datos confiables en la determinación.

El método III maneja tres sistemas en su fase móvil con el uso de un sistema amortiguador para ajustar el pH de la solución, este factor favorece a la conservación del Captopril, ya que es sensible a sufrir oxidación en su grupo tiol, por lo que es importante el manejo de un sistema amortiguador dentro de su análisis. La ventaja de este método con respecto a los oficiales es su sencillez en cuanto al tratamiento de las muestras y determinación del analito, además se toma en cuenta el factor interferencia provocado por los excipientes que pueda contener la formulación. La desventaja es el tipo de columna cromatográfica ya que no es tan accesible como una columna cromatográfica convencional.

Por EC se presentaron cuatro metodologías para la cuantificación del Captopril, podemos observar que todos son métodos sencillos donde no se necesitan tantos reactivos como para HPLC, la preparación de las muestras es muy sencilla y los tiempos de análisis más cortos. Hay que destacar los métodos desarrollados por alumnos de la FES Cuautitlán ya que brindan una nueva alternativa para la cuantificación de este analito. En la tabla 18 se muestra un consensado de estas dos técnicas.

En el caso de estos dos métodos los resultados obtenidos son satisfactorios, tanto para la cuantificación en tabletas como en muestras de baja concentración. EL método en principio es parecido, manejan el mismo sistema amortiguador, las condiciones de capilar son similares así como la inyección y la presión, la diferencia son los límites de cuantificación establecidos para cada método uno maneja concentraciones para la curva de calibración de 10 a 60 µg/mL mientras que el método que aplica una pre-concentración en línea va de 0.4 a 12 µg/mL.

Tabla 17. Comparación de métodos para la determinación del Captopril en muestras farmacéuticas por HPLC

	Método I (FEUM)	Método II (USP)	Método III (Alternativo)
Tipo de método cromatográfico	Fase normal	Fase reversa	Intercambio iónico
Columna y flujo	25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro. Flujo 1 mL/min	30 cm de longitud y 3.9 mm de diámetro. Flujo 1 mL/min	Intercambio iónico de baja capacidad. 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro. Flujo 1 mL/min
Fase móvil	Metanol y agua	Tetrahidrofurano en metanol y ácido fosfórico en agua	Soln. Amortiguadora biftalato de potasio 0.1M, metanol y agua. Ajustando el pH a 6.0
Longitud de onda	220 nm	220 nm	280 nm
Volumen de inyección	20 µL	20 µL	25 µL
Estándar interno	Disulfuro de Captopril en fase móvil 0.5 mg/mL	Disulfuro de Captopril en metanol 10 µg/mL	Ácido succínico en agua 1.8 mg/mL
Estándar Captopril	Captopril en fase móvil 0.5 mg/mL	-	Captopril en agua 5 mg/mL
Cuantificación	Comparación áreas de pico del estándar interno con la de la muestra	Porcentaje de disulfuro de Captopril en proporción del Captopril (áreas de pico)	Comparación del las áreas de pico del estándar interno y la muestra
Aplicación	Cuantificación en tabletas	Cuantificación en tabletas	Estudios de recuperación y comparación entre productos comerciales
Ajuste de Resolución	Inyección de estándar del Captopril y disulfuro de Captopril	Soln. con Estándar de disulfuro de Captopril y con ácido 3-tioacetil-2-metilpropanoico en metano	-

Tabla 18. Determinación del Captopril por EC (Métodos desarrollados en la FES Cuautitlán)

	Método IV⁶¹ (Captopril e Hidroclorotiazida)	Método V⁷⁴ (Bajas concentraciones del Captopril)
Capilar	Sílice fundida, longitud de 20 cm y diámetro interno de 50µm colocado a 10 cm del detector	Sílice fundida, longitud de 30 cm
Solución amortiguadora	Boratos 50 Mm (ácido bórico) pH 8.5	Boratos 20 mM (ácido bórico) pH 8.5 Boratos 2mM pH=8.5 (solución de aforo para los sistemas de la curva de calibración)
Método (Software)	Inyección hidrodinámica de 0.5 seg a 0.5 psi de presión, separación por 1 min a 30 kV polaridad normal	Inyección hidrodinámica de 25 seg a 0.5 psi de presión, separación por 0.30 min a 20 kV polaridad reversa Separación por 6 min a 20 kV polaridad normal
Longitud de onda	214 nm	214 nm
Estándar Captopril	500 µg/mL	50 µg/mL
Estándar Interno	-	Ácido-3,5-dinitrobenzoico 100 µg/mL
Método de cuantificación	Curva de calibración directa sin dilución (10 a 60 µg/mL)	Pre-concentración en líneas (LVSS) Curva de calibración directa sin dilución (0.4 a 12 µg/mL)

En cuanto a los métodos descritos en la tabla 16, no son muy detallados como los anteriores, sólo marcan las características básicas de la metodología con el propósito de ser ajustadas para cada tipo de equipo o características de la determinación. Aunque pudieran ser tomados como base para el desarrollo de un nuevo método ya que plantean las características esenciales para implementar la técnica de cuantificación.

Las técnicas de separación en fase líquida como HPLC y EC son las técnicas de uso frecuente para la determinación de sustancias orgánicas en muestras sanguíneas, el inconveniente de estas técnicas en la determinación de sustancias con grupos tiol, como el Captopril, no pueden ser detectados debido a que carecen de las propiedades estructurales necesarias para producir señales compatibles con detectores de UV y fluorescencia, es por eso que en todas las metodologías descritas para la cuantificación del Captopril en muestras sanguíneas se propone el uso de agentes de derivatización.⁹⁷

La elección del agente de derivatización es importante no sólo para la optimizar la detección también para estabilizar al grupo tiol deteniendo su degradación así como mejora de las propiedades cromatográficas (HPLC) y las respuestas de ionización con la introducción de carga a la molécula (CE) (Fig. 33). El agente de derivatización reacciona con el grupo funcional tiol para producir un derivado con absorción en el UV.⁹⁶

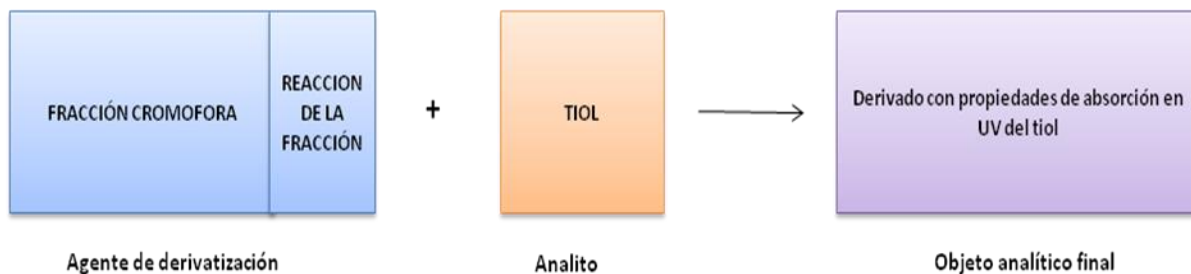


Figura 33. Esquema general de la reacción de derivatización UV para tioles. (Tomado de Journal of Chromatography B.)⁹⁶

Los agentes de derivatización se pueden clasificar en categorías según el tipo de la fracción reactiva: compuestos halógenos activados, compuestos de doble conexión activados, disulfuros,. Un reactivo ideal debe reaccionar rápidamente y específicamente con tiol a temperatura más baja posible y el pH ligeramente ácido para evitar la oxidación de los analitos que conducen a resultados erróneos del análisis.⁹⁶

El primer método para la cuantificación del Captopril en muestras sanguíneas por HPLC fue desarrollado por Kawahara y col. y fue este método la guía para posteriores estudios ya que en este se propone el uso del agente de derivatización así como el tratamiento de la muestra para esta determinación.

En esta revisión se expusieron tres métodos para la Cuantificación del Captopril en muestras sanguíneas humanas por HPLC debido a su sencilla metodología y la disponibilidad de equipos. Cabe señalar la importancia de la descripción de un método para la determinación de este analito para muestras sanguíneas provenientes de animales experimentales también por HPLC

En la Tabla 19 se resumen los aspectos más importantes de estas cuatro metodologías con el objetivo de observar las similitudes y diferencias entre estos métodos y cuál de estos sería más factible utilizar como base para el desarrollo de un nuevo método.

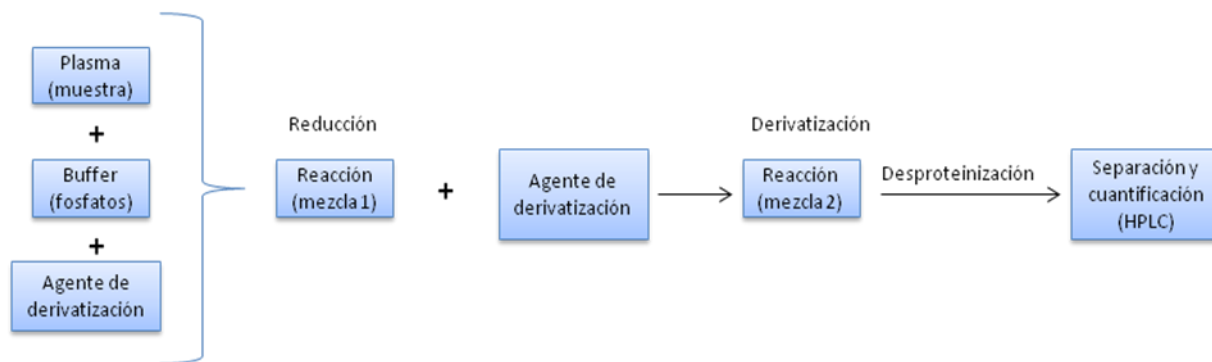


Figura 34. Esquematización del sistema analítico para la determinación de tioles en plasma por HPLC.⁹⁸ (Tomado de *Journal of Chromatography B.*)

Para la determinación del Captopril por EC en muestras sanguíneas no hay ninguna metodología reportada hasta el momento es por eso que para este fin en esta recopilación se hizo referencia a metodologías para la determinación de amino tioles en muestras sanguíneas (como se esquematiza en la figura 34).

EC es una técnica de separación analítica capaz de realizar separaciones de alta resolución para un rango diverso de compuestos. Es en particular adecuada para la separación de compuestos polares y cargados.⁹³ Un beneficio de EC con respecto a HPLC es que presenta una buena separación para compuestos pequeños en matrices complejas sin alguna preparación en especial si la concentración se encuentra en un alto rango, además es fácil de lavar después de terminar el análisis quedando lista para una nueva corrida.⁹³

Tabla 19. Comparación de metodologías para la cuantificación del Captopril en muestras sanguíneas por HPLC.

	Método I	Método II	Método III	Método IV
Autor y año	C. Richer (1984) HPLC fase normal	C. Arroyo et al. (1996) HPLC fase reversa	M. Ammini et al. (1999) Formación de aducto	Pao-Chu Wu, et al. (2000)
Tipo de muestra	Suero humano	Plasma humano	Plasma humano	Plasma animal experimental
Detector y longitud de onda usada	Detector UV-vis, ajustado a 254 nm	Detector de fluorescencia de longitud de onda variable ajustado en un rango de 340 a 389 nm	Detector UV-vis ajustado a 246 nm	Detector UV-vis ajustado a 260 nm
Columna y flujo	C-18 µBondapak con flujo ajustado a 1mL/min.	C-18 Nova-Pack de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 µm. Flujo de 1.5 mL/min.	C-18 µBondapak NH ₂ con 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 10 µm. Flujo isocrático de 2 mL/min.	LichroCART C-18 con 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 µm. Flujo 1 mL/min.
Agente derivatización (AD)	p- BPB (500 mg)	N-(1-Pirenil)-maleimida (NPM) 1 mg/mL en acetonitrilo	2-bromo-2'acetonaftona	Bromuro de p-bromofenacilo (2 mg/mL)
Estándar interno (SI)	Ácido tiosalicílico (250 mg) derivatizado con p-BPB en acetona (100 mL)	N-acetil-L-cisteína (12.7 µg/mL en metanol)	Ácido dinitrobenzoico (625 ng/mL) en soln. amortiguadora de fosfatos 0.01 M y pH 7.0	p-fenilfenol (1 µg/mL en acetonitrilo)

Continuación de la Tabla 20. Comparación de metodologías para la cuantificación del Captopril en muestras sanguíneas por HPLC

Fase móvil	Acetonitrilo-agua-ácido acético (55:44.5:0.5)	Acetonitrilo-ácido acético (42:28 v/v) con pH de 2.30	n-hexano-2-propanol-metanol-ácido acético	Acetonitrilo (40%)-ácido acético (0.02% en agua)
Tratamiento de la muestra	3 mL de suero agregar 150 µL de SI, extraer, el residuo es incorporado en FM (100 µL)	150 µL de plasma mas 600 µL de buffer fosfatos pH 7.0 más 90 µL de NPM y 10 µL de SI. Dejar en reposo. Y estabilizar con HCl.	1 mL de plasma mas 1mL de SI y 100 µL de AD (al 0.2 %). Dejar en reposo. 2 lavados con benceno y agregar ácido perclórico	1 mL de plasma mas 0.1mL de AD mas 1 mL buffer de fosfatos pH 7.4. Dejar en reposo para después agregar 0.2 mL de HCl (2 N) y 0.1 mL de SI.
Extracción	-	Con Acetato de etilo, evaporando a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.	Con éter dietílico evaporando a sequedad a 40 °C	Con Acetato de etilo y benceno, agitar fuertemente y evaporar a sequedad bajo una atmosfera de presión reducida.
Inyección	20 µL	Reconstituir en metano e inyectar 2 µL.	Reconstituir en 0.5mL de 2-propanol e inyectar 25 µL.	Reconstituir en 0.2 mL de acetonitrilo e inyectar 20 µL.
Rango de cuantificación	20 ng/mL a 2.5 µg/MI	25 a 600 ng/mL	12.5 a 500 ng/mL	300 a 5000 ng/mL

La EC combinada con detección UV ha sido usada para la determinación de compuestos de purina en muestras de plasma humano. La preparación de las muestras comprende la desproteínización del plasma con ácido perclórico llevando después a un pH neutro el sobrenadante.

El uso de detección LIF para EC provee de una mayor sensibilidad y una mejora de la selectividad de la detección en comparación con una detección UV. En ambos casos usualmente se requiere el uso de columnas de pre-concentración o post-columnas de derivatización de estos compuestos. La desventaja de usar la detección LIF es que el laser no se encuentra comercialmente disponible, con sólo un número limitado de longitud de onda.⁹⁵

Ya sea para HPLC o EC es importante tomar en cuenta los métodos de pre-concentración, ya que a veces la concentración del analito es muy baja y es necesario usar estas técnicas para obtener una mayor respuesta analítica.

La más usada es la técnica de extracción en fase solida (EFS) que puede ser aplicada a diferentes clases de compuestos como aniónicos (ácidos carboxílicos y nucleótidos), zwitteriónicos (aminoácidos) y catiónicos (aminas) así como analitos neutros como carbohidratos y esteroides.⁹³

Ya que los métodos descritos para esta técnica analítica no son específicos para el Captopril sólo pueden ser tomados en cuenta para desarrollar una metodología específica para este analito ya que EC presenta la ventaja sobre HPLC de poder separar compuestos en bajas concentraciones en matrices complejas y además si la muestra se encuentra en alta concentración no hay necesidad de aplicar un tratamiento previo para su adecuada cuantificación sólo debe ser diluida y filtrada o centrifugada para eliminar alguna partícula extraña.^{100,101}

10. CONCLUSIONES

El presente trabajo cumple con los objetivos propuestos de recopilar la información de métodos analíticos para la determinación del Captopril por HPLC y EC en muestras farmacéuticas y muestras sanguíneas, describiendo las metodologías y presentando las aplicaciones en el área Químico Farmacéutica.

- Se realizó la revisión de los conceptos básicos acerca de presión Arterial y los mecanismos que la regulan
- Se definió el concepto de hipertensión, su tratamiento y el mecanismo de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de este padecimiento
- Se revisaron las características físicas, químicas y farmacológicas del Captopril como parte primordial del conocimiento previo para el desarrollo de metodologías para su cuantificación
- A partir del concepto de química analítica y establecer su objeto de estudio se pudieron describir las características básicas que debe reunir una metodología de cuantificación para cualquier analito
- Se revisaron las características mínimas de calidad que debe presentar una metodología analítica para demostrar que es adecuada para su implementación
- Se definieron términos como cromatografía y electroforesis capilar así como las principales características de estas técnicas analíticas
- Se realizó la revisión de los principios básicos de la cromatografía de líquidos de alta eficacia así como las características básicas del equipo analítico
- A partir de la búsqueda hemerográfica y electrónica se realizó la recopilación de las metodologías oficiales y no oficiales para la determinación del Captopril en muestras farmacéuticas por electroforesis capilar y cromatografía de líquidos de alta eficacia
- A partir de la búsqueda hemerográfica y electrónica se revisaron metodologías para la determinación del Captopril en muestras sanguíneas por medio de cromatografía de líquidos de alta eficacia usando detección UV-Vis y fluorescencia
- Se informó de las metodologías para la determinación de aminotioles en muestras sanguíneas por electroforesis capilar como base para el desarrollo de nuevas metodologías en la determinación del Captopril por esta técnica analítica

11. REFERENCIAS

1. Velázquez-Monroy O, Rosas Pm, Lara Ea, Pastelin Hg, Castillo C, Attie F, Tapia Conyer R (2003). Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico. (Arch Cardiol Mex. 73(1): 62-77).
2. Martín Rosas, Gustavo Pastelín, Jesús Martínez Reding, Jaime Herrera-Acosta, Fause Attie (2004). Hipertensión Arterial en México. Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. Comité Institucional para el Estudio y Prevención de la Hipertensión Arterial Sistémica. (Arch Cardiol Mex. 74:134-157).
3. Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. Primera Edición, 2001. México, D.F.
<http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsd/collect/publin1/index/assoc/HASH0155.dir/doc.pdf>
Consultado: 01-Dic-2010.
4. S. Horovitz (1981). Angiotensin converting enzyme inhibitors: mechanisms of action and clinical implications. Baltimore, Munich: Urban & Schwarzenberg.
5. Norma Oficial Mexicana NOM 030-SSA2-1999, para la prevención, tratamiento y control de la Hipertensión Arterial. México, 5 de abril 2000.
6. <http://escuela.med.puc.cl/Publ/ManualSemiologia/210PresionArterial.htm>
Consultado el 04-Enero-2010.
7. Wyngaarden, J.B.; Smith, LL.H.; Bennett, J.C.: Cecil (1994). Tratado de Medicina Interna. 19 ed. Vol.1. Editorial Interamericana, México. P. 290-300.
8. Gayton A.C (1992). Tratado de Fisiología Médica. 8 ed. Editorial Interamericana, México. P. 204-27.
9. Rosivall L (1990). Renovascular effects of angiotensin II. Kidney. Vol. 38. P.s 18-s
10. http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_03/seccion_03_025.html
Consultado: 04-Dic-2010.
11. Gareth Beevers , Gregory Y H Lip , Eoin O'Brien (1999). Clinical review: ABC of hypertension. The pathophysiology of hypertension. .
http://www.sld.cu/galerias/pdf/servicios/hta/fisiopatologia___hta.pdf.
Consultado: 04-Dic-2010.
12. Barrios Alonso, Vivencio (2001). Insuficiencia cardíaca y bloqueadores de los receptores de Angiotensina II (BRA). Rev. costarric. Cardiol. vol.3, no.3, p.13-23. 3

13. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409. Consultado: 04-Dici-2010.
14. L. Brunton, S. Lazo, L. Parker. (2006). Goodman & Gliman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11° edición. McGraw-Hill Interamericana.
15. Carrillo-Esper, Raúl; Gonzalez-Salazar, Jorge A E CALVO-CARRILLO, Benjamín (2004). Uso De La Vasopresina En El Estado De Choque. Gac. Méd. Méx. Vol.140, N.1, Pp. 71-76.
16. Delgado Vega M., Hatim Ricardo A., Flores Delgado, E. (1999). Fisiopatología de la Hipertensión Arterial. Instituto Superior de Ciencias Médicas. Camagüey <http://www.sld.cu/libros/hiperten/indice.html>
Consultado: 04-Dic-2010.
17. M. Cárdenas, C. Carrillo (2006). Hipertensión Arterial sistémica (HAS). Diagnóstico, tratamiento y prevención. Boletín de práctica médica efectiva. INSP, SSA.
18. The fifth report of the Joint Committee of Detection. Evaluation and treatment of High Blood Pressure. (JNC V) Arch Intern Med. P. 93-1088, 1993.
19. Cordies Jackson, L. (1995). Hipertensión Arterial: Definiciones y clasificaciones. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias. P. 1-6.
20. Oficina Sanitaria Panamericana (OPS). (1990). La Hipertensión Arterial como problema de salud comunitario. Oficina Sanitaria Panamericana. V.3. P. 1-3.
21. Berne R.M.; Levy M.N. (1996). Principles of Physiology. 2da ed. Missouri: Mosby-Year Book, P.314-21, 302, 520, 684.
22. Hernández Alberto (1994). Fisiopatología de la HTA esencial. Modelo instructivo. P. 1-10.
23. Jesús Flórez (2004). Farmacología humana. 4ta. Ed. Editorial Elsevier, España.
24. Joaquín Sellén Crombet. (2007). Hipertensión Arterial: diagnóstico, tratamiento y Control. Editorial Universitaria. Hospital General Calixto García. Facultad de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana.
25. Trefor Owen Morgan, Adrienne I.E. Anderson, Robert Jeffrey MacInnis (2001). Inhibidores de la ECA, beta bloqueantes, bloqueantes del calcio y diuréticos para el control de la Hipertensión sistólica. The American Journal of Hypertension, Ltd. Published by Elsevier Science, Inc.3: 288-295.
26. Samir - Amer, M (1977). Mecanismo de acción de beta bloqueadores en Hipertensión. Biochemical Pharmacology. 26: 171-177

27. Atterhog, J. M., Duner H., Pernow, B.: Hemodynamic effect of long term treatment with Pindolol essential Hipertensiónwith special reference to the re-sistence and capacitance vessels of he forearm. Acta Med. Scand. 202:517 521, 1977.
28. Frithz, G., Danielson, M., Henningen, H., Malmborg, R., Nordstrom, G., Sho-roeder, G. (1978). Long teen blood pressure control with pindolol given once daily. Europ j. Cardiol. 7/2, 3: 131-136.
29. <http://www.recodec.com/pdf/IECAs.pdf> consultado el 11-12-10
Consultado: 10-Dic-2010
30. Ondetti M A (1988). Structural relationship of angiotensin converting enzyme inhibitors to pharmacologic acti - vity. Circulation; 77 (suppl. 1): 174-178.
31. Todd P A y Heel R C (1986)Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic propierties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. Drugs; 31 (3): 198-248.
32. Amery, A.: Billiet, L., Bol. A., Fagord, R., Reybanck, T., Williams, J (1976). Mecha-nism of hypertensive effect during beta - adrcnergia blockade in hypertensive patients. Am. er. Heart J. 91: 634-642.
33. Fernández Oropesa, C., Gallego Fernández, C (1995). Utilidad terapéutica de los inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina. Servicio de Farmacia. Hospital Regional Carlos Haya. Málaga; 19 (1): 3-9.
34. Magali Taylor, James S. Dawson. (2003). Lo esencial en farmacología Cursos "Crash" de Mosby, 2da. Ed. Editorial Elsevier, España.
35. D r u g d e x® Editorial Staff, (1993). C a p t o p r i l (drug Evaluation Monograph). En: Gelman C R y Rumack B H (eds.). Drugdex® Information System. Micromedex, Inc., Denver, Colorado (edición caduc. 31 de agosto de)
36. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Tenth Edition. Merck & Co. U.S.A.
37. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. (DEF).
<http://www.libreriamedica8a.com/productos/1444.htm>
Consultado: 10-Dic-2010.
38. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/captopril.htm
Consultado: 10-Dic-2010
39. <http://profesionalesdelasalud.blogspot.com/2007/07/666.html> Consultado: 10-Dic-2010

40. Lunn, G. (2000) Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis. Ed. Wiley-Interscience Publication, USA.
41. Daniel C. Harris (2001). Análisis Químico Cuantitativo Segunda Edición en Español, Editorial Reverte, España.
42. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-Introduccion.pdf>
Consultado: 28-dic-10
43. G Ewing, R. A. Wallingford, T. M Olefirowiez.(1989) Anal. Chem. Pg 61
44. Fernández G. A. Segura C. A. (2005). Electroforesis capilar. Aproximación a la técnica de detección. Editorial Universidad de granada. Pag 11-16. www.primravistalibros.com
45. Miguel Valcárcel Cases. (1994). Técnicas analíticas de separación. 1ra. Ed. Editorial Reverte.
46. History of HPLC 2008 [cited: Available from: <http://Kerouac.Pharm.uky.edu/asrg/HPLC/history.html>]
47. <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>. Consultado: 02-enero-2011
48. Douglas A. Skoog, F. James Holler (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5ta Edición, Editorial Mc. Graw Hill, España, pp 753
49. Romero García Aida Susana (2002). Cromatografía. Curso de Métodos. Instituto de biotecnología, UNAM.
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
Consultado: 29-Dic-2010
50. http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/ANÁLISIS-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Diapositivas_tema_12.pdf
Consultado: 30-Dic-2010
51. Willard, HH (1988). Instrumental Methods of Analysis. Wadsworth, Inc., U.S.A.
52. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech (2002) Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography,
http://gc.discussing.info/gs/b_theory
Consultado: 02- Ene- 2011
53. Juan Bussi (2007). Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Curso de análisis instrumental. Instituto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería.

54. Jose Marcos Jurado Jurado. Angela alcazar Rueda (2001). Química analítica avanzada. Cromatografía líquida. Departamento de Química Analítica Universidad de Sevilla. <http://personal.us.es/jmjurado/>
Consultado: 29-Dic-2010
55. R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. Casais (2002). Técnicas de Separación en Química Analítica. 2da. Ed Editorial Síntesis, Madrid.
56. http://www.jascoinc.com/Products/Chromatography.aspx?gclid=CLKMoNn0wqYCFQQPbAod_iW1Hw.
Consultado: 03-Enero-2011
57. Heftmann, E. (1992). Chromatography: Fundamentals and Applications of chromatography and related differential migration methods, Elsevier Science Publishers B.V, 5ta. Edición, EUA, pp. 2-14.
58. Tahseen Mirza, Heny S.I Tan (2000). Determination of capropril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development. Journal of Pharmaceuticall and Biomedical Analysis. 25 (2001) 39 www.elsevier.com/locate/jpba
59. <http://www.farmacopea.org.mx/>
Consultado: 03- Enero-2011
60. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2004). Tomo II, 8va. Edición SSA 282205. 2004. Ejemplar 243.Publicaciones e impresiones de calidad SA de CV. México.
61. The United States Pharmacopeia the national Formulary (2005). Twenty-Eight revisión. Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852.
62. Hernández Martínez, Alma Esther (2009). Optimización y validación de un método analítico para la determinación simultánea de Hidroclorotiazida y captopril en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
63. Lunne, G. (2000). Capillary electrophoresis, Methods for Pharmaceutical Analysis. Ed Wiley – interscience publication. USA.
64. Ling, B.L; Baeyens, W. R. G; Dewaele, C. (1991). Capillary zone electrophoresis with ultraviolet and fluorescence detection for the analysis of thiol. Application to mixtures and blood. Anal. Chim. Acta.
65. Hanna M; De Biasi V; Bond B., Salter C; Hutt, A. J; Camilleri, P. (1998). Estimation of the partition characteristics of drugs: A comparison of a large and diverse drug series utilizing chromatographic and electrophoretic methodology. Anal. Chim. Acta.

66. C. Arroyo, C. López-Calull, L. Garcia-Capdevila, I. Gich, M. Barbanoj, J. Bonal (1996). Determination of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetics studies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 688, Issue 2, 24 January 1997, Pages 339-344.
67. Kawahara, Y; Hisaoka, M; Yamazaki, Y; Inage, A; y Morioka, T. (1981). Determination of captopril in blood and urine by high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 150-157.
68. C. Richer; B. Giroux; P. F. Plouin; B. Maarek; y J. F. Giudicelli. (1983). captopril: pharmacokinetics and biological effects in hypertensive patients. *Br. J. clinic Pharmac.* (1984), 17, 243-250.
69. M. Amini, A. Zarghi, H. Vatanpour. (1999). Sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of captopril in plasma. *Pharmaceutical Acta Helvetiae*, Volume 73, Issue 6, June 1999, Pages 303-306.
70. <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/5803/>
71. Pao-Chu Wu, Yaw-Bin Huang, Judy Jui-Fen Chang, Jui-Sheng Chang, Yi-Hung Tsai. (2000). Evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics of captopril from transdermal hydrophilic gels in normotensive rabbits and spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 209, Issues 1-2, 19 November 2000, Pages 87-94.
72. Filippo Carlucci, Antonella Tabucchi. (2009). Review: Capillary electrophoresis in the evaluation of aminothiols in body fluids. *Journal of Chromatography B*, Volume 877, Issue 28, 15 October 2009, Pages 3347-3357.
73. R. Ivanov, I. V. Nazimov, L. A. Baratova. (2000) Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood: II. High-performance capillary electrophoresis with photometric detection. *Journal of Chromatography A*, Volume 895, Issues 1-2, 20 October 2000, Pages 167-171
74. Toshimasa Toyo'oka. (2009). Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples. *Journal of Chromatography B*, Volume 877, Issue 28, 15 October 2009, Pages 3318-3330
75. Sánchez Buenfil Priscila R. (2011). Cuantificación de captopril por Electroforesis Capilar usando una técnica de pre-concentración en línea. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
76. Montemayor Hernández, M; García Treviño, M; Garza Gorena, Y. (2002). Guía para la investigación documental. Editorial *Trillas. México.*

77. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lad/arenas_m_a/capitulo3.pdf
Consultado: 31-Enero-2011
78. <http://www.sciencedirect.com/>
79. <http://search.ebscohost.com/>
80. <http://www.dgbiblio.unam.mx/>
81. <https://bms.com.mx/>
82. <http://www.encyclopediaspana.com/captopril.html>
83. Cámara Carmen, Fernández H. P. (2002). Toma y tratamiento de muestras. Editorial McGraw Hill, España. pp. 1-3.
84. Douglas A. Skoog; Skoog D; Donald M. West. (2002). Introducción a la química analítica. Editorial Reverte. España. pp.
85. <http://www.pucpr.edu/titulov/Q420/Cap%201.pdf>
86. Paulin Saucedo Carla N. (2007). Revisión bibliográfica sobre la cuantificación de tiamina y piridoxina (vitaminas hidrosolubles) en medicamentos y muestras biológicas. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
87. Garfield, F.M. 1991. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International.
88. Deposito de documentos de la FAO. Calidad de métodos analíticos. Departamento de agricultura. <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s15.htm>
89. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2008. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
90. Castagnino Juan M. (1999). Electroforesis capilar. Acta bioquímica clínica latinoamericana Vol XXXIII, No 3,297-329. Argentina.
91. Bio Rad. An introduction to Capillary Electrophoresis. Laboratory Bulletin. 1701, US/EG pp. 1-6.
92. http://www.compendiodenfermeria.com/wpcontent/uploads/2007/11/hipertension_Arterial-medida-en-persona.JPG&imgrefurl

93. Malgor L. A; Valsecia M. V. Farmacología renal y cardiovascular Farmacología endocrina. Vol 2. Sección III cap 13. Farmacología de la Hipertensión Arterial. http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen2/cap13_hipert.pdf. Consultado: 01-feb-2011
94. Rawi Ramautar, Ayla Demirci, Gerhardus J. de Jong. (2006). Capillary electrophoresis in metabolomics. TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 25, Issue 5 in Analytical Chemistry, Vol. 25, No. 5.
95. T. Grune, G.A. Ross, H. Schmidt, W. Siems, D. Perrett, J. (1993). Chromatogr., A 636 105.
96. P. Lochman, T. Adam, D. Friedecky, E. Hlidkova, Z. Skopkova. (2003). Electrophoresis 24
97. K. Kuśmierk G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, and E. Bald. Review Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis. Journal of Chromatography B.
98. Péter Monostori, Gyula Wittmann, Eszter Karg, y Sándor Túri. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. Journal of Chromatography B, Volume 877, Issue 28, 15 October 2009, Pages 3331-3346
99. R. Głowacki, E. Bald, J. Chromatogr. B 877 (2009) 3400. Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection. Journal of Chromatography B, Volume 877, Issue 28, 15 October 2009, Pages 3400-3404.
100. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L.A. Baratova (2000). Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. II. High-performance capillary electrophoresis with photometric detection. Journal of Chromatography A, 895, 167–171.
101. E. Jellum, H. Dollekamp, A. Brunsvig, R. Gislefoss. (1997). Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Volume 689, Issue 1, 7 February 1997, Pages 155-164
102. J. Romano, P. Jandik, W.R. Jones, P.E. Jackson. (1991). Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. Journal of Chromatography A, Volume 608, Issues 1-2, 11 September 1992, Pages 385-393.